

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA, BIOQUÍMICA E FARMÁCIA
Centro de Ciências do Mar do Algarve



NITRAÇÃO DE TIROSINAS NA MIOSINA:
CONSEQUÊNCIAS FUNCIONAIS
OU
APENAS UM BIOMARCADOR ?

Pedro Filipe dos Santos Palma

Relatório de estágio de Licenciatura em Bioquímica

Orientadores:

Professor Doutor Manuel Aureliano Alves
Doutora Teresa Tiago

Faro, Dezembro de 2008

*“Escolher um caminho significa abandonar outros.
Querer percorrer todos os caminhos possíveis é acabar por não percorrer nenhum.”*

Paulo Coelho, escritor brasileiro (1947)

O conteúdo deste trabalho é da exclusiva responsabilidade do autor

Pedro Filipe dos Santos Palma

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Doutor Manuel Aureliano Alves, pela oportunidade que me concedeu em realizar este estágio científico no seu laboratório, por toda a disponibilidade, motivação, conselhos e ensinamentos transmitidos, tanto a nível científico como pessoal. Pelo “empréstimo” da sua máquina fotográfica que enriqueceu esta tese e pelo fornecimento variado de “dopamina” ao longo deste ano. Muito Obrigado!

À Doutora Teresa Tiago, pela orientação cuidada, inteira disponibilidade, imensa paciência, por todos os conhecimentos e conselhos transmitidos ao longo deste estágio e pela sua Amizade. Por me ter ajudado a desenvolver o meu espírito crítico e por me demonstrar que em investigação há muito mais que doenças neurodegenerativas, e que outras áreas, como o stress oxidativo no sistema contráctil, podem ser igualmente ou mais interessantes. Um enorme e sincero Obrigado!

À Doutora Denise Martins, da Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais da Universidade do Algarve, pela inteira disponibilidade, compreensão e ajuda na utilização da ultracentrífuga.

A todos os meus colegas e amigos de laboratório, pela companhia, boa disposição e ajuda, que tornaram os meus dias bem mais agradáveis e divertidos, mesmo quando tinha uma “stressante” e longa maratona de ensaios experimentais. Um agradecimento especial é dirigido à Ana, por ter facilitado a minha adaptação no laboratório 3.31, pelo incentivo, disponibilidade e preocupação em qualquer assunto científico ou pessoal e pela sua imediata Amizade.

Aos meus amigos e colegas de curso, em especial à Sílvia, à Cindy e ao Tiago, pelos momentos inesquecíveis vividos durante estes anos, por ouvirem as minhas preocupações, por todo o apoio e pela grande Amizade.

Ao Miguel, porque, tal como uma vez disseste, apesar das nossas diferenças tornaste-te num dos meus melhores amigos do peito. Obrigado por tudo!

Aos meus amigos de longa data, Bruno, Ricardo e João, por estarem sempre presentes apesar da pequena distância.

À minha família, pais, irmãos e avós, por estarem sempre ao meu lado, dando-me conselhos, incentivo e pelo permanente apoio, carinho e Amor que sempre tiveram comigo. Um agradecimento especial, à minha irmã Elsa e cunhado Víto, por me terem acolhido nestes últimos anos de licenciatura no vosso “cantinho”. E, por fim, aos meus sobrinhos, Miguel por me fazer rir quando aparentemente é impossível e por ser o melhor dos melhores “despertadores” ao sábado de manhã, e ao João por me obrigar a fazer as chamadas “pausas de reflexão” durante a escrita desta tese!

COMUNICAÇÃO EM CONGRESSO

Parte dos resultados descritos neste relatório de estágio científico foram apresentados em painel no XVI Congresso Nacional de Bioquímica da Sociedade Portuguesa de Bioquímica:

- Teresa Tiago, Pedro Palma, Carlos Gutiérrez-Merino e Manuel Aureliano; **Effect of tyrosine nitration mediated by peroxynitrite on myosin**; XVI Congresso Nacional de Bioquímica, 22-25 de Outubro de 2008; Açores; Portugal (**Anexo A**).

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abs	Absorvência
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADP	Adenosina 5'-difosfato
AIF	Factor inductor de apoptose
Asp	Aspartato
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
ATPase	Adenosina 5'-trifosfatase
BAR	Reagente de amplificação Biorad
BSA	Albumina de soro bovino
CAT	Catalase
CO ₂	Dióxido de carbono
CO ₃ ^{•-}	Radical anião carbonato
Cys	Cisteína
3D	Tridimensional
Da	Dalton
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	Calorimetria com varrimento diferencial
DTNB	5-5'-Ditiobis(2-ácido nitrobenzóico)
DTT	Ditiotreitol
ε	Coefficiente de extinção molar
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELC	Cadeia leve essencial de miosina
eNOS	Óxido nítrico sintetase endotelial
F-actina	Forma polimerizada da actina
g	Aceleração da gravidade
G-actina	Forma monomérica de actina
Glu	Glutamato
Gly	Glicina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
HC	Cadeia pesada de miosina
HMM	Meromiosina pesada
IC ₅₀	Concentração inibitória a 50 %

iNOS	Óxido nítrico sintetase inductível
LC1	Cadeia leve essencial da miosina (22,5 kDa)
LC2	Cadeia leve regulatória da miosina (18,5 kDa)
LC3	Cadeia leve essencial da miosina (15,5 kDa)
LDH	Lactato desidrogenase
LMM	Meromiosina leve
β -mer	β -Mercaptoetanol
Met	Metionina
3-NT	3-Nitrotirosina
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reduzida)
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reduzida)
nNOS	Óxido nítrico sintetase neuronal
NO	Óxido nítrico
\bullet NO	Radical óxido nítrico
\bullet NO ₂	Radical dióxido nítrico
NO ₂ ⁻	Anião dióxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
\bullet O ₂ ⁻	Radical anião superóxido
OH	Grupo hidroxilo
\bullet OH	Radical hidroxilo
ONOO ⁻	Anião peroxinitrito
ONOOH	Ácido peroxinítrico
PAR	Polímeros de poli(ADP-ribose)
PARG	Poli(ADP-ribose) glicohidrolase
PARP-1	Poli(ADP-ribose) polimerase-1
PBS	Tampão fosfato salino
PBST	Tampão fosfato salino com Tween-20
PDB	“Protein Data Bank”
PEP	Fosfoenolpiruvato
Phe	Fenilalanina
Pi	Fosfato inorgânico
PK	Piruvato cinase

PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonilo
Pro	Prolina
PSA	Persulfato de amónia
RLC	Cadeia leve regulatória de miosina
RNS	Espécie reactiva de nitrogénio
ROS	Espécie reactiva de oxigénio
S1	Subfragmento-1 de miosina
S2	Subfragmento-2 de miosina
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida com SDS
-SH	Grupo tiol ou sulfidrilo
SH1	Grupo tiol mais reactivo na miosina (Cys-707)
SH2	Segundo grupo tiol mais reactivo na miosina (Cys-697)
SIN-1	3-Morfolinosidnonimina
SOD	Superóxido dismutase
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletenodiamina
TFP	Tampão fosfato potássio (0,25 M K ₂ HPO ₄ e 0,25 M KH ₂ PO ₄ , pH7,2)
TFP+Bicarbonato	Tampão fosfato potássio com bicarbonato (0,25 M K ₂ HPO ₄ , 0,25 M KH ₂ PO ₄ e 25 mM KHCO ₃ , pH 7,2)
TNB	Ácido tionitrobenzóico
Tris	2-Amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
UV	Gama ultravioleta do espectro electromagnético
Vis	Gama visível do espectro electromagnético

RESUMO

Tem sido demonstrado que o biomarcador 3-nitrotirosina (3-NT), frequentemente utilizado na reactividade do peroxinitrito (ONOO^-) com as proteínas, aumenta na miosina após fibrilação atrial [Mihm et al, 2001b, 2003; Kooy et al, 1997] e durante o envelhecimento [Kansky et al, 2005a, 2005b; Hong et al, 2007]. Recentemente, foi também demonstrado que a exposição do subfragmento-1 de miosina (S1) ao ONOO^- promove a oxidação das cisteínas, resultando na inibição da actividade Mg^{2+} -ATPase estimulada por F-actina [Tiago et al, 2006a]. No entanto, a oxidação das cisteínas *in vivo* pode ser revertida através da acção de sistemas específicos, enquanto que a nitração de tirosinas é uma modificação pós-traducional irreversível. Assim, o presente estudo teve por objectivo dar resposta à seguinte pergunta: Nitração de tirosinas na miosina: terá consequências funcionais ou é apenas um biomarcador associado ao stresse nitrosativo?

No sentido a otimizar as condições de nitração foram realizados estudos comparativos nos tampões: Tris, TFP e TFP+Bicarbonato, sendo esperado por esta ordem um aumento da formação de 3-NT no S1. Verificou-se que a exposição aguda do S1 (9,1 μM) ao ONOO^- resulta na inibição da actividade Mg^{2+} -ATPase estimulada por F-actina, sendo os valores de IC_{50} de $0,41 \pm 0,10$; $0,29 \pm 0,04$ e de $0,40 \pm 0,03$ mM ONOO^- para os tampões Tris, TFP e TFP+Bicarbonato, respectivamente. Diferenças interessantes foram obtidas na actividade Mg^{2+} -ATPase basal do S1, observando-se uma estimulação de 250 % em TFP e de 150 % em Tris com 1 e 0,5 mM ONOO^- , respectivamente. Verificou-se também que a nitração de tirosinas é mais eficaz em TFP ($\text{IC}_{50} = 1,87 \pm 0,22$ mM ONOO^-) do que em Tris, com 2 mol e 0,3 mol 3-NT/mol S1, quando a actividade Mg^{2+} -ATPase estimulada por F-actina é inibida 50 %, respectivamente. Por *Western Blotting* demonstrou-se que a formação de 3-NT ocorre nos domínios proteolíticos do S1 com 25 e 50 kDa. Relativamente à oxidação de cisteínas, obtiveram-se valores de IC_{50} para a oxidação das cisteínas “rápidas” de $0,11 \pm 0,02$; $0,23 \pm 0,01$ e de $0,37 \pm 0,02$ mM ONOO^- e para a oxidação cisteínas totais de $0,43 \pm 0,06$; $0,33 \pm 0,08$ e de $0,16 \pm 0,03$ mM ONOO^- , para os tampões de tratamento Tris, TFP e TFP+Bicarbonato, respectivamente. Adicionalmente, a reversão das cisteínas oxidadas com o agente redutor DTT não restabelece nenhuma das actividades ATPásicas do S1. Por fim, observou-se que os ligandos naturais da miosina, nomeadamente o ATP e a actina, apresentam um efeito protector na nitração de tirosinas no S1. Propõe-se assim que este efeito seja o resultado das modificações estruturais no S1 que são induzidas pelos ligandos naturais na miosina. Portanto, de um modo geral, os resultados obtidos sugerem que a formação de 3-NT na miosina, para além de ser um biomarcador, também pode ter consequências a nível funcional desta proteína.

ABSTRACT

The frequently used 3-nitrotyrosine (3-NT) biomarker of peroxynitrite (ONOO⁻)-reactivity to proteins has been shown to increase on myosin after atrial fibrillation [Mihm et al, 2001b, 2003; Kooy et al, 1997] and during aging [Kansky et al, 2005a, 2005b; Hong et al, 2007]. Recently, it was also demonstrated that exposure of myosin subfragment-1 (S1) to ONOO⁻ promotes cysteine oxidation, resulting in the inhibition of the F-actin-stimulated S1-ATPase activity [Tiago et al, 2006a]. However, *in vivo* cysteine oxidation can be reverted by specific systems, while tyrosine nitration is an irreversible post-translational modification. Therefore, the objective of the present study was to answer the following question: Myosin tyrosine nitration: will have functional consequences or is just a biomarker associated to nitrosative stress?

In sense to optimize nitration conditions comparative studies were performed in Tris, TFP and TFP+Bicarbonate buffers, being waited by this order an increased of the formation of 3-NT on S1. It was verified that S1 (9,1 μM) acute exposure to ONOO⁻ results in the inhibition of the F-actin-stimulated S1-ATPase activity, with IC₅₀ values of 0,41 ± 0,10; 0,29 ± 0,04 and 0,40 ± 0,03 mM ONOO⁻ for Tris, TFP and TFP+Bicarbonate buffers, respectively. Interesting differences were obtained for the basal S1-ATPase activity, being observed a stimulation of 250 % in TFP and of 150 % in Tris with 1 and 0,5 mM ONOO⁻, respectively. It was also verified that the tyrosine nitration is more effective in TFP (IC₅₀ = 1,87 ± 0,22 mM ONOO⁻) than in Tris, with 2 mol and 0,3 mol 3-NT/mol S1, when 50 % of the F-actin-stimulated S1-ATPase activity is inhibited, respectively. By *Western Blotting* it was demonstrated that 3-NT formation occurs at the 25 and 50 kDa tryptic S1 domains. Regarding cysteines oxidation, it has obtained IC₅₀ values for the very accessible cysteines of 0,11 ± 0,02; 0,23 ± 0,01 and 0,37 ± 0,02 mM ONOO⁻ and for total cysteines of 0,43 ± 0,06; 0,33 ± 0,08 and 0,16 ± 0,03 mM ONOO⁻, for the treatment buffers Tris, TFP e TFP+Bicarbonato, respectively. Additionally, the reversion of cysteine oxidation by the reducing agent DTT failed to re-establish any of the S1 ATPase activities. Finally, it was observed that the myosin natural ligands, namely ATP and actin, present a protective effect in the S1 tyrosine nitration. It is proposed that this effect is the result of S1 structural changes that are induced by the myosin natural ligands. Therefore, altogether, the obtained results suggest that formation of 3-NT on myosin, besides being a biomarker, also can have consequences at the functional level of this protein.

II.3 – Caracterização das proteínas musculares isoladas	28
II.3.1 – Quantificação de proteínas pelo método de Bradford	28
II.3.2 – Análise do estado de pureza das proteínas isoladas	29
II.4 – Medição das actividades enzimáticas do subfragmento-1 de miosina	31
II.4.1 – Medição das actividades enzimáticas não fisiológicas do S1 – Ca ²⁺ e K ⁺ /EDTA-ATPase	32
II.4.2 – Medição da actividade enzimática fisiológica do S1 – Mg ²⁺ -ATPase	34
II.5 – Preparação e quantificação de peroxinitrito sintético	35
II.6 – Tratamento do subfragmento-1 de miosina com peroxinitrito sintético	36
II.7 – Optimização das condições de nitração das tirosinas do subfragmento-1 de miosina ..	37
II.8 – Quantificação de 3-nitrotirosinas	37
II.8.1 – Determinação do coeficiente de extinção molar de 3-nitrotirosinas	38
II.8.2 – Quantificação de 3-nitrotirosinas no subfragmento-1 de miosina	38
II.9 – Imunodeteção de 3-nitrotirosinas	38
II.9.1 – Tripsinização do subfragmento-1 de miosina	39
II.9.2 – Imunodeteção de 3-nitrotirosinas no subfragmento-1 de miosina por <i>Western blotting</i>	40
II.10 – Quantificação de cisteínas reduzidas	42
II.10.1 – Determinação do coeficiente de extinção molar do DTNB	43
II.10.2 – Quantificação de cisteínas reduzidas no subfragmento-1 de miosina	43
II.11 – Estudos de reversibilidade	44
II.12 – Estudos bioinformáticos	45
II.12.1 – Pesquisa da estrutura tridimensional	45
II.12.2 – Análise bioinformática da estrutura tridimensional	46
III – RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
III.1 – Caracterização das proteínas musculares isoladas	47
III.1.1 – Quantificação das proteínas musculares isoladas	47
III.1.2 – Análise do estado de pureza das proteínas isoladas	48
III.2 – Análise das actividades enzimáticas do subfragmento-1 de miosina	50
III.2.1 – Análise das actividades enzimáticas não fisiológicas do S1 – Ca ²⁺ e K ⁺ /EDTA-ATPase	50
III.2.2 – Análise da actividade enzimática fisiológica do S1 – Mg ²⁺ -ATPase	52

III.3 – Tratamento do subfragmento-1 de miosina com peroxinitrito sintético e otimização das condições de nitração	53
III.3.1 – Efeito do peroxinitrito nas actividades ATPásicas do subfragmento-1 de miosina	54
III.3.2 – Modificações nos resíduos do subfragmento-1 de miosina por exposição a peroxinitrito	58
III.3.2.1 – Efeito do peroxinitrito na nitração de tirosinas do subfragmento-1 de miosina	59
III.3.2.2 – Identificação dos domínios proteolíticos do subfragmento-1 de miosina nitrados pelo peroxinitrito	63
III.3.2.3 – Efeito do peroxinitrito na oxidação de cisteínas do subfragmento-1 de miosina	69
III.4 – Estudos de reversibilidade com DTT nos efeitos induzidos pelo peroxinitrito no subfragmento-1 de miosina	73
III.4.1 – Reversibilidade da oxidação das cisteínas do subfragmento-1 de miosina	75
III.4.2 – Reversibilidade da nitração das tirosinas do subfragmento-1 de miosina	77
III.4.2 – Estudos de reversibilidade com DTT a nível funcional do subfragmento-1 de miosina	78
III.5 – Efeito dos ligandos naturais do subfragmento-1 de miosina na nitração de tirosinas .	80
IV – CONCLUSÕES	85
V – ESTUDOS FUTUROS	88
VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
ANEXOS	

I – INTRODUÇÃO

Os tecidos musculares são constituídos maioritariamente por miosina (60-70 %) e esta proteína apresenta grande susceptibilidade aos danos oxidativos, pelo facto das espécies reactivas de oxigénio (ROS) e nitrogénio (RNS) serem continuamente produzidas nos músculos [Jackson, 2005; Reid, 2001]. O peroxinitrito (ONOO^-) é uma RNS e um forte oxidante, sendo muito mais reactivo do que os seus precursores, e pode promover tanto modificações oxidativas como nitrosativas [Alvarez e Radi, 2003], apresentando uma elevada afinidade para nitrar tirosinas [Beckman e Koppenol, 1996]. Nos últimos anos o efeito da nitração de tirosinas nas proteínas tem sido um tema muito debatido, uma vez que a formação de 3-nitrotirosinas (3-NT) para além de ser um biomarcador da presença de ONOO^- nos tecidos, também têm sido detectada em níveis elevados em diversas condições patofisiológicas. Tal facto tem conduzido à colocação de uma pergunta que pode ser aplicada a qualquer proteína, será que a nitração de tirosinas nas proteínas apresenta consequências funcionais ou será apenas um biomarcador?

Apesar da miosina ser a principal proteína muscular que constitui os tecidos musculares, poucos estudos foram realizados e consecutivamente ainda pouco se sabe acerca das consequências estruturais e funcionais que resultam do stress nitrosativo induzido pelo ONOO^- nesta proteína, nomeadamente no que se refere à nitração de tirosinas.

I.1 – Stresse oxidativo e nitrosativo

Define-se stresse oxidativo ou stresse nitrosativo como o deslocamento do equilíbrio existente entre a produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) ou de nitrogénio (RNS) e de agentes antioxidantes, no sentido das primeiras [Dringen, 2000; Sies, 1997]. Este desequilíbrio pode ser provocado por uma produção excessiva de ROS e /ou RNS, pela eventual deficiência de defesas antioxidantes, ou por ambas as situações anteriores. Apesar destas espécies, tal como o próprio nome indica, serem bastante reactivas e destrutivas, surpreendentemente, também podem ser selectivas e terem como alvo locais específicos nas diversas biomoléculas (proteínas, lípidos, glícidos e ácidos nucleicos) [Ischiropoulos e Beckman, 2003]. As reacções mediadas pelas ROS e/ou RNS podem ter como resultado danos a nível celular e molecular, induzindo o

desenvolvimento de diversas doenças, como por exemplo cardiovasculares, neurodegenerativas, pulmonares, cancro e diabetes. No entanto, é de referir que as espécies reactivas também podem actuar como moduladores internos nos sistemas biológicos, incluindo a sinalização celular, o controlo do fluxo sanguíneo, a neurotransmissão, a indução de morte celular programada (apoptose), assim como podem regular a expressão genética e a proliferação celular [Castro e Freeman, 2001; Cui et al, 2004; Dröge, 2002; Rahman et al, 2006; Sayre et al, 2008].

I.1.1 – Produção de espécies reactivas de oxigénio

Na cadeia respiratória mitocondrial, durante o processo de redução de uma molécula de oxigénio a água, ocorre a formação de vários intermediários: radical anião superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) [Cui et al, 2004; Turrens, 2003; Traverse et al, 2006]. Estas espécies são denominadas por ROS, uma vez que é atribuído esta designação às moléculas e/ou radicais livres que derivam do oxigénio molecular [Cui et al, 2004]. Nos sistemas biológicos as ROS podem ser produzidas por diversos mecanismos: através da cadeia respiratória mitocondrial; por NADPH oxidases; pela xantina oxidase; pelo citocromo P450; por flavoproteínas; pelo desacoplamento da oxido nítrico sintetase endotelial (eNOS), entre outros [Afonso et al, 2007; Cui et al, 2004; Dröge, 2002; Kunsch e Medford, 1999; Pacher et al, 2007; Thannickal e Fanburg, 2000]. Contudo, para além das fontes celulares, existem também fontes externas ao organismo que conduzem à formação de ROS, tais como o fumo do tabaco, a radiação, xenobióticos, drogas e ozono [Rahman et al, 2006].

I.1.2 – Produção de espécies reactivas de nitrogénio

Às espécies oxidantes que derivam do óxido nítrico (NO) ou que resultam, posteriormente, da reacção deste com as ROS são denominadas por espécies reactivas de nitrogénio (RNS), como por exemplo o anião nitroxilo (NO^-) e o peroxinitrito (ONOO^-). O NO é produzido por uma família de enzimas designadas por óxido nítrico sintetases (NOS). Estas enzimas na presença de oxigénio molecular e de NADPH convertem o grupo guanidina do aminoácido L-arginina, através de oxidações enzimáticas, a L-citrulina ocorrendo simultaneamente a formação de NO e de NADP. Actualmente são conhecidas três isoformas de NOS, a NOS endotelial (eNOS), a NOS neuronal

(nNOS) e a NOS inductível (iNOS). Enquanto a eNOS e a nNOs são ambas expressas constitutivamente no organismo, por outro lado a iNOS é induzida em situações de inflamação através de mediadores pró-inflamatórios como as citocinas [Alderton et al, 2001; Farrell e Blake, 1996; Pacher et al, 2007]. Durante muitos anos o NO foi considerado como uma espécie altamente tóxica e reactiva, no entanto, hoje é sabido que o NO é um mensageiro intracelular e muitos dos efeitos que anteriormente foram atribuídos ao NO devem-se efectivamente ao ONOO⁻ [Pacher et al, 2007].

I.1.2.1 – Formação de peroxinitrito

O principal mecanismo reaccional para a formação do peroxinitrito (ONOO⁻) consiste na recombinação do radical óxido nítrico ([•]NO) com o radical anião superóxido ([•]O₂⁻) [Eq. 1]. Esta reacção encontra-se próxima do limite de difusão e apresenta uma constante de reacção de segunda ordem de aproximadamente 10¹⁰ M⁻¹s⁻¹ [Alvarez et al, 2002; Goldstein e Czapski, 1995; Huie e Padmaja, 1993; Kissner et al, 1997; Radi et al, 2001].



Uma vez que o [•]NO é neutro e hidrofóbico possui a capacidade de atravessar as membranas por difusão [Denicola et al, 1996b; Landcaster, 1994], no entanto o [•]O₂⁻ já não tem a mesma capacidade por ser aniónico a pH neutro (pKa = 4,8), podendo unicamente permear as membranas por via de canais aniónicos [Fridovich, 1995]. Deste modo, ficou estabelecido que a formação do peroxinitrito ocorre predominantemente na proximidade dos locais de formação do [•]O₂⁻ [Alvarez e Radi, 2003; Radi et al, 2001]. Porém, o ONOO⁻ consegue atravessar as membranas por canais aniónicos, ou por difusão passiva quando se encontra no seu ácido conjugado, o ácido peroxinítrico (ONOOH) [Denicola et al, 1998; Marla et al, 1998]. É de referir que o anião peroxinitrito e a sua forma protonada, o ácido peroxinítrico (pKa = 6.8) existem em equilíbrio dependente do valor do pH, contudo a pH 7,4, ou seja, a pH fisiológico, 80 % desta espécie encontra-se sob a forma de anião [Radi et al, 2001].

I.1.3 – Reactividade biológica do peroxinitrito

O peroxinitrito é um forte oxidante, sendo muito mais reactivo do que os seus precursores e pode reagir com diversos componentes celulares, bem como com as principais biomoléculas, conduzindo a danos celulares. Dependendo dos níveis dos danos celulares infligidos, o peroxinitrito pode eventualmente promover a morte celular por meio de duas vias, necrose ou apoptose (**Figura I.1**) [Pacher e tal, 2007; Szabó et al, 2007]. Duma forma geral, os efeitos citotóxicos dependentes do peroxinitrito podem resultar da peroxidação lipídica, da oxidação e da nitração de proteínas, da oxidação do ADN, da activação de metaloproteínas, assim como da inactivação duma variedade de enzimas. Contudo, as enzimas mitocondriais são particularmente vulneráveis ao ataque do ONOO^- , que tem como consequência a redução da formação do ATP e a indução da despolarização mitocondrial devido à abertura dos poros de permeabilidade. Estes eventos resultam, para além do impedimento da produção de ATP pela cadeia transportadora de electrões, na libertação de factores apoptóticos do espaço intermembranar para o citoplasma, incluindo o factor inductor de apoptose (AIF) e o citocromo c, que consequentemente, conduzem à morte celular por apoptose (**Figura I.1**). Por outro lado, quando o ONOO^- tem como alvo a molécula de ADN provocando a quebra da sua cadeia ocorre a activação da enzima poli(ADP-ribose) polimerase-1 (PARP-1), com o intuito de reparar os danos na cadeia de ADN. A activação desta enzima consome NAD^+ de forma a sintetizar polímeros de poli(ADP-ribose) (PAR), que posteriormente são metabolizados pela poli(ADP-ribose) glicohidrolase (PARG), de modo a restaurar as proteínas no seu estado nativo. Por sua vez, o consumo de NAD^+ proporciona disfunções na glicólise, no ciclo de Krebs e na cadeia transportadora de electrões, resultando no impedimento de formação de ATP (**Figura I.1**). Uma vez que a morte celular programada, apoptose, encontra-se completamente dependente de ATP, nesta situação a via de morte celular predominante é a necrose, que consequentemente irá causar danos celulares nos organelos e biomoléculas vizinhas [Pacher e tal, 2007; Szabó et al, 2007].

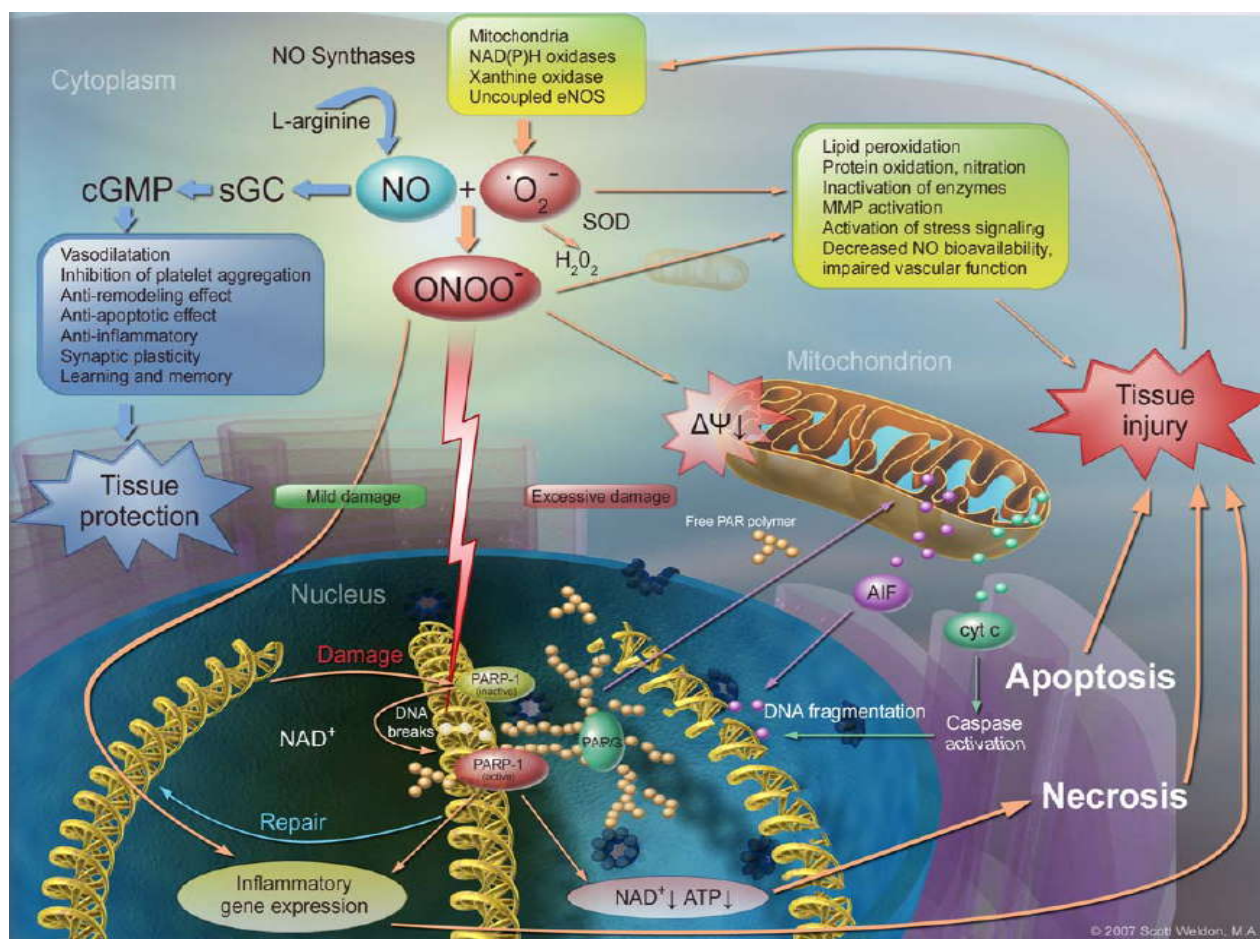


Figura I.1: Mecanismos moleculares mediados pelo peroxinitrito na morte celular. O óxido nítrico e o radical anião superóxido reagem originando o peroxinitrito, o qual pode promover danos tanto a nível de organelos celulares como de biomoléculas. Quando o ONOO^- tem como alvo a mitocôndria desencadeia a libertação de moléculas apoptóticas, como o IAF e o citocromo c, que conduzem à morte celular por via apoptótica. Quando o ONOO^- interage com o ADN provoca a sua clivagem que activa o PARP-1, ocorrendo o consumo de NAD^+ e de ATP, o que resulta predominantemente na morte celular por via necrótica [Pacher et al, 2007].

Contudo, as reacções acima mencionadas, não se devem apenas à forma aniónica do peroxinitrito, mas também podem ser provocadas pela sua forma protonada, ou até mesmo por outras espécies secundárias que derivam das anteriores (**Figura I.2**). Deste modo, foi sugerido por Alvarez e Radi [2003] que o peroxinitrito reage com as biomoléculas através de dois possíveis mecanismos. Em primeiro lugar, o peroxinitrito ou o ácido peroxinítrico podem reagir directamente com alguns alvos moleculares, como por exemplo proteínas, lípidos e ADN. Ainda neste primeiro mecanismo, são incluídas as reacções quer do ONOO^- quer do ONOOH com metais de transição que proporcionam a formação do radical dióxido nítrico ($\bullet\text{NO}_2$) e do anião dióxido nítrico (NO_2^-), respectivamente. Em segundo lugar, o ácido peroxinítrico pode sofrer homólise originando os radicais dióxido nítrico ($\bullet\text{NO}_2$) e o hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), que por seu turno também reagem com os alvos moleculares, resultando por exemplo na nitratação de tirosinas e na peroxidação lipídica.

Uma das reacções mais relevantes a nível biológico do peroxinitrito é aquela que ocorre com o dióxido de carbono (CO_2), que se encontra presente nos sistemas biológicos com uma concentração relativamente elevada (1,3-1,5 mM) [Alvarez e Radi, 2003]. O dióxido de carbono reage com o ONOO^- com uma constante de segunda ordem de $4,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ a pH 7,4 e a 37°C [Denicola et al, 1996a; Lyman e Hurst, 1995], levando à formação de $\cdot\text{NO}_2$ e do radical anião carbonato ($\text{CO}_3^{\cdot-}$) [Bonini et al, 1999]. Por sua vez, estes radicais podem reagir especificamente com diferentes biomoléculas, o que faz com que o CO_2 redireccione a reactividade *in vivo* do peroxinitrito, em vez de ser um *scavenger* desta RNS [Alvarez e Radi, 2003; Denicola et al, 1996a].

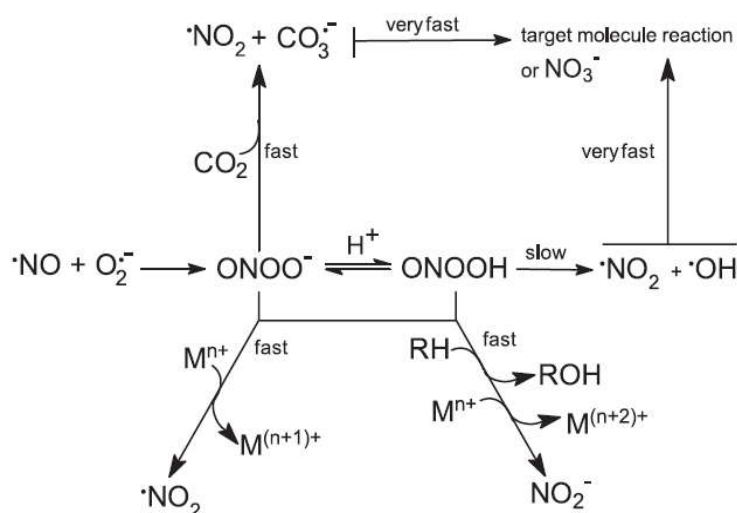


Figura I.2: Esquema ilustrativo dos diversos mecanismos reaccionais mediados pelo peroxinitrito. O anião peroxinitrito (ONOO^-) é produzido através da reacção entre o óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) e o radical anião superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$). O anião peroxinitrito (ONOO^-) e o ácido peroxinitrico (ONOOH) promovem reacções de oxidação de um ou dois electrões nos metais de transição (M), conduzindo à formação de radical dióxido nítrico ($\cdot\text{NO}_2$) e do anião dióxido nítrico (NO_2^-), respectivamente. O ONOO^- também reage com o dióxido de carbono, originando as espécies $\cdot\text{NO}_2$ e radical carbonato ($\text{CO}_3^{\cdot-}$). Alternativamente, o ONOOH pode sofrer homólise formando-se $\cdot\text{NO}_2$ e radical anião carbonato ($\text{CO}_3^{\cdot-}$), que reagem rapidamente com as biomoléculas ou podem recombinar-se gerando nitrato (NO_3^-) [Alvarez e Radi, 2003].

I.1.3.1 – Interacção entre o peroxinitrito e as proteínas

Um dos aspectos mais importantes no qual o peroxinitrito se encontra envolvido é a sua interacção com proteínas, apresentando como consequência modificações oxidativas e nitrosativas em diversos resíduos de aminoácidos na cadeia peptídica [Alvarez e Radi, 2003; Ischiropoulos e Al-Mehdi, 1995; Radi, 2004]. Os aminoácidos mais susceptíveis à oxidação por parte do ONOO^- são os que contêm um átomo de enxofre (cisteína (Cys) e metionina (Met)) e os aromáticos (triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe)), mas apenas os resíduos de cisteína, metionina e triptofano reagem directamente com o ONOO^- . No entanto, apesar dos aminoácidos tirosina e fenilalanina não

reagirem directamente com o ONOO^- , estes podem ser modificados através das espécies secundárias que derivam do ONOO^- , tais como o $\bullet\text{OH}$, o $\text{CO}_3^{\bullet-}$ e o $\bullet\text{NO}_2$ [Alvarez e Radi, 2003].

I.1.3.1.1 – Oxidação de cisteínas

A reacção do peroxinitrito com os grupos tiol (-SH) das cisteínas da albumina foi a primeira reacção directa do peroxinitrito a ser descrita [Radi et al, 1991]. De facto, a cisteína é o aminoácido que reage mais rapidamente e directamente com o ONOO^- , apresentando uma constante de segunda ordem de $4,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (pH 7,4 a 37 °C). Deste modo é considerado que esta reacção mediada pelo ONOO^- é a que ocorre com maior prevalência nos sistemas biológicos [Alvarez e Rad, 2003; Radi et al, 1991]. Na oxidação dos grupos tiol das cisteínas, induzida pelo ONOO^- , podem resultar diferentes produtos (**Figura I.3**), cujo mecanismo envolve provavelmente um ataque nucleofílico aos grupos tiol das cisteínas. Especificamente, na formação das ligações dissulfureto, estas são originadas pela reacção entre dois grupos radicais cisteinilo ($\bullet\text{RS}$) que resultam do ataque nucleofílico às cisteínas [Alvarez e Radi, 2003].

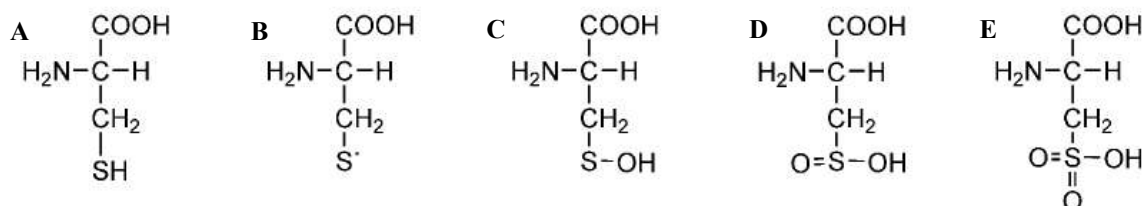


Figura I.3: Estruturas da cisteína e dos respectivos produtos que resultam da oxidação mediada pelo peroxinitrito. (A): cisteína; (B): grupo radical cisteinilo ($\bullet\text{RS}$); (C): ácido sulfénico; (D): ácido sulfinico e (E): ácido sulfónico [Jacob et al, 2004].

Uma vez que os resíduos de cisteínas no estado reduzido são necessários à estabilidade e actividade biológica de diversas proteínas, a sua oxidação tem geralmente como consequência a inibição das actividades dessas mesmas proteínas [Pacher et al, 2007]. No entanto, actualmente encontra-se descrito que a oxidação das cisteínas, que foram modificadas durante o envelhecimento ou em condições de stresse oxidativo, podem ser reparadas *in vivo* através de sistemas biológicos específicos [Petropoulos e Friguet, 2006; Squier, 2001]. A título de exemplo, a glutatona reductase e a tioredoxina reductase são capazes de reverter a oxidação de cisteínas sob a forma de ligação dissulfureto. Mais ainda, a tioredoxina reductase encontra-se também envolvida na redução de cisteínas oxidadas sob a forma de ácido sulfénico [Holmgren, 2000; Holmgren et al, 2005].

I.1.3.1.2 – Nitração de tirosinas

Os resíduos de tirosina não reagem directamente com o peroxinitrito, no entanto a exposição deste resíduo ao peroxinitrito pode conduzir à formação de 3-nitrotirosina (3-NT), de 3,3'-ditirosina e de 3-hidroxitirosina (**Figura I.4**) [Alvarez e Radi, 2003].

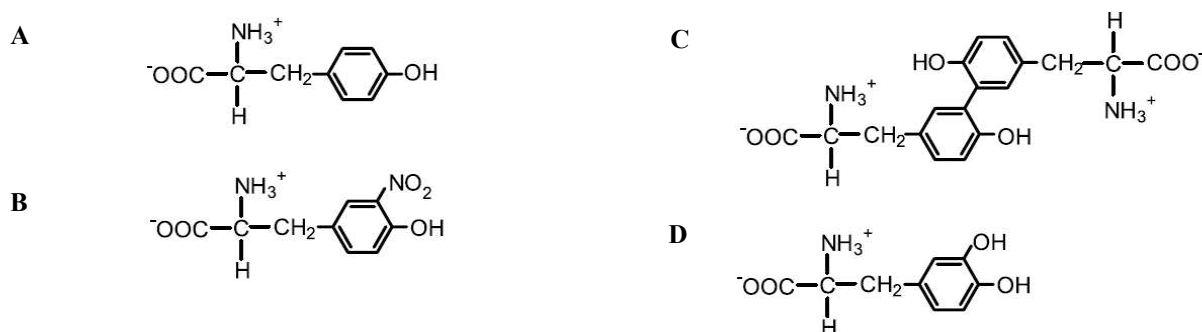


Figura I.4: Representação das modificações oxidativas da tirosina por reacções dependentes de peroxinitrito. (A): Tirosina; (B): 3-nitrotirosina (3-NT); (C): 3,3'-ditirosina e (D): 3-hidroxitirosina. Os compostos B, C e D são os principais produtos formados através das reacções dos derivados do peroxinitrito (dióxido nítrico, radical anião carbonato e radical hidroxilo) com a tirosina [Alvarez e Radi, 2003].

A nitração de tirosinas promovida por ONOO⁻ ocorre por meio de um mecanismo radicalar no qual é necessário a formação do radical tirosilo, sendo este originado através da reacção da tirosina com as espécies secundárias que derivam do ONOO⁻, tais como o [•]OH e o [•]NO₂. Porém, foi verificado que os níveis de produção de 3-nitrotirosinas através deste mecanismo eram relativamente baixos, uma vez que o radical hidroxilo reage mais facilmente com as tirosinas levando maioritariamente à produção de 3-hidroxitirosinas [Alvarez e Radi, 2003; Radi et al, 2001]. Contudo, uma vez que *in vivo* a formação dos radicais [•]OH e [•]NO₂ resultantes da homólise do ácido peroxinítrico é um processo lento (**Figura I.2**), após vários estudos, tornou-se evidente que a formação de 3-nitrotirosinas nos sistemas biológicos era essencialmente dependente das reacções entre o ONOO⁻ e o dióxido de carbono. Sendo assim, na presença de dióxido de carbono os níveis de produção de 3-NT são superiores, pelo facto do CO₃^{•-} reagir rapidamente com as tirosinas conduzindo à formação do intermediário radical tiroliso (**Figura I.5**) [Alvarez e Radi, 2003; Goldstein e Merényi, 2008].

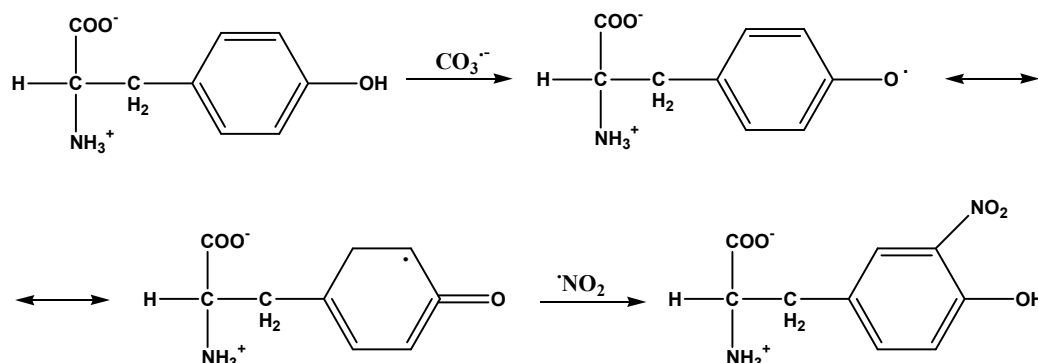


Figura 1.5: Mecanismo de formação de 3-nitrotirosinas mediado por peroxinitrito. Em primeiro lugar, o ONOO⁻ reage com o CO₂ originando os radicais [•]NO₂ e CO₃^{•-}. Por sua vez, o CO₃^{•-} reage rapidamente com a tirosina ocorrendo a produção do intermediário, o radical tirosilo. Por fim, após rearranjo do anel, o [•]NO₂ reage com o radical tirosilo resultando na formação de 3-nitrotirosina [Adaptado de Radi et al, 2001].

As reacções do peroxinitrito com os componentes celulares proporcionam modificações oxidativas que podem servir como uma “impressão digital” dos danos causados pela formação e reacção desta RNS. Uma das modificações frequentemente utilizadas para tal efeito é a nitração de tirosinas nas proteínas que resulta na formação da modificação pós-traducional, as 3-nitrotirosinas [Dalle-Donne et al, 2006; Radi et al, 2001]. Isto deve-se ao facto da nitração de tirosinas nas proteínas ser uma modificação química bastante estável, e da inexistência de sistemas metabólicos capazes de reparar ou reduzir esta modificação, ou ainda pelo facto destes sistemas operarem muito lentamente [Gow et al, 1996b; Kamisaki et al, 1998; Balabanli et al, 1999]. É de salientar que actualmente não existem evidências sólidas da existência de um sistema metabólico específico capaz de reverter a formação de 3-NT, como por exemplo uma desnitrase [Alvarez e Radi, 2003; Radi et al, 2001; Souza et al, 2008]. Os factos anteriores contribuíram assim para que a comunidade científica considere que a nitração de tirosinas nas proteínas é um processo irreversível e que a formação de 3-NT seja um marcador da produção de ONOO⁻ *in vivo* e, conseqüentemente, dos danos celulares provocados por esta espécie.

I.1.3.1.2.1 – Consequências biológicas e funcionais da formação de 3-nitrotirosinas

Nos últimos anos o efeito da nitração de tirosinas nas proteínas tem sido bastante questionado e investigado, com o propósito de desvendar se a formação de 3-nitrotirosinas apresenta consequências funcionais, ou se simplesmente se trata de um biomarcador associado ao stresse nitrosativo. As primeiras evidências de que as reacções de nitração poderiam ocorrer nos sistemas

biológicos surgiram em dois estudos. No primeiro foi observado que ratos injectados com tetranitrometano induziam a formação de 3-NT [Ohshima et al, 1990], enquanto que no segundo foi demonstrado, também em ratos, que um análogo de tirosina era nitrado por activação de macrófagos [Ischiropoulos et al, 1992]. Através destas publicações muitas outras surgiram, revelando a formação de 3-NT em diversos tipos de células e de tecidos, bem como em diferentes condições biológicas, o que possibilitou a caracterização das consequências biológicas e funcionais que advêm da nitração de tirosinas nas proteínas (**Figura I.6**). Foi verificado que as proteínas expostas ao ONOO⁻ são selectivamente reconhecidas e degradadas pelo proteassoma [Gow et al, 1996b; Grune et al, 1998], embora as bases moleculares no reconhecimento mediado por este permaneçam ainda por esclarecer. Contudo, é sugerido que o reconhecimento de proteínas nitradas pelo proteassoma deve-se, possivelmente, à combinação dos seguintes factores: a presença de um grupo nitro; a alteração do ponto isoeléctrico da proteína e o deslocamento de outros aminoácidos ou a exposição de regiões hidrofóbicas na zona superficial da proteína. Reunidos todos os factores anteriores, e na ausência de outras modificações na estrutura da proteína, é proposto que a nitração de tirosinas consiste num evento que aumenta a degradação das proteínas através do proteassoma (**Figura I.6**) [Souza et al, 2008]. No entanto, encontra-se também reportado que em casos extremos, onde os níveis de oxidação e nitração são elevados, a formação de 3-NT e de ditirosinas pode promover a agregação das proteínas nitradas. Estes agregados são considerados como “fracos” substratos do proteassoma, uma vez que foi verificado que a sua taxa de degradação através do proteassoma é bastante inferior [Grune et al, 1998; Grune et al, 2004]. Sendo assim, a formação destes aglomerados resulta numa resistência à degradação por parte do proteassoma, tendo como consequência a sua acumulação sob a forma de amilóides intra- ou extra-celulares [Souza et al, 2008]. Relativamente às cascatas de fosforilação, a fosforilação dos resíduos de tirosina encontram-se envolvidos em vários mecanismos de sinalização celular, como por exemplo através de factores de crescimento e de oncogenes. A fosforilação ocorre no grupo hidroxilo (OH) dos resíduos de tirosina, enquanto que a nitração de tirosinas resulta na substituição de um átomo de hidrogénio por um grupo nitro na posição orto em relação ao grupo OH do anel aromático da tirosina. De facto, encontra-se descrito que a incorporação do grupo nitro no anel de tirosina resulta numa diminuição do valor de pKa [Creighton, 1997], bem como provoca impedimentos estéreos [Savvides et al,

2002]. Adicionalmente, é sugerido que a alteração dos factores descritos anteriormente podem explicar as diferenças na fosforilação de tirosinas e, conseqüentemente, a influência da nitração de tirosinas nas cascatas de fosforilação podem ser mais subtis e modulatórias do que tinham sido inicialmente postuladas (Figura I.6) [Souza et al, 2008]. Ainda a nível biológico, encontra-se também descrito que a nitração de tirosinas nas proteínas pode mediar a resposta imunológica, uma vez que existem registos que reportam que as proteínas nitradas induzem a formação de anticorpos anti-3NT e de linfócitos (células T) (Figura I.6) [Birnbom et al, 2003; Herzog et al, 2005; Thomson et al, 2007]. Contudo, mais uma vez, é de referir que a reversibilidade da nitração de tirosinas nas proteínas através de agentes redutores biológicos ou por acção de uma desnitrase, ainda não são conhecidos nem existem evidências sólidas acerca da sua existência. Porém, considerando que de facto tais sistemas existam e que possam efectuar esta reversão, é de salientar que após este evento, uma vez que existem ROS e RNS em abundância em condições de inflamação, há novamente a possibilidade de formação de 3-NT (Figura I.6) [Souza et al, 2008].

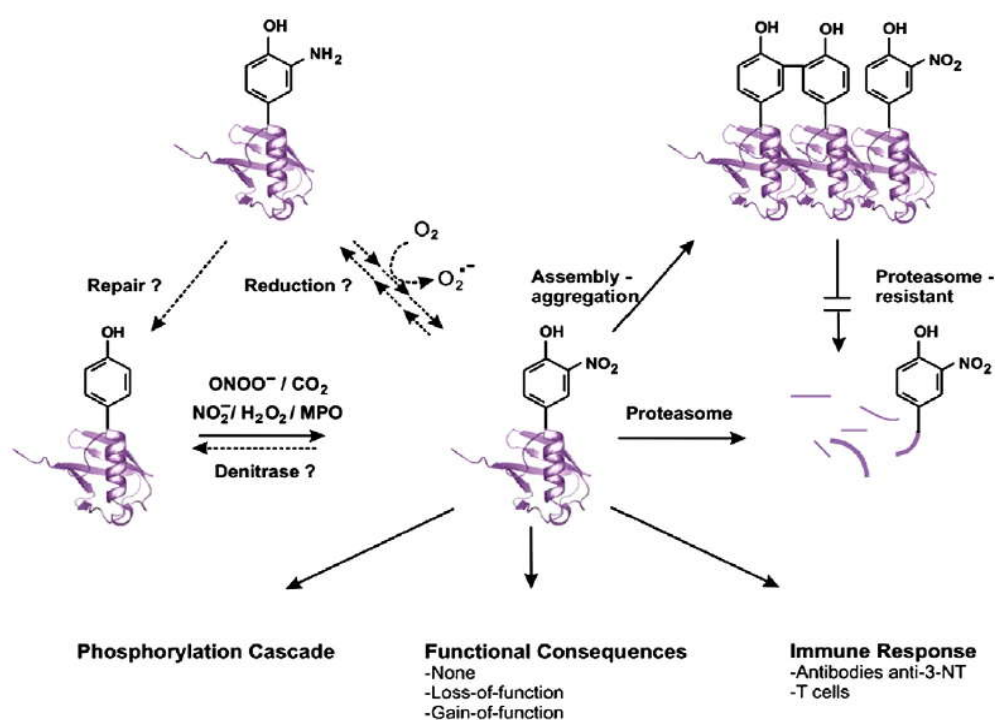


Figura I.6: Consequências da nitração de tirosinas nas proteínas que conduzem à formação de 3-nitrotirosinas. A nitração de tirosinas nas proteínas apresenta três principais efeitos: pode afectar as funções das proteínas; modular as cascatas de fosforilação e pode induzir a resposta imunológica. Normalmente as proteínas nitradas são reconhecidas pelo proteassoma que consecutivamente as degrada. Contudo, a formação de 3-NT ou de ditirosinas pode promover a agregação das proteínas, o que as torna “fracos” substratos para o proteassoma. Isto resulta numa resistência à degradação destes aglomerados por parte do proteassoma, que posteriormente acabam por se acumular como amilóides intra- ou extra-celulares. O possível metabolismo das proteínas nitradas, incluindo agentes redutores biológicos ou por acção de uma desnitrase, ainda não são conhecidos nem existem evidências sólidas acerca da sua existência. Ainda assim, caso existam e após a sua reversão, existem ROS e RNS prontamente a reagirem de modo a formarem novamente 3-NT [Souza et al, 2008].

A níveis funcionais, a nitração de tirosinas nas proteínas apresenta três principais efeitos: 1) nenhuma alteração da função da proteína nitrada; 2) inibição da actividade da proteína nitrada e 3) estimulação da actividade da proteína nitrada [Souza et al, 2008]. Relativamente ao primeiro ponto existem pouquíssimas situações onde se verifica que a nitração de tirosinas não altera a função das proteínas. A título de exemplo, a função das proteínas α 1-antitripsina e a transferrina não são significativamente alteradas pela nitração de tirosinas, tanto *in vivo* como *in vitro* [Gole et al, 2000]. No entanto, o ganho ou perda de função das proteínas por nitração de tirosinas encontra-se extensivamente reportado, sendo apresentado na **Tabela I.1** vários exemplos do efeito da nitração de tirosinas na função de diversas proteínas.

Tabela I.1: Efeito da nitração de tirosinas nas proteínas e respectiva alteração da sua função.

Proteína	Efeito da nitração de tirosinas a nível funcional	Referência
Citocromo c	Aumento de actividade	Cassina et al, 2000; Batthyany et al, 2005
Citocromo P450 2B1	Perda de actividade	Roberts et al, 1998
Creatina cinase	Perda de actividade	Mihm et al, 2001 a; Mihm e Bauer, 2002
Glicogénio fosforilase	Perda de actividade	Dairou e tal, 2007
Glutamina sintetase	Perda de actividade	Berlett et al, 1998
Glutaciona reductase	Perda de actividade	Francescutti et al, 1996
Glutaciona-S-transferase	Aumento de actividade	Ji et al, 2006
Ornitina descarboxilase	Perda de actividade	Seidel et al, 2001
Prostaciclina sintetase	Perda de actividade	Zou et al, 1997; Schmidt et al, 2003
Prostaglandina endoperoxidase H sintetase	Perda de actividade	Goodwin et al, 1998; Trostchansky et al, 2007
Proteína cinase C ϵ	Aumento de actividade	Balafanova et al, 2002
Ribonucleótido reductase	Perda de actividade	Guittet et al, 1998
Superóxido dismutase (Mn-SOD)	Perda de actividade	MacMillan-Crow et al, 1996, 1998; Yamakura et al, 1998; Demicheli et al, 2007
Tirosina hidroxilase	Perda de actividade	Ara et al, 1998; Blanchard-Fillion et al, 2001

De facto, é de referir que na maioria dos estudos reportados, a nitração de tirosinas resulta na inibição das actividades das proteínas. Isto tem levado à hipótese de que a formação de 3-NT, para além de ser um biomarcador, também se apresenta conjugada com os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de doenças [Ischiropoulos, 2003; Schopfer et al, 2003; Souza et al, 2008].

I.1.3.1.2.2 – Doenças associadas ao peroxinitrito

Normalmente *in vivo* são detectados baixos níveis de 3-nitrotirosinas em proteínas, o que significa que em condições basais existe uma produção limitada de ONOO⁻. No entanto, em estados patofisiológicos, ou seja, em situações de desenvolvimento de doenças associadas ao stresse nitrosativo ocorre um aumento significativo de formação de 3-NT [Souza et al, 2008]. De facto, nestas situações foram detectados elevados níveis de 3-NT em diversas condições, incluindo o envelhecimento, doenças cardiovasculares, distúrbios neurodegenerativos, entre muitas outras, uma vez que se encontra identificada a nitração de tirosinas em pelo menos 50 doenças humanas e em mais de 80 condições de modelos animais [Greenacre e Ischiropoulos, 2001; Szabó et al, 2007; Turko e Murad, 2002]. Na **Tabela I.2** encontram-se descritas algumas doenças em vários órgãos ou regiões do corpo humano, nas quais foram detectadas a formação de 3-NT.

Tabela I.2: Patologias associadas ao ONOO⁻ em diferentes regiões do corpo humano, nas quais foram detectadas a formação de 3-nitrotirosinas.

Órgão / Região do corpo humano	Patologia	Referência
Articulações	Artrite reumatóide	Greenacre e Ischiropoulos, 2001
Coração	Inflamação cardiovascular, Isquémia-reperusão, Trombose/Enfarte do miocárdio, Fibrilação atrial, Cardiomiopatias, Hipertensão, Aterosclerose, Rejeição no transplante de coração	Turko e Murad, 2002; Greenacre e Ischiropoulos, 2001; Mihm et al, 2001b; Mihm et al, 2003; Kooy et al, 1997
Cérebro e sistema nervoso	Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson, Esclerose múltipla, AVC	Greenacre e Ischiropoulos, 2001; Reynolds e tal, 2007
Pulmões	Asma; Fibrose pulmonar; Pneumonia	Greenacre e Ischiropoulos, 2001
Tracto gastrointestinal	Diabetes; Úlceras; Danos hepáticos	Turko e Murad, 2002; Greenacre e Ischiropoulos, 2001
Corpo em geral	Envelhecimento acelerado; Cancro	Turko e Murad, 2002 ; Kanski, et al, 2005a, 2005b; Greenacre e Ischiropoulos, 2001

I.2 – Sistema muscular

Nos seres vivos embora existam vários tipos de músculos, a actividade contráctil depende sempre da interacção entre dois tipos de filamentos citoplasmáticos que se interpenetram, sendo estes os filamentos grossos (constituídos por miosina) e os filamentos finos (constituídos por actina) [Azevedo, 2005].

I.2.1 – Miosina

Actualmente, o termo miosina é aplicado a uma variada superfamília de motores moleculares, tendo como particular característica a capacidade de se ligar reversivelmente à actina e de hidrolisar ATP, ocorrendo neste fenómeno a conversão de energia química em energia mecânica. Esta superfamília de proteínas é constituída, pelo menos, por 15 classes distintas, sendo a miosina do tipo II uma das classes mais bem estudadas e existe tanto em células musculares como em células não musculares. Todos os tipos de miosina que foram purificados apresentam em comum três domínios estruturais e funcionalmente diferentes: a cabeça, o pescoço e a cauda [Sellers, 1999].

A miosina do tipo II (miosina II) é uma molécula relativamente grande (470 kDa), e composta por seis cadeias polipeptídicas altamente conservadas: duas cadeias pesadas (HC) com aproximadamente 200 kDa e dois pares de cadeias leves diferentes, as cadeias leves essenciais (ELC) e regulatórias (RLC), com massa molecular compreendida aproximadamente entre 15 a 20 kDa [Lodish et al, 2001; Voet e Voet, 1995]. A sequência N-terminal da cadeia pesada de miosina forma uma zona globular, sendo esta correspondente ao domínio da cabeça. Esta região contém os locais de ligação à actina e ao ATP e é o domínio responsável pela produção de força. Na extremidade C-terminal encontra-se as zonas filamentosas da cadeia pesada de miosina, enroladas entre si numa estrutura em “coiled coil” de hélice- α , formando o domínio da cauda. Entre a região globular da cabeça e da extensa cauda da miosina encontram-se ambas as cadeias leves, que constituem o domínio do pescoço. Este domínio é responsável pela regulação da actividade desempenhada pelo domínio da cabeça [Lodish et al, 2001; Sellers, 1999].

A miosina II pode ser clivada em diferentes fragmentos funcionais por proteólise controlada. Um local típico de clivagem situa-se a 130 kDa da extremidade N-terminal e produz dois fragmentos: a meromiosina pesada (HMM) e a meromiosina leve (LMM), que podem ser separados através de diálise sob condições de baixa força iónica. Nestas condições, a HMM apresenta solubilidade e é formada por duas regiões globulares e pelo pescoço, sendo capaz de se ligar à actina e de hidrolisar ATP, manifestando assim actividade enzimática. Por outro lado, a LMM retém apenas as características de solubilidade da miosina intacta formando agregados. O fragmento HMM pode ainda ser clivado por proteólise originando o subfragmento-1 (S1) e o subfragmento-2 (S2) de miosina (**Figura I.7A**) [Sellers, 1999].

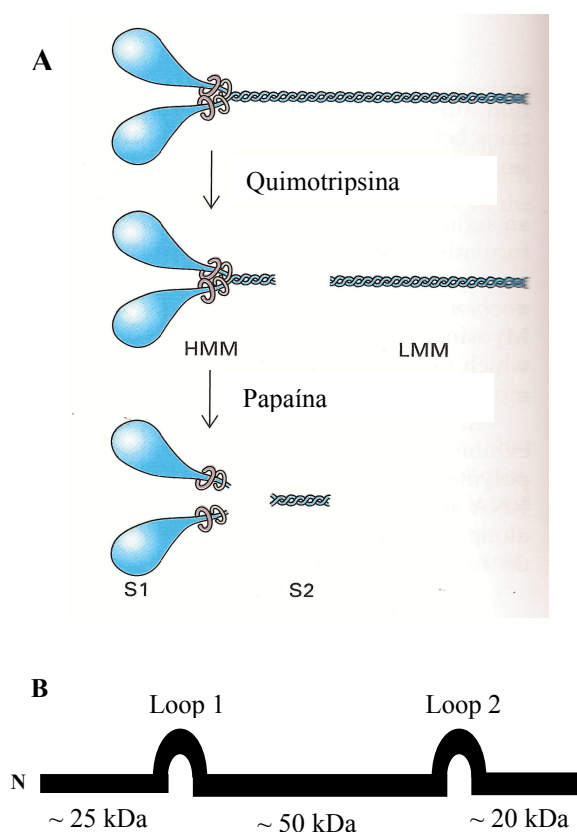


Figura I.7: (A): Clivagem proteolítica da molécula de miosina II. A quimotripsina quebra a molécula de miosina na sua zona flexível, ou seja, na região da cauda e produz dois fragmentos: a meromiosina pesada (HMM) e a meromiosina leve (LMM). Posteriormente, a digestão da HMM com papaína origina os subfragmentos: S1 e S2 [Adaptado de Lodish et al, 2001]. (B): Esquema ilustrativo dos locais do S1 susceptíveis a proteólise. Um destes locais encontra-se aproximadamente a 25 kDa (Loop 1) da extremidade N-terminal, e o outro situa-se aproximadamente a 75 kDa (Loop 2) da extremidade N-terminal. A digestão proteolítica do S1 resulta assim na formação de três fragmentos proteolíticos: um domínio com 25 kDa, um domínio com 50 kDa e um último domínio com 20 kDa [Adaptado de Sellers, 1999].

O subfragmento-1 de miosina (110 kDa) é constituído pelo domínio da cabeça, encontrando-se associado a ambos os pares de cadeias leves ou apenas às cadeias leves essenciais, dependendo das condições de clivagem. É importante referir, que este subfragmento mantém as propriedades moleculares iniciais da miosina, ou seja, é enzimaticamente activo e possui os locais de ligação à actina e ao ATP, apresentado ainda a vantagem de ser solúvel em soluções aquosas [Sellers, 1999]. Adicionalmente, o S1 demonstra ainda dois locais sensíveis a proteólise, sendo o primeiro localizado aproximadamente a 25 kDa (Loop1) e o segundo a 75 kDa (Loop 2) da extremidade N-terminal (**Figura I.7B**). A sua subsequente clivagem resulta na formação de três fragmentos: um domínio N-terminal de 25 kDa com capacidade para se ligar a nucleótidos (ATP e ADP); um domínio central de 50 kDa onde se liga a actina; e um domínio C-terminal de 20 kDa (**Figura I.8**) [Geeves e Holmes, 1999; Rayment, 1996; Sellers, 1999].

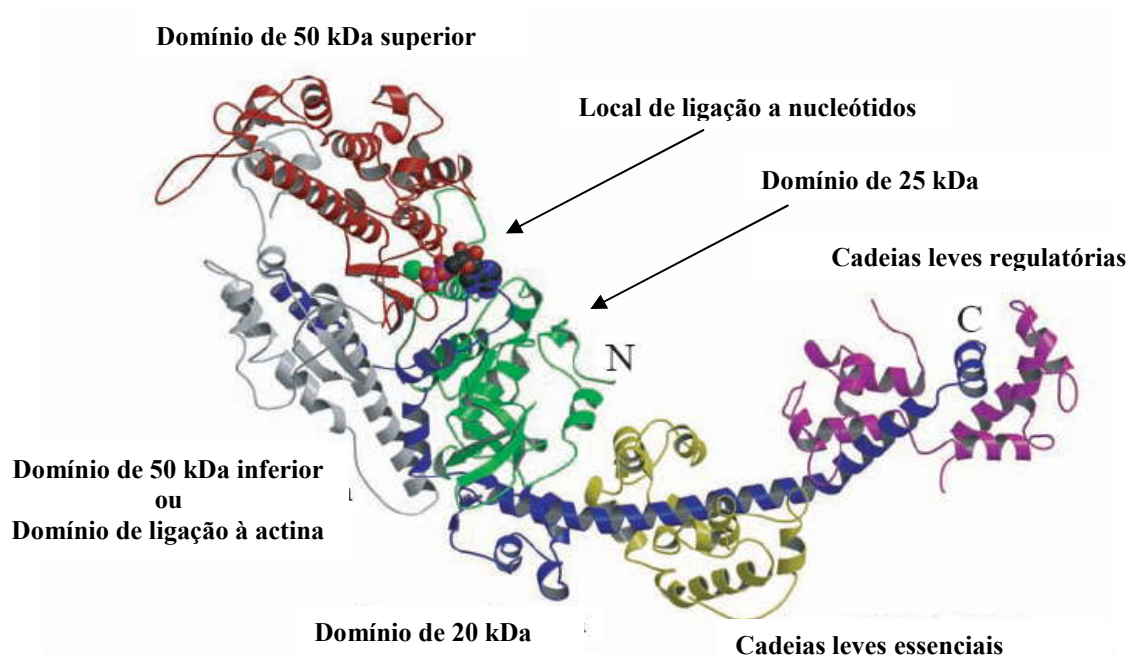


Figura I.8: Estrutura do subfragmento-1 de miosina. Os domínios do S1 encontram-se evidenciados por código de cores: N-terminal de 25 kDa (verde); central de 50 kDa (vermelho e cinzento) e C-terminal de 20 kDa (azul). O local de ligação a nucleótidos encontra-se no domínio de 25 kDa (verde) representado por esferas pretas e vermelhas. O domínio de 50 kDa encontra-se destacado por duas cores, correspondentes ao domínio superior (vermelho) e o domínio inferior (cinzento), também designado por domínio de ligação à actina. As cadeias leves essenciais também são apresentadas em sistema de cor: cadeias leves essenciais (amarelo) e cadeias leves regulatórias (roxo) [Adaptado de Geeves e Holmes, 1999].

I.2.2 – Actina

A actina é a segunda proteína mais abundante do sistema muscular, apresentando-se na sua forma monomérica (G-actina ou actina globular) com 42 kDa em condições de baixa força iónica. *In vitro*, as moléculas de G-actina polimerizam originando a actina na forma filamentosa (F-actina), sendo este processo reversível, uma vez que é promovida a despolimerização de F-actina quando a força iónica diminui [Voet e Voet, 1995]. Os filamentos de actina consistem em duas cadeias de F-actina organizadas em hélice e sobre estes localizam-se ainda outras proteínas como a tropomiosina e as troponinas C, I e T. De facto, é de referir que *in vivo*, ou seja, nos músculos apenas existe actina na forma filamentosa, e somente a F-actina é a estrutura que adquire a capacidade funcional para estimular a actividade ATPásica da miosina [Azevedo, 2005; Voet e Voet, 1995].

I.2.3 – Mecanismo de contracção muscular

A contracção muscular ocorre quando a miosina interage com a actina formando pontes cruzadas, fazendo com que os filamentos finos deslizem sobre os filamentos grossos, induzindo

assim o movimento através da energia resultante da hidrólise do ATP. A hidrólise de ATP pelo complexo actina-miosina (actomiosina), no mecanismo de contracção muscular, pode ser resumido num ciclo constituído por seis passos importantes: 1) o ATP liga-se à cabeça de miosina (S1) provocando a destabilização da interacção actina-miosina, o que resulta na libertação da actina ligada; 2) o centro activo da miosina fecha-se e ocorre a hidrólise do ATP, levando a uma alteração conformacional da proteína para um estado de maior energia, que move a cabeça de miosina e altera a sua orientação em relação ao filamento fino; 3) o S1 forma uma ligação fraca com um monómero de actina, mais próxima do disco Z; 4) o fosfato inorgânico (P_i) que resultou da hidrólise do ATP é libertado do S1, provocando um aumento na afinidade do S1 para se ligar à actina; 5) ocorre a geração de força (*power stroke*) durante a qual a conformação do S1 regressa ao estado de repouso original, a sua orientação muda em relação à actina ligada de modo a puxar o S1 na direcção do disco Z; 6) o ADP é libertado, concluindo assim um ciclo (Figura I.9) [Voet e Voet, 1995].

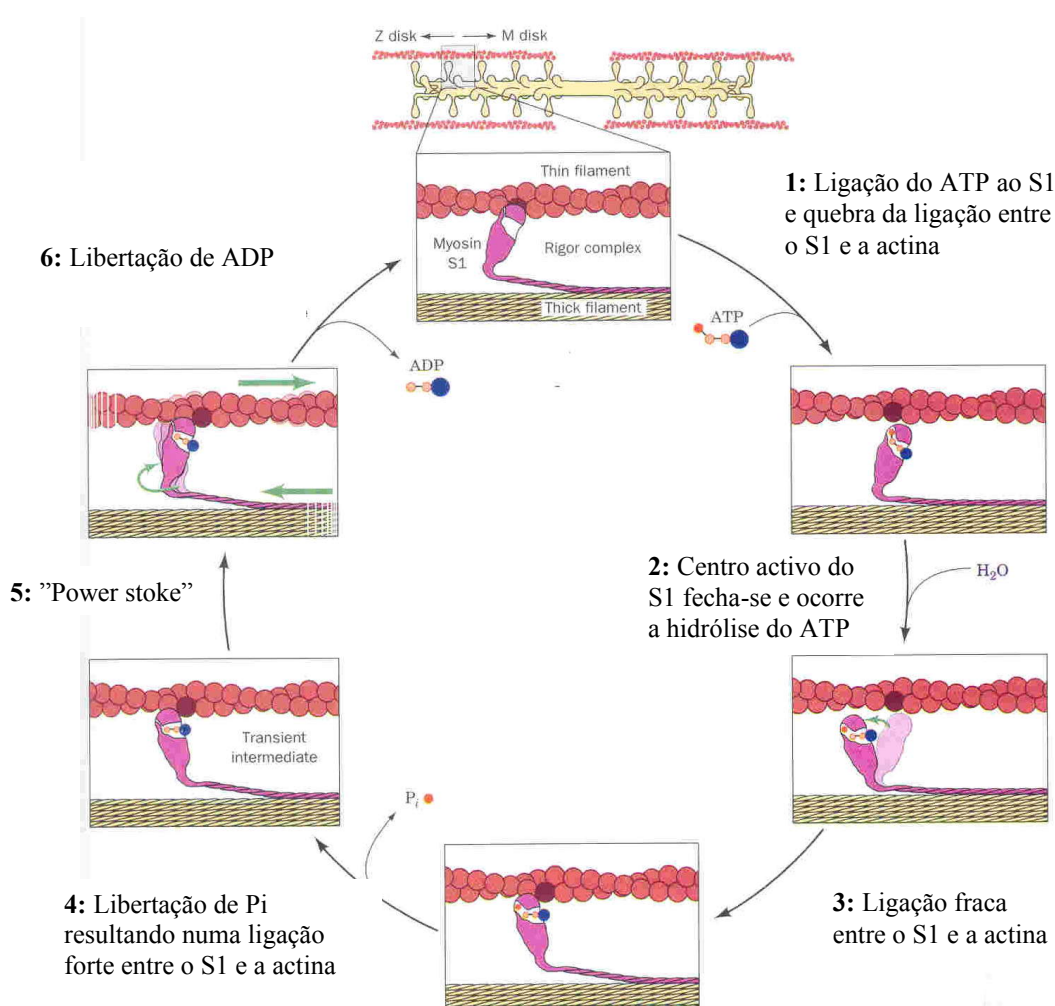


Figura I.9: Esquema ilustrativo do mecanismo da contracção muscular realizado pelo complexo actomiosina. A cabeça de miosina desliza sobre os filamentos finos de actina, sendo este processo assistido pela hidrólise de ATP [Adaptado de Voet e Voet, 1995].

I.3 – Stresse oxidativo e nitrosativo na miosina

O tecido muscular apresenta grande susceptibilidade aos danos oxidativos, devido à capacidade singular do músculo sofrer alterações rápidas no fornecimento de energia e fluxo de oxigénio durante a actividade contráctil [Jackson e O'Farrell, 1993]. Para além disso, a regeneração das proteínas musculares é relativamente lenta em comparação com outras proteínas [Waterlow et al, 1976], o que as torna potencialmente mais susceptíveis à acumulação de danos oxidativos. Actualmente, encontra-se descrito que as ROS e RNS promovem disfunções contrácteis, como consequência da modificação de proteínas miofibrilares [Canton et al, 2004; Dunn et al, 1991; Mihm et al, 2001b]. Adicionalmente, encontra-se também descrito que o ONOO⁻ possui uma elevada afinidade para nitrar os resíduos de tirosina nas proteínas [Beckman e Koppenol, 1996]. Estudos realizados nos últimos anos sugerem que o ONOO⁻ pode ser responsável, pelo menos em parte, pelas disfunções dos músculos esqueléticos e cardíacos que se observam em algumas condições patofisiológicas referenciadas na **Tabela I.2**, tais como fibrilação atrial [Mihm et al, 2001b, 2003; Kooy et al, 1997] e durante o envelhecimento [Kansky et al, 2005a, 2005b; Hong et al, 2007], tendo sido verificado que a miosina é uma das proteínas musculares que apresenta níveis elevados de 3-NT.

I.4 – Hipótese de trabalho

Recentemente, foi demonstrado por Tiago et al [2006a], que a exposição do S1 ao ONOO⁻ promove a oxidação das cisteínas altamente reactivas resultando na inibição da actividade fisiológica desta proteína. No entanto, visto que *in vivo* a oxidação das cisteínas pode ser revertida através da acção de sistemas biológicos específicos, como por exemplo a glutathiona reductase e a tioredoxina-reductase, é pertinente o esclarecimento do envolvimento da nitração de tirosinas na actividade ATPásica da miosina. É de lembrar, que a formação de 3-NT nas proteínas para além de ser um biomarcador dos danos causados *in vivo* por ONOO⁻, é uma modificação química bastante estável e considerada como irreversível, uma vez que actualmente não existem evidências sólidas acerca de um sistema metabólico capaz de reverter esta modificação.

I.4.1 – Objectivo

O presente estudo tem por objectivo responder à seguinte pergunta: nitração de tirosinas na miosina, será que tem consequências funcionais, ou será apenas um biomarcador associado ao stresse nitrosativo? Nesse sentido, serão determinadas *in vitro* as consequências funcionais da nitração de tirosinas na miosina de músculo esquelético de coelho, promovida por uma exposição aguda ao peroxinitrito sintético. Primeiramente serão optimizadas as condições de nitração testando várias condições, nomeadamente diferentes soluções tampão nas quais serão realizadas a exposição do S1 a diversas concentrações de ONOO⁻, e determinadas as alterações funcionais bem como as modificações moleculares do S1. Após optimizadas as condições de nitração serão também realizados estudos de reversibilidade, assim como se investigará o efeito dos ligandos naturais da miosina na nitração de tirosinas do S1.

II – MATERIAIS E MÉTODOS

II.1 – Material

II.1.1 – Material biológico

A realização deste trabalho envolveu a utilização das principais proteínas musculares, miosina e actina. Nesse sentido, estas proteínas foram obtidas a partir de músculo esquelético de coelhos domésticos jovens com cerca de 2 kg (**Figura II.1**).



Figura II.1: Coelho doméstico jovem utilizado para obtenção de proteínas musculares.

II.1.2 – Reagentes

Os reagentes utilizados ao longo das actividades experimentais, assim como a respectiva empresa que os comercializa e o seu grau de pureza encontram-se referidos no **Anexo B: Quadro B.1**.

II.1.3 – Equipamento

Os equipamentos utilizados durante este trabalho experimental, tal como a correspondente marca e modelo encontram-se apresentados no **Anexo C: Quadro C.1**, com excepção dos materiais vulgarmente utilizados em laboratórios de química e bioquímica.

II.2 – Isolamento e purificação de proteínas musculares

As proteínas apresentam na sua superfície diferentes resíduos de aminoácidos que contribuem para diferentes níveis de solvatação pelas moléculas de água. A solubilidade duma proteína numa solução depende da concentração de sal presente, da polaridade do solvente, do valor do pH e da temperatura. Uma vez que o efeito de qualquer um destes factores varia de proteína para proteína, a manipulação destes é bastante vantajosa e utilizada durante os processos de purificação de proteínas, com o intuito de precipitar a proteína de interesse ou as proteínas contaminantes [Quintas et al, 2008; Voet e Voet, 1995]. Os procedimentos utilizados para o isolamento e purificação das proteínas musculares baseiam-se essencialmente nas diferenças de solubilidade destas proteínas em soluções aquosas, tratando-se basicamente de um “jogo” de força iónica do meio envolvente. Numa

solução com força iónica baixa, a solubilidade de uma proteína aumenta com o aumento da concentração de sais (*salting in*), enquanto que para forças iónicas drasticamente elevadas, a proteína precipita (*salting out*) (Figura II.2). Este fenómeno acontece, uma vez que as proteínas em solução comportam-se como poliões. Para forças iónicas relativamente baixas, a superfície da molécula encontra-se melhor solvatada e os resíduos hidrófobos não são afectados pela concentração de sal, ocorrendo preferencialmente interacções proteína-solvente que resultam consequentemente no aumento da solubilidade da proteína. Contrariamente, para forças iónicas elevadas ocorre competição entre as moléculas de proteínas e os iões de sal pelas moléculas de solvente. Isto leva a que os resíduos hidrófobos deixem de estar solvatados, passando a ocorrer interacções proteína-proteína entre as regiões hidrófobas, sendo estas energeticamente mais favoráveis do que as interacções proteína-solvente, conduzindo assim a uma diminuição da solubilidade da proteína [Quintas et al, 2008; Voet e Voet, 1995; Walsh, 2002].

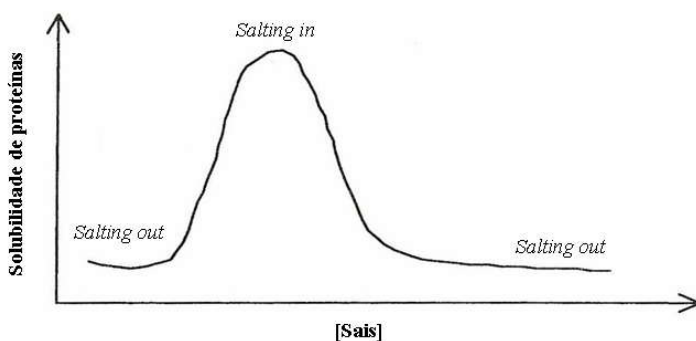


Figura II.2: Efeito da concentração de sais na solubilidade de proteínas. Para concentração de sais nulas ou baixíssimas as proteínas possuem pouca solubilidade e precipitam (*salting out*). No entanto, o aumento da concentração de sais até determinado valor, ainda que a força iónica seja relativamente baixa, proporciona o aumento da solubilidade de uma proteína (*salting in*). Porém, concentrações de sais acima do valor óptimo de solubilidade resultam na destabilização das proteínas e consequentemente na sua precipitação (*salting out*) [Adaptado de Walsh, 2002].

Na extracção e nos diferentes passos do processo de purificação, a composição do meio é alterada e os factores estabilizadores são diluídos ou removidos, resultando numa maior susceptibilidade das proteínas sofrerem desnaturação ou proteólise. De modo a minimizar estes problemas durante o isolamento e purificação das proteínas musculares utilizaram-se soluções tamponizadas a pH e força iónica adequada às proteínas de interesse, sendo todas as soluções feitas com H₂O miliQ (água destilada, esterilizada e filtrada por um sistema miliporo, com condutividade electrolítica 0,054 μ S e pH \approx 6,5-7,0 a 25 °C) e os valores desejados de pH ajustados à temperatura ambiente. Todos os procedimentos envolvidos neste trabalho foram realizados a 4 °C, tendo-se também o cuidado de refrigerar previamente todas as soluções e material à mesma temperatura, sempre que assim era necessário. Adicionalmente, durante estes procedimentos, também se

suplementou as soluções com agentes redutores, como o β -mercaptoetanol (β -mer), de modo a garantir a redução dos grupos $-SH$, uma vez que estes são necessários à estabilidade e actividade biológica das proteínas.

II.2.1 – Isolamento e purificação de miosina

O isolamento e purificação de miosina a partir de músculo esquelético de coelho foi executado consoante o método previamente descrito por Margossian e Lowey [1982], tendo sido introduzidas algumas alterações.

O animal é primeiramente sacrificado com uma pancada rápida e forte atrás do pescoço e imediatamente sangrado por corte da artéria jugular, sendo posteriormente esfolado e colocado numa tina com gelo. Com o auxílio de uma pinça e de um bisturi, retiraram-se as partes de tecido conjuntivo que envolve o tecido muscular e, recolheram-se para um copo aproximadamente 200 g de músculos dorsais e das pernas (Figura II.3), sendo estes lavados com H_2O destilada de forma a remover quaisquer impurezas. Os músculos foram pesados e triturados, efectuando-se de seguida a extracção em 3 volumes de solução A (0,012 M K_2CO_3 ; 0,04 M $KHCO_3$; 0,6 M KCl , pH 6,5 e 10 mM β -mer), mexendo-se lentamente durante 15 minutos (É importante não exceder este tempo de modo a minimizar a

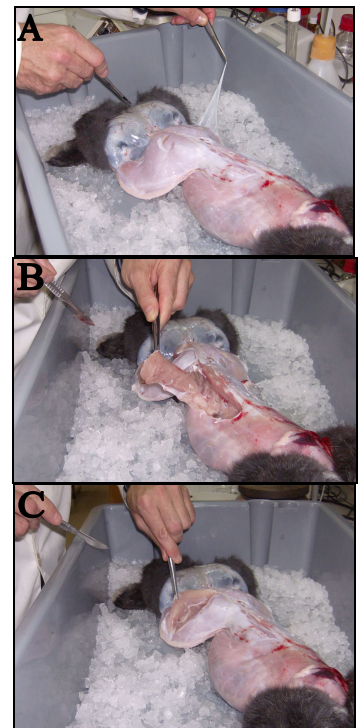


Figura II.3: Remoção de tecidos, conjuntivo (A) e musculares dorsais (B) e das pernas (C) num coelho.

extracção de actina). Após o tempo de extracção, centrifugou-se a suspensão de músculo a 2000xg durante 20 minutos e filtrou-se o sobrenadante em lâ de vidro (para remover os componentes lipídicos que se encontram em suspensão) para uma proveta, registando-se o respectivo volume. De seguida, diluiu-se a solução filtrada em 14 volumes de H_2O destilada previamente refrigerada de modo a baixar a força iónica para 0,04 M. Verificou-se se o pH se encontrava entre 6-7 com papel indicador de pH e adicionou-se 10 mM de β -mer. Deixou-se a miosina precipitar aproximadamente durante 4 horas e removeu-se o sobrenadante com o auxílio de uma bomba de vácuo (Figura II.4). Concentrou-se o precipitado obtido anteriormente realizando-se uma centrifugação a 2000xg durante 15 minutos. Cuidadosamente decantou-se o sobrenadante e

ressuspendeu-se o precipitado na solução A (cerca de 1 mL por tubo), mediu-se o volume numa proveta e adicionou-se solução B (100 mM Tris e 2 M KCl, pH 7,0) de modo a elevar a força iónica a 0,6 M e, por fim, homogeneizou-se lentamente a solução no potter (Figura II.5). Reduziu-se novamente a força iónica para 0,04 M por adição lenta de H₂O destilada e refrigerada, confirmou-se se o pH se encontrava entre 6-7 e adicionou-se 10 mM de β -mer, deixando a proteína precipitar durante a noite.



Figura II.4: Precipitação da miosina após 4 horas e remoção do sobrenadante com o auxílio de uma bomba de vácuo.



Figura II.5: Homogeneização lenta da solução de miosina no potter.

Após a precipitação da miosina durante a noite, removeu-se o sobrenadante com o auxílio da bomba de vácuo e concentrou-se o precipitado centrifugando este a 2000xg durante 20 minutos. Desprezou-se o sobrenadante com cuidado e ressuspendeu-se o precipitado na solução B. De seguida, mediu-se o volume numa proveta e adicionou-se solução B até se obter uma força iónica de 0,6 M. Homogeneizou-se lentamente a suspensão obtida no potter e deixou-se esta repousar cerca de 2 horas, sendo depois novamente homogeneizada no potter. Ultracentrifugou-se a suspensão a 110000xg durante 60 minutos, e filtrou-se o sobrenadante em lã de vidro para uma proveta na qual se mediu o volume obtido. O precipitado de coloração escura foi desprezado uma vez que se trata de complexos de actomiosina e proteína desnaturada (Figura II.6).



Figura II.6: Suspensão obtida após a ultracentrifugação a 110000xg durante 60 minutos, sendo possível visualizar, na parte superior do tubo, os componentes lipídicos em suspensão e, na parte inferior do tubo, o precipitado de coloração escura correspondente a complexos de actomiosina e proteína desnaturada.

II.2.1.1 – Preparação do subfragmento-1 de miosina por digestão quimotriptica

A elevada massa molecular da miosina (470 kDa) e a sua insolubilidade conferida pela região da “cauda” levaram os investigadores a optar por fragmentos proteolíticos que retenham as propriedades moleculares iniciais da miosina, e que facilitem tanto as análises físico-químicas como enzimáticas [Margossian e Lowey, 1982]. Um dos fragmentos proteolíticos da miosina designa-se por subfragmento-1 de miosina (S1), sendo este possível de obter através de digestão controlada, e apresenta as vantagens de ser solúvel em água e ser enzimaticamente activo [Sellers, 1999]. Portanto, ao longo deste trabalho foi sempre utilizado o S1, sendo este obtido no seguimento do procedimento anterior previamente descrito por Margossian e Lowey [1982], tendo sido introduzidas algumas alterações.

Primeiramente, preparou-se a membrana de diálise, lavando esta com água corrente durante 3-4 horas de modo a remover a glicerina. Efectuou-se a remoção dos compostos sulfúricos tratando a membrana com uma solução de 0,3 % (m/v) de sulfito de sódio a 80 °C durante 1 minuto e lavou-se de imediato com H₂O destilada a 60 °C durante 2 minutos. Procedeu-se à acidificação da membrana de diálise colocando esta numa solução de 0,2 % (v/v) de ácido sulfúrico a 60 °C, sendo posteriormente lavada de novo com H₂O destilada a 60 °C. Transferiu-se a solução de miosina obtida anteriormente para a membrana de diálise previamente tratada e dialisou-se contra a solução C (25 mM Tris; 0,12 M KCl e 1 mM EDTA, pH 7,0) durante a noite e com agitação suave (Figura II.7). (A inclusão de EDTA é essencial, uma vez que a substituição de EDTA por MgCl₂ resulta na produção da HMM em vez do S1).



Figura II.7: Diálise da solução de miosina contra a solução C durante a noite, com agitação suave.

No dia seguinte após a diálise, quantificou-se a proteína obtida pelo método de Bradford (ver ponto II.3.1, da presente secção), de forma a prever-se a quantidade de α -quimotripsina necessária para a digestão. Equilibrou-se a suspensão de miosina à temperatura ambiente e digeriu-se esta com uma solução de α -quimotripsina (0,05 % (m/v) de α -quimotripsina em 0,001 M de HCl), na proporção 0,3 mg/mL de α -quimotripsina para 20 mg/mL de miosina, durante 45 minutos, tendo-se o cuidado de agitar a solução de miosina enquanto se adicionava a solução de α -quimotripsina, de modo a evitar a precipitação local e desnaturação da miosina pela solução ácida. Interrompeu-se a

digestão da miosina por adição de 0,2 mM PMSF (0,1 M PMSF em 70 % (v/v) de etanol), tendo-se também o cuidado de agitar a solução de miosina de forma a evitar a precipitação da proteína pelo etanol. De seguida, ultracentrifugou-se a solução obtida anteriormente a 110000xg durante 60 minutos, de modo a separar os produtos insolúveis da digestão do S1 (**Figura II.8**). O sobrenadante obtido correspondente ao S1 foi cuidadosamente filtrado em lã de vidro para uma proveta na qual se mediu o respectivo volume e, posteriormente, quantificado pelo método de Bradford (ver ponto II.3.1, da presente secção) ou por medição da absorvência a 280 nm ($\epsilon = 7,5 \text{ cm}^{-1}$), enquanto o precipitado foi desprezado.

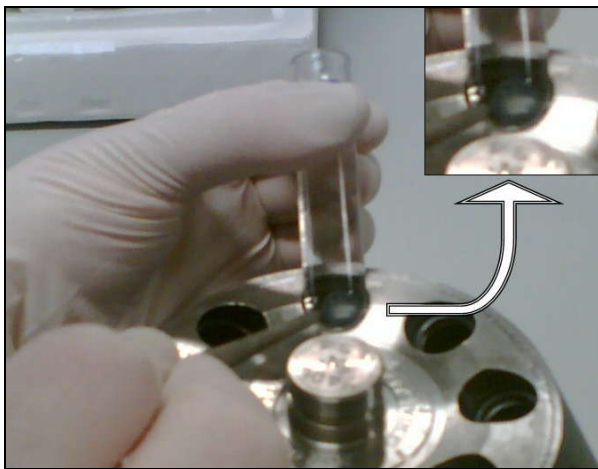


Figura II.8: Separação dos produtos insolúveis da digestão da solução de miosina, após ultracentrifugação a 110000xg durante 60 minutos. O sobrenadante trata-se maioritariamente do S1 e o precipitado, que se encontra ampliado à direita, corresponde efectivamente aos produtos insolúveis da digestão.

Por fim, à solução de S1 adicionou-se 10 % (m/v) de sacarose e 2 mM de β -mer, dividiu-se esta solução em alíquotas e congelou-se rapidamente em azoto líquido, sendo posteriormente as alíquotas colocadas a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

II.2.2 – Isolamento e purificação de actina

O isolamento e purificação de actina a partir de músculo esquelético de coelho foi realizado de acordo com o método anteriormente descrito por Pardee e Spudich [1982]. Este procedimento inclui duas fases, primeiramente obtém-se um resíduo seco denominado por “pó de acetona” e, em seguida, a partir deste resíduo seco é possível extrair actina na sua forma monomérica (G-actina), que posteriormente pode ser promovida a polimerização desta para originar actina na forma filamentosa (F-actina).

II.2.2.1 – Preparação do “pó de acetona” a partir de músculo esquelético de coelho

O músculo esquelético de coelho foi obtido tal como se descreve anteriormente para o isolamento e purificação de miosina, sendo posteriormente pesado, triturado e extraído em 3 volumes de solução D (0,1 M KCl e 0,15 M K_2HPO_4 , pH 6,5) mexendo lentamente durante 10 minutos. De seguida, centrifugou-se a suspensão a 4000xg durante 10 minutos e desprezou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o precipitado em 6 volumes de solução E (0,05 M $NaHCO_3$, pH 8,2-8,5) mexendo-se lentamente durante 10 minutos e, certificou-se se o pH se encontrava aproximadamente entre 8,2-8,5 com papel indicador de pH, acertando-se caso necessário, com solução F (1 M Na_2CO_3). (Nesta etapa teve-se o cuidado de controlar rigorosamente o tempo de extracção, pelo facto de extracções muito longas resultarem numa perda considerável de activa). Centrifugou-se a 4000xg durante 10 minutos e desprezou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o sedimento em 3 volumes de solução G (1 mM EDTA, pH 7,0) durante 10 minutos e centrifugou-se novamente a 4000xg durante 10 minutos. Seguidamente, decantou-se o sobrenadante, enquanto o precipitado foi ressuspendido 2 vezes consecutivas com 6 volumes de H_2O destilada previamente refrigerada durante 5 minutos, tendo-se posteriormente centrifugado a 4000xg durante 10 minutos e desprezado o sobrenadante. O precipitado foi ressuspendido 5 vezes sucessivas com 3 volumes de acetona pura, agitando-se suavemente durante 10 minutos à temperatura ambiente (Figura II.9) e, posteriormente, no final de cada extracção o músculo obtido foi filtrado em gaze esterilizada. Colocou-se o resíduo filtrado, proveniente da última extracção com acetona pura, numa tina com o fundo revestido com papel de filtro e deixou-se a evaporar na hotte durante a noite. No dia seguinte triturou-se o resíduo seco e deixou-se secar mais algumas horas. Por fim, este resíduo seco conhecido vulgarmente por “pó de acetona” foi armazenado num frasco bem fechado a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.



Figura II.9: Extracção do precipitado com 3 volumes de acetona pura, com agitação suave durante 10 minutos à temperatura ambiente.

II.2.2.2 – Obtenção de G-Actina e F-Actina a partir do “pó de acetona”

Por cada grama de “pó de acetona” adicionaram-se 20 mL de solução H (0,2 mM $CaCl_2$; 0,2 mM Na_2ATP ; 0,005 % (m/v) NaN_3 ; 2 mM Tris-HCl, pH 8,0 e 0,5 mM β -mer), sendo a extracção

efectuada com agitação lenta durante 30 minutos. Separou-se o extracto do “pó de acetona” hidratado filtrando a suspensão anterior com 4 camadas de gaze esterilizada, tendo o cuidado para não se espremer o resíduo uma vez que dificulta a próxima extração, e extraiu-se novamente o músculo com o mesmo volume de solução H, durante 30 minutos com agitação suave. Adicionaram-se os dois extractos obtidos anteriormente e centrifugou-se a 16000xg durante 30 minutos. Decantou-se cuidadosamente o sobrenadante para uma proveta, sendo este também filtrado com 4 camadas de gaze esterilizada, para que o sedimento solto não se misturasse com o sobrenadante, e registou-se o volume. De seguida, promoveu-se a polimerização dos monómeros de actina a filamentos de actina, adicionando-se com agitação suave e continua KCl até uma concentração final de 50 mM, MgCl₂ até 2 mM e ATP até 1 mM e, deixou-se polimerizar, em repouso, durante 2 horas à temperatura ambiente. (Nesta fase observa-se a formação de bolhas de ar, indicando o aumento de viscosidade, sendo uma característica da formação de F-actina). Prosseguiu-se com a remoção de tropomiosina, arrefecendo a suspensão num banho de gelo durante 15 minutos e, posteriormente, adicionou-se pouco a pouco KCl sólido até se atingir uma concentração final de 0,6 M, deixando-se a agitar suavemente durante 30 minutos. Centrifugou-se a suspensão a 110000xg durante 1 hora e desprezou-se o sobrenadante, enquanto o precipitado foi removido com o auxílio de uma espátula para o potter, no qual se ressuspendeu e se homogeneizou cuidadosamente o precipitado obtido anteriormente com 3 mL de solução H. Transferiu-se esta preparação para uma cassete de diálise e deixou-se dialisar contra 1 L de solução H com agitação contínua durante a noite. No dia seguinte, trocou-se a solução de diálise por nova solução H e deixou-se a diálise decorrer durante toda a manhã, tendo-se posteriormente, ultracentrifugado a actina dialisada a 110000xg durante 1 hora. O sobrenadante obtido correspondente à G-actina, foi cuidadosamente decantado para uma proveta na qual se mediu o respectivo volume e, posteriormente, quantificou-se esta pelo método de Bradford (ver ponto II.3.1, da presente secção) ou por medição da absorvência a 290 nm ($\epsilon = 0,62 \text{ mL/mg.cm}$), enquanto o precipitado foi desprezado. Por fim, à solução anteriormente obtida adicionou-se 2 mg de sacarose por cada mg de G-actina, 0,005 % (m/v) NaN₃ e 0,5 mM de β -mer, dividiu-se esta solução em alíquotas e congelou-se rapidamente em azoto líquido, sendo posteriormente sendo posteriormente as alíquotas colocadas a -80 °C.

A obtenção de F-actina a partir de G-actina foi conseguida através da sua polimerização, tendo-se adicionado KCl até uma concentração final de 50 mM, MgCl₂ até 1 mM e ATP até 1 mM, deixando-se polimerizar no mínimo 4 horas à temperatura ambiente ou durante a noite a 4 °C. A F-actina assim obtida pode ser armazenada a 4 °C, e por ser bastante estável pode permanecer seguramente nestas condições até 3 semanas.

II.3 – Caracterização das proteínas musculares isoladas

Tanto a determinação da concentração de proteínas como a análise do seu estado de pureza são frequentemente necessárias durante os estudos experimentais, pelo facto de serem fundamentais para se averiguar se as proteínas possuem qualidade adequada à realização dos estudos seguintes.

II.3.1 – Quantificação de proteínas pelo método de Bradford

Ao longo deste trabalho experimental as proteínas de interesse foram quantificadas através de um método colorimétrico, o método de Bradford, originalmente descrito pelo próprio [Bradford, 1976]. Este método utiliza o corante Coomassie Brilliant Blue (incluído no reagente de Bradford) que possui carga negativa e absorve entre 470 e 650 nm, no entanto, apresenta um máximo de absorção a 595 nm quando se encontra complexado com proteínas. As vantagens que este método apresenta são a simplicidade da técnica, a rapidez no desenvolvimento da cor da solução e a produção de um complexo estável quando este se liga a proteínas, assim como o facto de ser bastante sensível, exibindo uma sensibilidade abaixo dos 20 µg/mL. O método de Bradford também possui algumas limitações, pelo facto do corante apenas se ligar aos grupos amina dos aminoácidos básicos a pH fisiológico, como a arginina e a lisina [Halpern, 1997; Wilson e Walker, 2000].

Preparou-se inicialmente uma recta de calibração com amostras de albumina de soro bovino (BSA) com concentração conhecida ($[BSA]_{stock} = 1\text{mg/mL}$), de acordo com a **Tabela II.1**. As amostras foram homogeneizadas no vortex antes e após a adição do reagente de Bradford, deixando-se de seguida reagir em repouso durante 5 minutos à temperatura ambiente.

Tabela II.1: Reagentes e respectivas quantidades necessárias para a realização da recta de calibração do método Bradford ($[BSA]_{stock} = 1 \text{ mg/mL}$).

BSA (μg)	BSA (μL)	H ₂ O miliQ (μL)	Reagente de Bradford (μL)
0	0	600	600
2	2	598	
4	4	596	
6	6	594	
8	8	592	
10	10	590	

Após o tempo de reacção, para cada amostra, efectuou-se no espectrofotómetro a leitura dos valores da absorvência (Abs) ao comprimento de onda de 595 nm, o que permitiu traçar uma recta de calibração pela construção do gráfico da $Abs_{595\text{nm}}$ em função da quantidade (μg) de BSA.

Os ensaios para determinar a concentração de proteína foram realizados em triplicado, colocando-se num eppendorf 5 μL da solução da amostra proteica (estando diluída caso necessário), 595 μL de H₂O miliQ e 600 μL de reagente de Bradford. As amostras foram homogeneizadas no vortex antes e após a adição do reagente de Bradford, deixando-se de seguida reagir em repouso durante 5 minutos à temperatura ambiente. Registaram-se os valores da $Abs_{595\text{nm}}$ das amostras proteicas no espectrofotómetro e determinou-se a quantidade de proteína em cada amostra por interpolação a partir da recta de calibração obtida anteriormente.

II.3.2 – Análise do estado de pureza das proteínas isoladas

O estado de pureza das proteínas isoladas foi analisado por electroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) de acordo com o método de Laemmli [1970], sendo nesta técnica utilizado o detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) e as proteínas separadas de acordo com a sua massa molecular. O SDS é um detergente aniónico utilizado para desnaturar proteínas, uma vez que rompe quase todas as interacções não covalentes existentes numa proteína, destruindo assim a sua estrutura nativa, obrigando-as a assumir uma conformação linear. Para além do facto anterior, este detergente tem a particularidade de se ligar a estas moléculas na proporção de 1,4 g de SDS por grama de proteína (cerca de uma molécula de SDS por cada dois resíduos de aminoácidos na cadeia polipeptídica). Desta forma, as proteínas vão ficar revestidas por um excesso de cargas negativas que resulta na produção de uma carga total negativa à proteína desnaturada proporcional à sua carga. As proteínas assim tratadas, quando aplicadas num gel de poliacrilamida e submetidas a um

campo eléctrico migram no sentido do ânodo (pólo positivo) e, conseqüentemente, são separadas apenas consoante as suas massas moleculares (as de maiores dimensões migram menos, enquanto as menores migram mais) [Quintas et al, 2008; Voet e Voet, 1995; Wilson e Walker, 2000].

Montou-se a cassete de polimerização constituída por dois vidros, ajustando-os rigorosamente de forma a evitar-se fugas de gel, e colocou-se estes no respectivo suporte. De seguida, prepararam-se os géis de resolução e de concentração conforme descrito na **Tabela II.2**.

Tabela II.2: Reagentes e volumes necessários para a preparação dos géis de resolução e de concentração.

	Gel de resolução (12% de acrilamida)	Gel de concentração (4% de acrilamida)
Componentes	Volume (µL)	Volume (µL)
Solução concentrada de acrilamida (29,2 % (m/v) acrilamida e 0,8 % (m/v) N,N'-metil-bis-acrilamida)	2000	400
Solução tampão do gel de resolução (4x concentrado) (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)	1250	—
Solução tampão do gel de concentração (4x concentrado) (0,5 M Tris, pH 6,8)	—	750
H ₂ O destilada	1670	1830
10 % (m/v) SDS	50	30
10 % (m/v) PSA	25	15
TEMED	6,6	5

OBS: Todas as soluções foram colocadas previamente à temperatura ambiente e a solução de PSA foi preparada no próprio dia. O PSA e o TEMED foram os últimos reagentes a se adicionar na preparação dos géis, pelo facto de serem, respectivamente, o catalizador e o iniciador da reacção de polimerização. Após a adição destes, teve-se o cuidado de agitar suavemente a solução de forma a desgaseificar esta, uma vez que o oxigénio é um inibidor desta reacção.

Colocou-se cerca de 3,5 mL do gel de resolução na cassete de polimerização e cobriu-se este com H₂O destilada, de modo a garantir que o gel não desidratasse e a superfície deste ficasse uniforme, deixando-se a polimerizar aproximadamente durante 1 hora. De seguida, verteu-se a H₂O destilada que se encontrava à superfície, adicionou-se o gel de concentração e colocou-se o pente sobre este, deixando a polimerizar cerca de 45 minutos. Entretanto, procedeu-se à preparação das amostras para aplicação no gel de electroforese com concentração final de proteína de 1 mg/mL num volume de 100 µL, dos quais 16,7 µL correspondem ao tampão de amostra (320 mM Tris-HCl, pH 6,8; 0,4 M β-mer; 8 % (m/v) SDS; 15 % (v/v) glicerol (*confere densidade à amostra, dificultando que esta saia do poço aplicado*); 0,024 % (m/v) azul bromofenol (*cora as amostras de forma a ser possível visualizar a frente de migração*); 6x concentrado). Posteriormente, as amostras foram aquecidas a 100 °C durante 5 minutos, sendo homogeneizadas no vortex antes e após o respectivo aquecimento. Após a polimerização do gel de concentração, removeu-se o pente e lavou-se cuidadosamente os poços com H₂O destilada. Transferiu-se a cassete de polimerização para a

tina de electroforese, à qual se adicionou a solução tampão da tina superior/interior (25 mM Tris; 192 mM glicina e 0,1 % (m/v) SDS, pH 8,3) e solução tampão da tina inferior/exterior (25 mM Tris; 192 mM glicina; 0,1 % (m/v) SDS; 0,1 M acetato de sódio, pH 8,3). Aplicaram-se nos poços do gel, 10 μ L das soluções dos marcadores de alta e de baixa massa molecular (**Anexo D: Tabela D.1 e Tabela D.2**) e 20 μ L (correspondentes a 20 μ g) das amostras proteicas preparadas anteriormente. Ligou-se a fonte de alimentação da electroforese, aplicando-se uma voltagem constante de 90 V e deixou-se esta a decorrer durante 2 horas (**Figura II.10**).

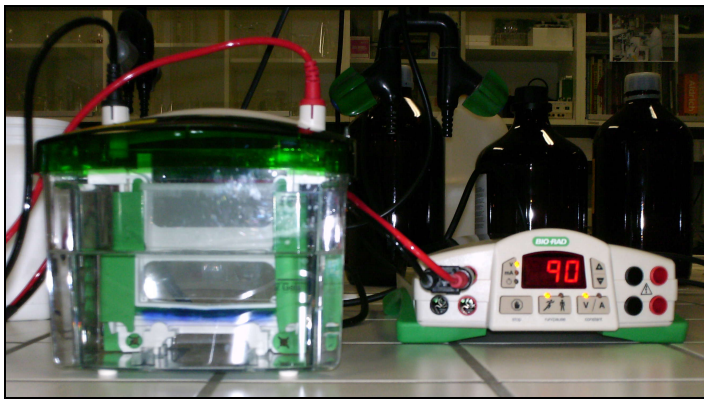


Figura II.10: Electroforese SDS-PAGE em decurso, com a aplicação de um campo eléctrico constante de 90 V. É possível a visualização da frente de migração das amostras proteicas a azul, quase no final do gel, devido ao tampão de amostra conter azul de bromofenol.

Após terminada a electroforese, transferiu-se o gel para uma tina contendo solução corante (“Coomassie Brilliant Blue” com 45 % (v/v) metanol e 10 % (v/v) ácido acético glacial) onde se deixou o gel a corar durante 1 hora. De seguida, colocou-se o gel numa tina com solução descorante (10 % (v/v) metanol e 10 % (v/v) ácido acético glacial), deixando-se o gel a descorar durante a noite e, no dia seguinte, mudou-se esta solução até as bandas se encontrarem visivelmente bem definidas.

Com os resultados obtidos, determinou-se a mobilidade relativa das bandas correspondentes aos marcadores de alta e baixa massa molecular, construindo-se um gráfico do logaritmo da massa molecular destes em função das suas mobilidades relativas, sendo assim, possível obter uma recta de calibração. A massa molecular das proteínas isoladas foi então determinada por interpolação das suas mobilidades relativas na recta de calibração obtida anteriormente.

II.4 – Medição das actividades enzimáticas do subfragmento-1 de miosina

Para além da caracterização das proteínas, a actividade ATPásica do S1 na presença de Ca^{2+} , K^+ /EDTA ou actina, constituem bons critérios para avaliar a qualidade da preparação do S1. Foi demonstrado que os grupos sulfidrilo, nomeadamente as duas cisteínas mais reactivas, nas posições

707 (SH1) e 697 (SH2), encontram-se intimamente relacionadas com a actividade ATPásica da miosina e do S1, sendo assim importante manter estes grupos no seu estado reduzido [Margossian e Lowey, 1982]. Uma preparação adequada do S1 apresenta uma actividade da K^+ /EDTA-ATPase superior à actividade da Ca^{2+} -ATPase [Sellers, 1999]. Quando o grupo SH1 se encontra oxidado, as actividades K^+ /EDTA-ATPase e Mg^{2+} -ATPase estimulada por F-actina são inibidas, enquanto as actividades Ca^{2+} -ATPase e Mg^{2+} -ATPase (basal) são estimuladas. Por outro lado, a oxidação do grupo SH2 resulta na perda completa de todas as actividades ATPásicas do S1 [Margossian e Lowey, 1982; Reisler, 1982; Sellers, 1999]. Portanto, com base no descrito anteriormente, a medição das actividades da Ca^{2+} e da K^+ /EDTA-ATPase, fornecem uma boa indicação do estado de oxidação dos grupos sulfidrilo. Porém, apesar das actividades da Ca^{2+} e da K^+ /EDTA-ATPase serem bons indicadores *in vitro* da actividade da miosina e do S1, apenas a actividade da Mg^{2+} -ATPase estimulada por F-actina tem significado fisiológico [Margossian e Lowey, 1982].

II.4.1 – Medição das actividades enzimáticas não fisiológicas do S1 – Ca^{2+} e K^+ /EDTA-ATPase

As actividades enzimáticas não fisiológicas do S1, dependentes de Ca^{2+} e de K^+ /EDTA, foram obtidas através da determinação da quantidade de fosfato inorgânico (PO_4^{3-}) libertado proveniente da hidrólise do ATP. De modo a quantificar o fosfato inorgânico, seguiu-se o método colorimétrico directo e descontínuo (tempo fixo) descrito anteriormente por Taussky e Shorr [1953], sendo este baseado no método inicialmente relatado por Fiske e Subbarow [1925]. Este método ficou conhecido por Fiske-Subbarow modificado e consiste na reacção entre o fosfato inorgânico e o molibdato de amónia em solução ácida, produzindo o ácido fosfomolibdico. A adição de um agente redutor promove a redução do molibdénio a fosfomolibdato que forma um complexo de cor azulada com absorção a 660 nm, podendo assim ser detectado por métodos espectrofotométricos.

Em primeiro lugar, preparou-se a recta de calibração tal como é indicado na Tabela II.3, sendo utilizado nas seguintes amostras a solução de KH_2PO_4 ($[KH_2PO_4]_{stock} = 5 \text{ mM}$) como padrão.

Tabela II.3: Composição das amostras efectuadas para determinar a recta de calibração do método de Fiske-Subbarow modificado, utilizando como padrão a solução de KH_2PO_4 ($[\text{KH}_2\text{PO}_4]_{\text{stock}} = 5 \text{ mM}$).

nmol (PO_4^{3-})	KH_2PO_4 (μL)	H_2O miliQ (μL)	Molibdato de amónio ¹ (μL)	Agente redutor ² (μL)
0	0	1780	200	20
25	5	1775		
50	10	1770		
100	20	1760		
200	40	1740		
500	100	1680		

¹ **Solução de molibdato de amónio:** 2,5 % (m/v) molibdato de amónio em 2,5 M de H_2SO_4 .

² **Solução de agente redutor:** 5 mg ácido 4-Amino-3-hidroxi-1-naftaleno sulfónico; 30 mg bissulfito de sódio e 30 mg sulfito de sódio em 2,6 mL de H_2O miliQ (Solução preparada imediatamente antes da sua utilização e o por ser fotosensível foi protegida com papel de alumínio).

Após a adição de cada volume de reagente homogeneizou-se as misturas no vortex. Deixou-se cada amostra reagir durante 10 minutos e efectuou-se no espectrofotómetro a leitura dos valores da $\text{Abs}_{660\text{nm}}$, procedendo-se então à construção do gráfico da $\text{Abs}_{660\text{nm}}$ em função das nmol PO_4^{3-} , no qual se traçou a recta de calibração.

Para determinar a actividade Ca^{2+} -ATPase adicionou-se num eppendorf 400 μL de meio de reacção (125 mM Tris-HCl e 0,575 M KCl, pH 7,9), 25 μL de CaCl_2 ($[\text{CaCl}_2]_{\text{stock}} = 100 \text{ mM}$) e 10 μL ATP ($[\text{ATP}]_{\text{stock}} = 250 \text{ mM}$ em 1 M Tes/Tris), enquanto que, para determinar a actividade K^+ /EDTA-ATPase adicionou-se num eppendorf 400 μL de meio de reacção, 123 μL de KCl ($[\text{KCl}]_{\text{stock}} = 3 \text{ M}$), 10 μL de EDTA ($[\text{EDTA}]_{\text{stock}} = 100 \text{ mM}$) e 10 μL ATP. Em ambos os ensaios ainda se adicionaram a proteína de forma a obter uma concentração final de 0,1 mg/mL e, caso necessário, H_2O miliQ até perfazer um volume final de 1 mL. A reacção enzimática iniciou-se após a adição do ATP, uma vez que este o é substrato da reacção enzimática, e como tal foi o último reagente a ser adicionado, deixando-se a cinética decorrer à temperatura ambiente num intervalo de tempo máximo de 20 minutos. Ao longo deste intervalo de tempo recolheram-se várias amostras de 150 μL da cinética transferindo-as para um eppendorf previamente preparado com igual volume de 10 % (m/v) TCA refrigerado, tendo-se de seguida, homogeneizado rapidamente esta mistura no vortex e colocado em gelo. Centrifugou-se a mistura anteriormente obtida a 10000xg durante 10 minutos de modo a sedimentar a proteína desnaturada e retirou-se 200 μL do sobrenadante para novos eppendorfs. Adicionaram-se ainda a estes eppendorfs 1580 μL de H_2O destilada e 200 μL da solução de molibdato de amónio, sendo a solução sempre homogeneizada após a adição de cada

reagente. Por fim, para cada amostra, adicionou-se 20 μL da solução de agente redutor, agitou-se no vortex e deixou-se reagir durante 10 minutos, tendo-se medido após este tempo os valores da $\text{Abs}_{660\text{nm}}$. Por interpolação a partir da recta de calibração obtida anteriormente determinou-se a quantidades de fosfato inorgânico (Pi) libertado em cada ensaio, e conseqüentemente, a partir destes resultados foram então determinadas as actividades da Ca^{2+} e da $\text{K}^+/\text{EDTA-ATPase}$ em nmol Pi/min.mg S1 .

II.4.2 – Medição da actividade enzimática fisiológica do S1 – Mg^{2+} -ATPase

As actividades Mg^{2+} -ATPase e Mg^{2+} -ATPase estimulada por F-actina foram medidas espectrofotometricamente utilizando o método de enzimas acopladas. Este método é muitas vezes escolhido para determinar actividades enzimáticas quando os substratos e produtos não absorvem no mesmo comprimento de onda, porém a variação do comprimento de onda da absorvência consiste numa maneira de contornar este problema. Muitos destes ensaios são baseados na interconversão de NAD^+ e NADH , uma vez que ambas as formas oxidada e reduzida destes dois nucleótidos absorvem a 260 nm, mas apenas a forma reduzida absorve a 340 nm. Sendo assim, nestas reacções, a enzima sujeita a análise encontra-se acoplada a uma outra, que por sua vez utiliza o sistema NAD^+/NADH através dos intermediários formados [Wilson e Walker, 2000]. Neste trabalho, utilizou-se o método de enzimas acopladas piruvato cinase (PK)/lactato desidrogenase (LDH). O fosfoenolpiruvato (PEP) e o ADP são primeiramente convertidos em piruvato e ATP, pela acção da enzima PK. Posteriormente, o piruvato é transformado em lactato, sendo esta reacção catalisada pela enzima LDH, ocorrendo simultaneamente a oxidação do NADH a NAD^+ . A presença do S1 no meio reaccional provoca a hidrólise do ATP anteriormente formado, em ADP e Pi, o que proporciona a formação de um ciclo (**Figura II.11**). Estando as enzimas em excesso, a velocidade de conversão do NADH , monitorizada pela variação da absorvência a 340 nm, é limitada pela formação de ADP e Pi pelo S1, sendo o ATP sempre regenerado, e portanto a sua concentração inicial é sempre mantida permitindo assim a manutenção do ciclo [Bagshaw, 1982].

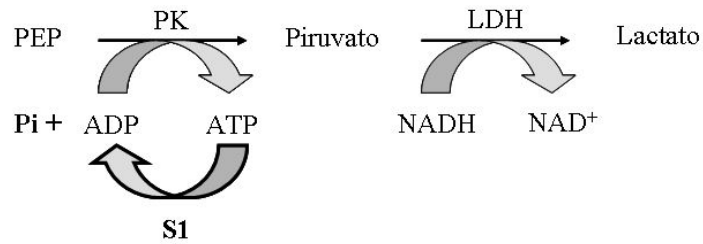


Figura II.11: Representação esquemática das reacções do método de enzimas acopladas PK/LDH, utilizado para determinar a actividade Mg^{2+} -ATPase do S1 [Adaptado de Bagshaw, 1982].

O método de enzimas acopladas trata-se de um método contínuo (cinética) e indirecto, e o protocolo seguido foi anteriormente descrito por Cuenda et al [1990]. Numa cuvete de 1 mL adicionaram-se 800 μ L de meio de reacção (25 mM Tris-HCl e 3,125 mM $MgCl_2$, pH 7,0), 10 μ L de PEP ($[PEP]_{stock} = 42$ mM em 100 mM Tes/Tris), 10 μ L de PK+LDH (1 mg/mL (1:1)), 15 μ L de NADH ($[NADH]_{stock} = 25$ mM em 100 mM Tes/Tris), 10 μ L de ATP ($[ATP]_{stock} = 250$ mM em 1 M Tes/Tris), 0,05 mg/mL de S1 e fez-se o volume final de 1 mL com H_2O miliQ. A reacção foi iniciada pela adição de ATP e registou-se os valores da Abs_{340nm} ao longo do tempo. Para a medição da Mg^{2+} -ATPase estimulada por F-actina, adicionou-se posteriormente à mistura reaccional anterior F-actina e registou-se novamente os valores da Abs_{340nm} ao longo do tempo. As actividades Mg^{2+} -ATPase e Mg^{2+} -ATPase estimulada por F-actina foram então determinadas em nmol ATP/min.mg S1, através do declive produzido pela oxidação do NADH. Primeiramente converteram-se os valores da absorvência a 340 nm para nmol NADH oxidado através da lei de Beer-Lambert ($Abs = \epsilon \cdot c \cdot l$), uma vez que o coeficiente de extinção molar (ϵ) do NADH a 340 nm é de $6,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e, sabendo que, cada mole de NADH oxidado corresponde a uma mol de ATP hidrolisado.

II.5 – Preparação e quantificação de peroxinitrito sintético

A espécie reactiva utilizada neste estudo foi o peroxinitrito ($ONOO^-$) sintético, sendo produzido seguindo o procedimento descrito por Martín-Romero et al [2002], tendo sido este baseado no método originalmente descrito por Radi et al [1991].

Colocou-se 2,5 mL da solução de peróxido de hidrogénio (0,7 M H_2O_2 e 0,6 M HCl) num copo a 4 °C com agitação moderada e adicionou-se igual volume da solução de nitrito de sódio ($[NaNO_2]_{stock} = 0,6$ M), de modo a promover-se a formação da espécie $ONOO^-$. Imediatamente após

a adição das primeiras gotas da solução de NaNO_2 , adicionaram-se 5 mL da solução de hidróxido de sódio ($[\text{NaOH}]_{\text{stock}} = 3 \text{ M}$), sendo esta solução necessária para a estabilização do ONOO^- formado, uma vez que este se decompõe rapidamente. De seguida, adicionou-se 67 mg de MnO_2 sólido à mistura reaccional anterior, de modo a eliminar-se o excesso de H_2O_2 , e deixou-se em agitação constante durante 30 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Ao fim deste tempo, centrifugou-se a solução anterior a $3000 \times g$ durante 10 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Posteriormente, o sobrenadante obtido foi filtrado através de um filtro de $0,45 \text{ } \mu\text{m}$, fizeram-se alíquotas e guardaram-se em frascos de vidro a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$, enquanto o sedimento foi desprezado. Após o congelamento do ONOO^- , verifica-se que a camada superior apresenta uma coloração amarelada mais escura que a restante solução, e como tal encontra-se mais concentrada. Assim, sempre que necessário, retirou-se uma alíquota da $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ e com o auxílio de espátulas removeu-se alguns microlitros da camada superior de ONOO^- sintético e deixou-se descongelar.

A concentração de peroxinitrito sintético foi determinada espectroscopicamente por medição do valor $\text{Abs}_{302\text{nm}}$ em $1,5 \text{ M NaOH}$ (solução onde se encontra o ONOO^-), utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $1670 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [Uppu e Prior, 1996].

II.6 – Tratamento do subfragmento-1 de miosina com peroxinitrito sintético

No presente estudo o S1 foi tratado com peroxinitrito sintético por uma exposição aguda, consistindo apenas numa única adição da espécie reactiva à proteína de interesse. Antes do tratamento do S1 com a espécie reactiva em questão, a proteína foi sempre dialisada contra o tampão de tratamento de forma a remover o β -mer, o agente redutor que se havia adicionado no final do isolamento e purificação da proteína. A remoção do agente redutor é um passo fundamental neste trabalho, pois caso este não seja removido o tratamento do S1 com ONOO^- pode ficar comprometido. Isto é devido ao facto do β -mer ser um agente antioxidante que compete com os substratos oxidáveis pelas espécies reactivas e, conseqüentemente, diminui ou inibe significativamente a oxidação desses substratos.

Após a diálise do S1 contra o tampão de tratamento durante a noite, com agitação contínua e a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, quantificou-se o S1 através do método de Bradford e diluiu-se a proteína para 1 mg/mL no

mesmo tampão. O tratamento do S1 com ONOO⁻ sintético foi efectuado adicionando-se, apenas numa única vez e com agitação suave, o volume necessário da solução concentrada de ONOO⁻ de modo a se atingir a concentração final desejada. Deixou-se de seguida reagir durante 5 minutos à temperatura ambiente e, posteriormente, colocou-se a proteína a 4 °C. Paralelamente, foram também realizados tratamentos controlo que consistiram na adição de igual volume de 1,5 M NaOH (em vez de ONOO⁻) ao S1, de forma a garantir que os efeitos futuramente observados a nível molecular e funcional eram apenas causados pelo ONOO⁻. Foram também verificadas as variações de pH antes e após o tratamento.

II.7 – Optimização das condições de nitração das tirosinas do subfragmento-1 de miosina

Pretendendo-se neste estudo investigar o efeito *in vitro* da nitração de tirosina do S1 promovido por uma exposição aguda de ONOO⁻, foi necessário otimizar as condições de nitração. Estas consistiram no favorecimento da nitração de 3-nitrotirosinas (3-NT) em detrimento de outras modificações oxidativas mediadas pelo peroxinitrito, nomeadamente a oxidação das cisteínas (Cys) do subfragmento-1 de miosina. Nesse sentido, os tratamentos do S1 foram realizados em várias soluções tampões: tampão Tris (0,5 M Tris, pH 7,2), tampão fosfato de potássio (TFP: 0,25 M K₂HPO₄ e 0,25 M KH₂PO₄, pH 7,2) e em tampão fosfato potássio com bicarbonato (TFP+Bicarbonato: 0,25 M K₂HPO₄, 0,25 M KH₂PO₄ e 25 mM KHCO₃, pH 7,2), tendo-se, para cada tampão de tratamento, titulado com várias concentrações de peroxinitrito sintético (0; 0,1; 0,25; 0,5; 1 e 2 mM ONOO⁻).

II.8 – Quantificação de 3-nitrotirosinas

Na presença do peroxinitrito os resíduos de tirosina das proteínas são susceptíveis a sofrer nitração através de um mecanismo radicalar resultando na formação de 3-NT, uma modificação bastante estável e irreversível. O método utilizado no presente estudo para a quantificação de 3-NT baseia-se no facto do grupo nitro, incorporado na posição orto relativamente ao grupo OH do anel

aromático da tirosina, conferir uma absorvência máxima ao comprimento de onda de 415 nm, o que permite a determinação das 3-NT por espectrofotometria.

II.8.1 – Determinação do coeficiente de extinção molar de 3-nitrotirosinas

Para cada tampão de tratamento determinou-se o respectivo coeficiente de extinção molar de 3-NT a 415 nm. Nesse sentido, prepararam-se em triplicado soluções de 3-nitro-L-tirosina purificada com uma concentração de 10 mM em ambos os tampões de tratamentos, tendo-se de seguida, medido a absorvência a 415 nm para concentrações crescentes de 3-nitro-L-tirosina (0, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 500 e 1000 μM). Com os resultados obtidos anteriormente, construiu-se uma recta da $\text{Abs}_{415\text{nm}}$ em função da concentração de 3-nitro-L-tirosina (μM) e através da lei de Beer-Lambert, determinou-se o coeficiente de extinção molar de 3-NT para cada um dos tampões de tratamento.

II.8.2 – Quantificação de 3-nitrotirosinas no subfragmento-1 de miosina

Ao longo deste trabalho, a quantificação de 3-nitrotirosinas no subfragmento-1 de miosina foi efectuada espectroscopicamente pela leitura directa do valor da absorvência a 415 nm. Através do valor da absorvência obtido e utilizando o coeficiente de extinção molar previamente estimado, determinou-se a concentração de 3-nitrotirosinas formadas no S1, em mol 3-NT/mol S1.

II.9 – Imunodeteção de 3-nitrotirosinas

Neste estudo, para além da quantificação de 3-NT, também se procedeu à sua imunodeteção, de forma a obter-se informação referente à localização das 3-NT formadas no S1. A presença de um grupo nitro nos resíduos de tirosina, para além de conferir uma absorção máxima característica a 415 nm, pode também gerar respostas imunológicas, e deste modo é utilizado vulgarmente o método de *Western blotting* para detectar as regiões da proteína nitrada [Ye et al, 1996]. O *Western blotting* é uma das técnicas mais eficazes para detectar proteínas específicas após a sua separação por electroforese, uma vez que combina a capacidade analítica da electroforese com a sensibilidade e especificidade das sondas utilizadas, nomeadamente os anticorpos, no caso de ensaios

imunoquímicos (*immunoblotting*). De uma forma geral, uma experiência de *Western blotting* consiste na separação das proteínas por electroforese (SDS-PAGE), e posteriormente, estas são transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Por conseguinte, a membrana é primeiramente incubada com um anticorpo primário (anticorpo específico que reconhece e se liga às proteínas de interesse), e seguidamente, incubada com um anticorpo secundário (que por sua vez reconhece e se liga ao anticorpo primário), o qual se encontra marcado com um grupo apropriado. Neste caso em particular, o anticorpo secundário está conjugado com uma enzima que, após reagir com um substrato, desenvolve uma reacção colorida na membrana, permitindo assim a detecção das moléculas de interesse. Neste método, como as proteínas separadas electroforeticamente são transferidas para uma membrana, as dificuldades da análise de moléculas em géis são ultrapassadas. Esta técnica apresenta assim várias vantagens, tais como: maior acessibilidade das proteínas aos anticorpos; as proteínas imobilizadas na membrana não são afectadas por efeitos de difusão; a análise do blot necessita de menor quantidade de reagentes e, as membranas são muito mais fáceis de manusear e de guardar comparativamente aos géis [Goldsby et al, 2000; Quintas et al, 2008; Videira, 2001; Wilson e Walker, 2000].

II.9.1 – Tripsinização do subfragmento-1 de miosina

Apresentando o S1 dois locais sensíveis à proteólise, dos quais resulta a formação de três fragmentos: um de 25 kDa (N-terminal), um de 50 kDa (central) e um de 20 kDa (C-terminal) [Sellers, 1999; Rayment, 1996; Geeves e Holmes, 1999], procedeu-se à tripsinização do S1 de forma a localizar-se em que fragmentos se encontram as 3-NT formadas pela exposição aguda do S1 ao ONOO⁻.

As amostras de S1 foram tripsinizadas adicionando-se uma solução de 0,5 mg/mL de tripsina na proporção de 1:50 (mol tripsina:mol S1) e deixou-se a digestão decorrer durante 45 minutos à temperatura ambiente. De seguida, terminou-se a digestão das amostras de S1 através da adição da solução de inibidor de tripsina na proporção de 2:1 (mol inibidor tripsina:mol tripsina).

II.9.2 – Imunodeteccção de 3-nitrotirosinas no subfragmento-1 de miosina por *Western blotting*

O procedimento utilizado para a imunodeteccção de 3-NT no S1 e que se descreve de seguida, foi baseado consoante o descrito no manual de instruções do kit de substrato e de amplificação Opti-4CN da Biorad (nº 170-8238), consistindo este numa versão melhorada e mais sensível do método colorimétrico *horseradish peroxidase* (HRP) que utiliza o substrato 4-cloro-1-naftol (4CN).

Prepararam-se as amostras de S1 (10 µg de proteína), previamente tratadas com a concentração desejada de ONOO⁻ e tripsinazadas, sendo depois aquecidas a 100 °C durante 5 minutos, homogeneizadas e aplicadas num gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (preparado de forma idêntica ao descrito no ponto II.3.2 da presente secção). As amostras foram então separadas por electroforese aplicando-se uma voltagem constante de 90 V cerca de 2 horas. Após concluída a separação das proteínas electroforeticamente, num tabuleiro contendo tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM glicina e 20 % (v/v) metanol), embeberam-se duas esponjas, duas folhas de papel de filtro Biorad, a membrana de nitrocelulose de 0,45 µm da Biorad e o gel obtido anteriormente, e montou-se uma “sanduíche” pela seguinte ordem: esponja, papel de filtro, gel (previamente marcado), membrana de nitrocelulose, papel de filtro e esponja, tendo-se o cuidado de retirar as bolhas de ar que se podem formar entre o gel e a membrana. De seguida, colocou-se a “sanduíche” na cassette de transferência, que por sua vez foi colocada na tina de transferência e encheu-se com tampão de transferência até que a “sanduíche” se encontrasse submersa com este tampão. Iniciou-se a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose por transferência activa (electrotransferência), aplicando-se 300 mA, a 4 °C e com agitação constante durante 3 horas e 20 minutos (1 Ampère total por cada transferência gel-membrana) (Figura II.12).



Figura II.12: Transferência activa (electrotransferência) das proteínas separadas previamente por SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose, com a aplicação de 300 mA, a 4 °C e com agitação continua.

Após estar finalizada a electrotransferência, com o auxílio de pinças, retirou-se a membrana da cassette de transferência, marcou-se com um lápis o lado onde se encontram as amostras e lavou-se a membrana com a solução tampão fosfato salino (PBS: 8,1 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄; 2,7 mM KCl e 137 mM NaCl), de modo a remover-se o tampão de transferência. Corou-se a membrana com a solução reutilizável de Ponceau (0,1 % (m/v) Ponceau S e 5 % (v/v) ácido acético), para se verificar se a transferência das proteínas para a membrana foi eficiente, uma vez que este reagente cora rapidamente as proteínas. Em seguida, lavou-se a membrana com H₂O destilada para remover o excesso de corante até as bandas se encontrarem nitidamente definidas e fez-se um scanner da membrana. Removeu-se completamente o corante da membrana, lavando-se esta duas vezes com a solução de PBS durante 5 minutos e lavou-se a membrana mais duas vezes durante 5 minutos com a solução de PBST (0,1 (v/v) Tween-20 em PBS), sempre com agitação contínua e à temperatura ambiente. O detergente Tween-20 presente no PBST vai eliminar as ligações não específicas produzidas por interações hidrofóbicas, reduzindo assim a formação de manchas e de *background* e, simultaneamente, uma vez que não afecta as ligações membrana-anticorpos, vai tornar as proteínas mais acessíveis resultando num aumento da sensibilidade da detecção. Prosseguiu-se com o bloqueio da membrana (para evitar posteriormente ligações não específicas dos anticorpos), incubando esta com a solução de bloqueio (3 % (m/v) bloqueador Biorad em PBST), na proporção de 0,25 mL de solução de bloqueio por cm² de membrana, durante 1 hora com agitação constante e à temperatura ambiente. Após o bloqueio da membrana, lavou-se esta com PBST (3x 5 minutos) com agitação à temperatura ambiente. Preparou-se o anticorpo primário (diluído 1:5000 em 1 % (m/v) BSA em PBST) na proporção de 0,1 mL de solução diluída de anticorpo por cm² de membrana, tendo-se de seguida incubado a membrana com o anticorpo primário durante 1 hora com agitação constante e à temperatura ambiente. Lavou-se novamente a membrana com PBST (3x 5 minutos) com agitação à temperatura ambiente. Entretanto, preparou-se o anticorpo secundário (diluído 1:25000 em 1 % (m/v) BSA em PBST) na mesma proporção que o anterior, incubou-se a membrana com o anticorpo secundário durante 1 hora e, mais uma vez, lavou-se a membrana com PBST (3x 5 minutos), sempre com agitação contínua à temperatura ambiente. Preparou-se a solução diluída de reagente de amplificação Biorad (BAR) na proporção de 0,1 mL por cm² de membrana, combinando-se 2 partes de diluente de amplificação Biorad (2x concentrado), 1 parte de BAR (4x

concentrado) e 1 parte de H₂O destilada, e de seguida procedeu-se à amplificação do sinal, tendo-se incubando a membrana com a solução diluída de BAR durante 10 minutos com agitação e à temperatura ambiente. Após esta incubação, lavou-se a membrana com 20 % (v/v) DMSO em PBST (4x 5 minutos) e, posteriormente, com PBST (2x 5 minutos), sempre com agitação contínua à temperatura ambiente. Preparou-se a solução diluída de streptavidina-HRP (diluída 1:1000 em 1 % (m/v) BSA em PBST) na proporção de 85 µL por cm² de membrana, e incubou-se a membrana com esta solução durante 30 minutos com agitação estável e à temperatura ambiente, tendo-se de seguida lavado novamente a membrana com PBST (3x 5 minutos) nas mesmas condições que anteriormente. Por fim, preparou-se a solução de diluente Opti-4CN, na proporção de 0,1 mL por cm² de membrana, misturando-se 1 parte de diluente Opti-4CN Biorad (concentrado) com 9 partes H₂O destilada, e seguidamente adicionou-se a esta solução 2 % (v/v) substrato Opti-4CN Biorad e homogeneizou-se. A detecção colorimétrica foi então efectuada incubando-se a membrana com a solução anterior cerca de 3 minutos (ou até se atingir o nível desejado de sensibilidade), com agitação suave e à temperatura ambiente. Posteriormente à detecção removeu-se a solução de substrato, lavou-se a membrana com H₂O destilada e fez-se novamente um scanner da membrana.

II.10 – Quantificação de cisteínas reduzidas

O método utilizado no presente estudo para a quantificação de Cys foi adaptado por Gutiérrez-Merino [1987] e fundamenta-se na reacção entre os grupos –SH das proteínas com o reagente de Ellman (5-5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzóico) – DTNB). Esta reacção ocorre a pH neutro e origina a formação de um grupo disulfídico misto, resultante da ligação dissulfureto entre a proteína e o ácido tionitrobenzóico (TNB) (Figura II.13). É de referir que o grupo TNB confere uma cor amarela viva à solução e apresenta um máximo de absorvência ao comprimento de onda de 412 nm [Roby e White, 1990]. No entanto, para que esta reacção ocorra os grupos –SH das cisteínas, constituintes das proteínas, têm que se encontrar reduzidos e expostos ao solvente. A quantificação de Cys reduzidas é determinada pela leitura do valor da Abs_{412nm}, uma vez que uma mol de grupos –SH das proteínas reage com o DTNB, formando uma mol do composto TNB.

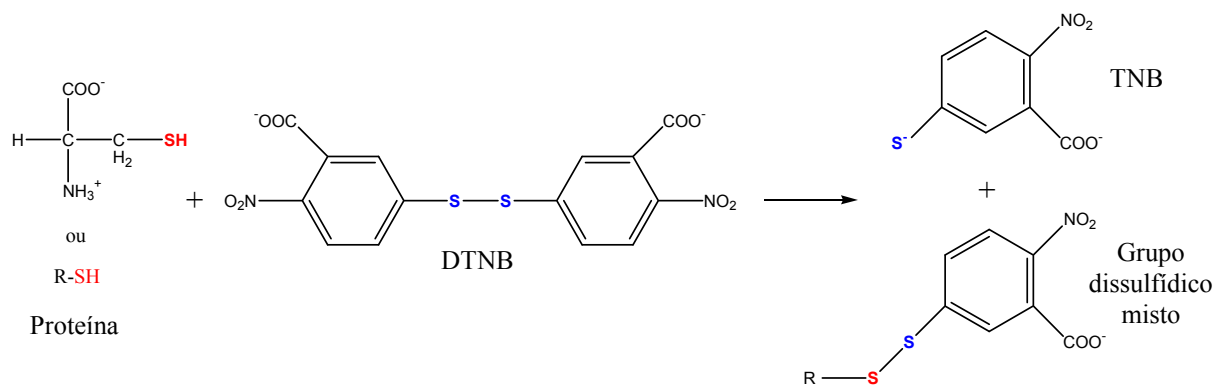


Figura II.13: Representação esquemática da reacção entre os grupos -SH das proteínas com o DTNB utilizada para quantificar as Cys reduzidas do S1 (Adaptado de www.bio.net/bionet/mm/methods/1994-October/020180.html).

II.10.1 – Determinação do coeficiente de extinção molar do DTNB

Determinou-se o coeficiente de extinção molar do DTNB a 412 nm respectivamente para cada tampão de tratamento. Primeiramente, prepararam-se em triplicado soluções de DL-cisteína purificada ($[DL\text{-cisteína}]_{\text{stock}} = 15 \text{ mM}$ em H₂O miliQ) e de DTNB ($[DTNB]_{\text{stock}} = 50 \text{ mM}$ em 250 mM de tampão fosfato de sódio, pH 7,2), sendo esta última solução protegida da luz solar com papel de alumínio e sempre mantida à temperatura de 4 °C. De seguida, colocou-se numa cuvete 1650 μL de tampão de tratamento, 990 μL de H₂O miliQ, 660 μL de 250 mM de tampão fosfato de sódio (pH 7,2) e 33 μL de 50 mM de DTNB, tendo-se posteriormente efectuado a leitura dos valores da absorvência a 412 nm para concentrações crescentes de DL-cisteína (0, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 50 e 100 μM). Com os resultados obtidos anteriormente construiu-se uma recta da $Abs_{412\text{nm}}$ em função da concentração de DL-cisteínas (μM) e, através do declive originado por esta, determinou-se o coeficiente de extinção molar do DTNB para cada um dos tampões de tratamento.

II.10.2 – Quantificação de cisteínas reduzidas no subfragmento-1 de miosina

Colocou-se numa cuvete 550 μL de S1 (9,1 μM em tampão de tratamento) previamente tratado com a concentração desejada de ONOO⁻, 330 μL H₂O miliQ e 220 μL de 250 mM de tampão fosfato de sódio (pH 7,2), homogeneizou-se suavemente e iniciou-se a leitura da absorvência a 412 nm. Prosseguiu-se com a determinação das Cys “rápidas”, ou seja, as cisteínas do S1 acessíveis ao solvente, adicionando-se à cuvete anterior 11 μL de DTNB ($[DTNB]_{\text{stock}} = 50 \text{ mM}$ em 250 mM de tampão fosfato de sódio, pH 7,2), homogeneizou-se e mediu-se imediatamente o valor da $Abs_{412\text{nm}}$. Por fim, adicionou-se à mesma cuvete 0,01 g de SDS, agitou-se fortemente e foi

novamente medido o valor da Abs_{412nm} . Neste último procedimento, determina-se as Cys totais do S1, uma vez que o SDS vai desnaturar a proteína de interesse e, conseqüentemente, proporciona a exposição de todos os resíduos de cisteína ao solvente. Portanto, a quantificação de cisteínas reduzidas do S1 foi então determinada, em mol Cys/mol S1, através dos valores da Abs_{412nm} registados após a adição de DTNB (Cys “rápidas”) e de SDS (Cys totais) ao meio reaccional, utilizando-se o coeficiente de extinção molar previamente determinado no respectivo tampão de tratamento, e tendo-se descontado em ambos os casos a contribuição do DTNB e do S1.

II.11 – Estudos de reversibilidade

Uma vez que os organismos possuem processos biológicos para a reversão de modificações oxidativas, resultantes dos danos causados pelo $ONOO^-$ [Alvarez e Radi, 2003; Petropoulos e Friguet, 2006], os estudos de reversibilidade constituem adicionalmente um factor fundamental neste trabalho. Isto é devido ao facto de actualmente se encontrar descrito que *in vivo* a oxidação de cisteínas pode ser revertida através da acção de algumas enzimas, como por exemplo a tioredoxina reductase e a glutathione [Petropoulos e Friguet, 2006], enquanto que, não existem evidências sólidas da presença de sistemas biológicos específicos que removam ou eliminem as 3-nitrotirosinas [Radi et al, 2001]. No presente estudo utilizou-se o agente redutor ditioneitol (DTT) pelo facto de estudos anteriores demonstrarem que *in vitro* este é capaz de reduzir os grupos tiol das cisteínas oxidadas, estando estabelecido que 1 mol de DTT reverte 2 mol de ligações dissulfureto [Radi et al, 1991].

Este estudo consistiu em três etapas nas quais se efectuaram, sempre que possível, a medição dos seguintes parâmetros: medição das actividades não fisiológicas do S1 (Ca^{2+} e K^+ -ATPase), medição das actividades fisiológicas do S1 (Mg^{2+} -ATPase e Mg^{2+} -ATPase estimulada por actina), e quantificação de 3-nitrotirosinas e de cisteínas reduzidas (ver pontos II.4.1, II.4.2, II.8.2 e II.10.2, respectivamente). A primeira etapa consistiu na medição dos vários parâmetros logo após o tratamento da proteína de interesse com peroxinitrito sintético. Na segunda etapa prosseguiu-se com a reversão das modificações oxidativas promovidas pelo $ONOO^-$ no S1 e verificou-se se houve restabelecimento das actividades enzimáticas do S1. Para isso, incubou-se as várias amostras de S1 em estudo com 1 mM DTT durante 2 horas a 4 °C e mediu-se os vários parâmetros. Pelo facto do reagente redutor reagir com o DTNB foi necessário a realização de uma terceira etapa, para se

quantificar as cisteínas reduzidas do S1 e de modo a verificar-se se na ausência de DTT existiam alterações dos resultados obtidos anteriormente. Nesse sentido, procedeu-se à eliminação do DTT nas amostras de S1 em estudo através de uma cromatografia de filtração em gel ou por diálise. Ambas as técnicas possuem o mesmo princípio, uma vez que são utilizadas para separar componentes de diferentes dimensões numa mistura. A técnica de cromatografia de filtração em gel baseia-se no facto de ser constituída por uma fase estacionária que possui poros de diferentes tamanhos, o que proporciona a eluição das várias moléculas numa mistura por ordem decrescente de massa molecular. A diálise é uma técnica mais simplista, uma vez que se utiliza uma membrana semi-permeável contendo poros que permitem ou bloqueiam a passagem de moléculas, caso o seu tamanho seja respectivamente inferior ou superior ao poro da membrana utilizada [Creighton, 1997; Voet e Voet, 1995; Wilson e Walker, 2000]. Para a remoção do DTT da solução do S1 através da cromatografia de filtração em gel, equilibrou-se primeiramente as respectivas colunas (Amersham Bioscience PD-10) com 25 mL de tampão de tratamento, tendo-se de seguida carregado estas com 2,5 mL de amostra proteica. Após estas terem eluído completamente na coluna, adicionou-se 3,5 mL de tampão de tratamento e começaram-se a recolher as amostras de S1 (sem DTT) num falcon. Depois da recolha das proteínas, lavou-se as colunas com 50 mL de H₂O miliQ e com 25 mL de 10 % (v/v) de etanol e, posteriormente, estas colunas foram guardadas a 4 °C. A remoção do DTT da solução do S1 através de diálise consistiu em colocar-se na cassette de diálise a amostra proteica, e deixou-se dialisar cerca de nove horas contra o tampão de tratamento, com agitação contínua e a 4 °C, tendo-se mudado o tampão de diálise, ou seja, o tampão de tratamento de três em três horas. Após obtidas as amostras de S1 sem DTT, procedeu-se então à medição dos vários parâmetros na ausência de DTT.

II.12 – Estudos bioinformáticos

II.12.1 – Pesquisa da estrutura tridimensional

A estrutura tridimensional do subfragmento-1 de miosina para a posterior análise bioinformática foi obtida a partir da base de dados Protein Data Bank (PDB), cujo site encontra-se disponível em <http://www.rcsb.org/pdb/>. A estrutura tridimensional (3D) do S1 de galinha retirada desta base de dados apresenta o seguinte código de acesso: 2MYS.

II.12.2 – Análise bioinformática da estrutura tridimensional

A análise da estrutura 3D é relevante para este estudo uma vez que contribui para a monitorização de características, como por exemplo as orientações espaciais e proximidade dos aminoácidos relativamente uns aos outros, que consequentemente podem explicar ou estar associados ao favorecimento da nitração de tirosinas no S1. Esta análise bioinformática da estrutura tridimensional do S1 foi realizada no software PyMOL, que se encontra disponível no site <http://pymol.sourceforge.net/>.

III – RESULTADOS E DISCUSSÃO

III.1 – Caracterização das proteínas musculares isoladas

De modo a verificar se as proteínas musculares isoladas apresentam qualidade adequada à realização dos estudos futuros foi determinada a concentração das proteínas bem como o seu estado de pureza.

III.1.1 – Quantificação das proteínas musculares isoladas

Para ambas as proteínas isoladas, a sua quantificação foi efectuada através do método de Bradford, conforme descrito anteriormente no ponto II.3.1 na secção dos Materiais e Métodos. A concentração média obtida do S1 de miosina foi de $21,49 \pm 11,94 \mu\text{M}$ ($2,36 \pm 1,31 \text{ mg/mL}$) ($n = 4$), enquanto que para a G-actina obteve-se uma concentração média de $240,45 \pm 30,47 \mu\text{M}$ ($10,10 \pm 1,28 \text{ mg/mL}$) ($n = 2$).

Ao analisar-se a concentração média do S1 comparativamente a estudos anteriores [Simão, 2004; Ramos, 2005], verifica-se que a concentração do S1 obtida neste estudo é cerca de 2,5 vezes inferior. Uma possível razão para tal efeito poderá ser o facto de o método adoptado nos estudos anteriores para a quantificação desta proteína, consistir na leitura directa da absorvência a 280 nm. Neste método, a quantificação de proteínas baseia-se na capacidade dos aminoácidos aromáticos (tirosina, triptofano e fenilalanina) absorverem a este comprimento de onda, e este método apresenta uma sensibilidade inferior ao método de Bradford. Mais ainda, a gama do UV é vulgarmente designada por uma “gama suja” uma vez que nesta podem absorver bastantes compostos. Como tal, os tampões e outros componentes presentes na solução proteica podem interferir neste método, resultando no aumento da absorção e consequentemente numa quantificação da proteína superior à real. Adicionalmente, tanto o tempo como a quantidade de α -quimotripsina utilizada na respectiva digestão de miosina de modo a obter o S1, foi diferente em ambos os casos anteriores, e no presente estudo notou-se que o aumento dos dois factores anteriores proporcionava uma maior quantidade do S1.

Relativamente à G-actina, por comparação a estudos anteriores [Simão, 2004; Ramos, 2005; Silva, 2006; Santos, 2007], observa-se que a concentração média obtida neste estudo pode ser desde 1-4 vezes superior. Uma vez que esta proteína também foi quantificada pelo método mais sensível, ou seja, através do método de Bradford em vez da leitura directa da absorvência a 290 nm, são assim excluídas as interferências durante a respectiva quantificação que poderiam conduzir a uma aumento da absorção e, conseqüentemente, da concentração da proteína. Isto remete então que o resultado de uma concentração superior de G-actina neste trabalho seja devido à manutenção dos valores de pH durante o isolamento, nomeadamente, na certificação (e ajuste caso necessário) do pH após a extracção com a solução E, uma vez que este passo foi recentemente introduzido no protocolo para a preparação do “pó de acetona” a partir de músculo esquelético de coelho.

III.1.2 – Análise do estado de pureza das proteínas isoladas

O estado de pureza das proteínas musculares isoladas foi analisado por electroforese em gel de poli(acrilamida) a 12% e em condições desnaturantes (SDS-PAGE), tal como indicado no ponto II.3.2 na secção dos Materiais e Métodos. Os resultados obtidos relativamente ao isolamento do subfragmento-1 de miosina (S1) assim como de G-actina encontram-se expostos na **Figura III.1**. Nos poços b) e c) encontra-se o S1 proveniente de duas preparações diferentes, sendo este obtido após digestão da miosina com 0,1 e 0,3 mg/mL de α -quimotripsina durante 30 e 45 minutos, respectivamente. Pela análise do gel de SDS-PAGE observa-se facilmente, em ambos os poços b) e c), a existência de uma banda intensa que apresenta uma massa molecular aparente de 91 kDa, determinada como se descreve no ponto II.3.2 na secção dos Materiais e Métodos. Deste modo, constatou-se que estas bandas intensas correspondem efectivamente ao S1, uma vez que este possui uma massa molecular de 110 kDa [Margossian e Lowey, 1982].

Adicionalmente, é possível visualizar nestes dois poços a presença de mais duas bandas de menor intensidade, identificadas como sendo as cadeias leves essenciais de miosina, a LC1 e a LC3, com 22,5 e 15,5 kDa de massa molecular, respectivamente [Voet e Voet, 1995]. É relevante referir que a cadeia leve regulatória de miosina, LC2, cuja massa molecular é de 18,5 kDa, não é visível nos respectivos poços deste gel, pelo facto da digestão quimotriptica da miosina ter sido realizada na presença de EDTA [Margossian e Lowey, 1982]. Observa-se ainda neste gel algumas diferenças

relativamente às duas preparações distintas do S1, em que o poço b) apresenta menor número de bandas comparativamente ao poço c), uma vez que esta última preparação do S1 esteve sujeita a maior proteólise, da qual resultou um maior número de fragmentos proteolíticos. Contudo, pode-se afirmar que ambas as preparações do S1 encontram-se livres de contaminações, embora se note nos respectivos poços a presença de outras bandas não significativas, provavelmente correspondentes às cadeias pesadas de miosina (200 kDa) e da proteína C (135 kDa). Tanto esta última proteína como contaminações por actina podem ser removidas através de um passo adicional de purificação no protocolo seguido, sendo sugerido a realização de uma cromatografia de troca iónica [Margossian e Lowey, 1982].

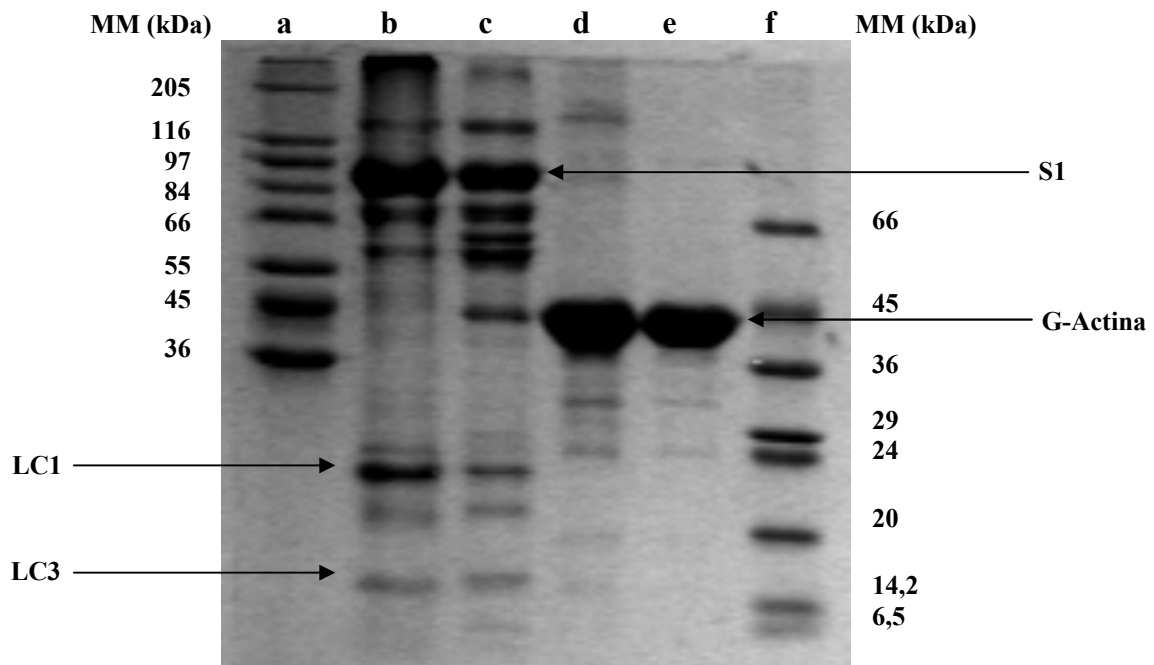


Figura III.1: Gel de SDS-PAGE (12 % acrilamida) correspondente às proteínas musculares isoladas, nomeadamente o subfragmento-1 de miosina (S1) e a G-actina, após a aplicação de uma voltagem constante de 90 V durante cerca de 2 horas. Poços a) e f) correspondem a 10 µL dos marcadores de alta (36 – 205 kDa) e de baixa (6,5 – 66 kDa) massa molecular, respectivamente. Os poços b) e c) contêm 20 µg do S1 proveniente de duas preparações diferentes (O S1 foi obtido após digestão da miosina: no poço b) com 0,1 mg/mL de α-quimotripsina durante 30 minutos; e no poço c) com 0,3 mg/mL de α-quimotripsina durante 45 minutos). Nos poços d) e e) encontram-se 20 µg de G-actina proveniente de duas preparações distintas. LC1 e LC3: Cadeias leves essenciais de miosina.

Nos poços d) e e) encontram-se a G-actina proveniente de duas preparações diferentes, observando-se claramente apenas a existência de uma única banda intensa que apresenta uma massa molecular aparente de 43 kDa, tendo sido identificada como sendo o monómero de actina (42 kDa) [Voet e Voet, 1995]. Verifica-se então que foram eliminadas eficazmente várias proteínas, como a

miosina (470 kDa), e proteínas associadas ao filamento de actina, tais como α -actinina (95 kDa), troponinas C (18 kDa), I (21 kDa) ou T (31 kDa) e tropomiosina (33 kDa).

Portanto, e de uma forma geral, pela análise dos resultados obtidos no gel de SDS-PAGE (**Figura III.1**) pode-se afirmar que ambas as proteínas musculares isoladas, nomeadamente o S1 e a G-actina, foram obtidas com elevados graus de pureza.

III.2 – Análise das actividades enzimáticas do subfragmento-1 de miosina

Para além da caracterização das proteínas musculares isoladas, as actividades ATPásicas do S1 na presença de Ca^{2+} , K^+ /EDTA ou actina fornecem também bons critérios para avaliar respectivamente a qualidade da preparação do S1.

III.2.1 – Análise das actividades enzimáticas não fisiológicas do S1 – Ca^{2+} e K^+ /EDTA-ATPase

As actividades enzimáticas não fisiológicas do S1, dependentes de Ca^{2+} e de K^+ /EDTA, foram determinadas pela medição da quantidade de fosfato inorgânico libertado pela hidrólise de ATP, através do método de Fiske-Subbarow modificado, tal como indicado no ponto II.4.1 da secção dos Materiais e Métodos. Na **Figura III.2 – A e B**, encontram-se as curvas de progressão do fosfato inorgânico libertado em $\text{nmol PO}_4^{3-}/\text{mg S1}$ em função do tempo de reacção, para as actividades Ca^{2+} -ATPase e K^+ /EDTA-ATPase, respectivamente.

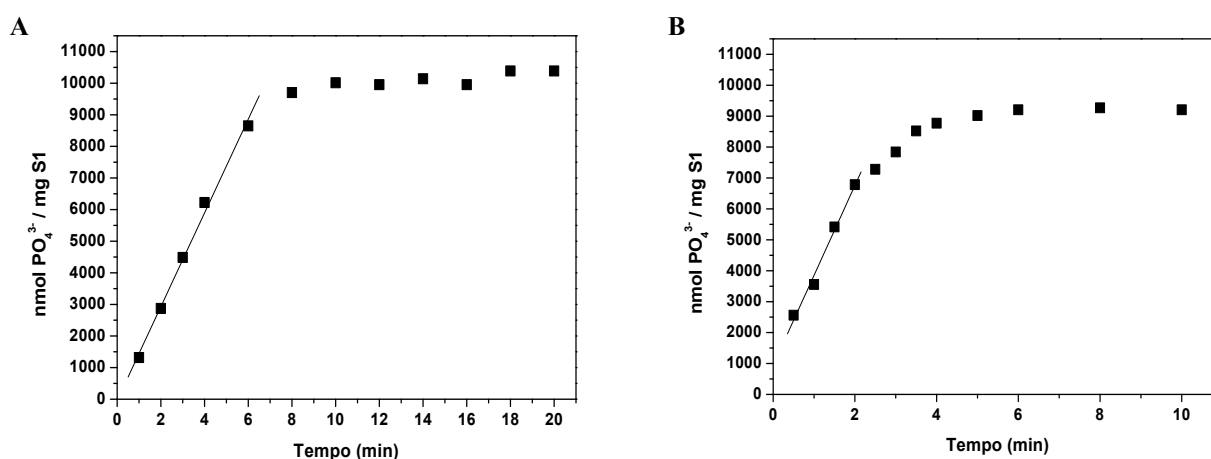


Figura III.2: Curvas de progressão do fosfato inorgânico libertado em $\text{nmol PO}_4^{3-}/\text{mg S1}$ em função do tempo de reacção, para as actividades Ca^{2+} -ATPase (**A**) e K^+ /EDTA-ATPase (**B**) do subfragmento-1 de miosina. Estas actividades foram determinadas pelo método colorimétrico de Fiske-Subbarow modificado, tal como se indica no ponto II.4.1 da secção dos Materiais e Métodos.

Na actividade não fisiológica Ca^{2+} -ATPase (**Figura III.2A**) observa-se um aumento linear de fosfato inorgânico até cerca de 6 minutos de reacção, enquanto que, para a actividade K^+ /EDTA-ATPase (**Figura III.2B**) o mesmo se verifica até cerca de 2 minutos de reacção. Após o correspondente tempo, para cada actividade nota-se que a quantidade do Pi libertado no meio reaccional é praticamente constante, o que indica que ao fim desses tempos é atingida a hidrólise total de ATP presente no meio. Com base no declive inicial dos gráficos, e sabendo que, por cada mol de ATP hidrolisado é libertado uma mol de Pi e outra mol de ADP, é então possível determinar as actividades não fisiológicas do S1. Os resultados referentes às actividades médias das actividades ATPásicas dependentes de Ca^{2+} e de K^+ /EDTA encontram-se na **Tabela III.1**.

Tabela III.1: Actividades não fisiológicas do subfragmento-1 de miosina dependentes de Ca^{2+} e de K^+ /EDTA, determinadas pelo método de Fiske-Subbarow modificado (n = 4).

Actividade não fisiológica	Actividade	
	nmol PO_4^{3-} /min.mg S1	s^{-1}
Ca^{2+} -ATPase	1218,37 ± 237,21	2,23 ± 0,43
K^+ /EDTA-ATPase	3012,41 ± 373,50	5,52 ± 0,68

De acordo com o descrito por Margossian e Lowey [1982], as actividades não fisiológicas dependentes de Ca^{2+} e de K^+ /EDTA devem ser de 2,4 e de 11,2 s^{-1} , respectivamente. Pela análise dos resultados obtidos no presente estudo, observa-se a existência de algumas diferenças relativamente aos valores reportados destas actividades. Estas diferenças podem ser explicadas por pequenas alterações nas condições da reacção cinética, uma vez que as actividades ATPásicas variam consoante a força iónica do meio, o valor de pH e a temperatura, pelo facto de influenciarem a velocidade de hidrólise do ATP. Adicionalmente, encontra-se relatado que uma preparação adequada do S1 apresenta uma actividade da K^+ /EDTA-ATPase superior, cerca de 3 vezes, à actividade da Ca^{2+} -ATPase [Sellers, 1999]. Verifica-se pela análise dos resultados obtidos que estes se encontram em consonância com os descritos, sendo a razão entre as actividades K^+ /EDTA e Ca^{2+} -ATPase obtida neste estudo de 2,47. Uma vez que as actividades não fisiológicas do S1 se encontram intimamente relacionadas com o estado de oxidação das duas cisteínas mais reactivas, Cys-707 (SH1) e Cys-697 (SH2) [Margossian e Lowey, 1982; Reisler, 1982], é possível constatar

que estes dois resíduos se encontram no estado reduzido, reflectindo assim a boa qualidade das preparações do S1.

III.2.2 – Análise da actividade enzimática fisiológica do S1 – Mg^{2+} -ATPase

As actividades enzimáticas Mg^{2+} -ATPase (basal) e Mg^{2+} -ATPase estimulada por proporções crescentes de F-actina (**Figura III.3**) foram determinadas através do método de enzimas acopladas PK/LDH, tal como referido no ponto II.4.2 da secção dos Materiais e Métodos.

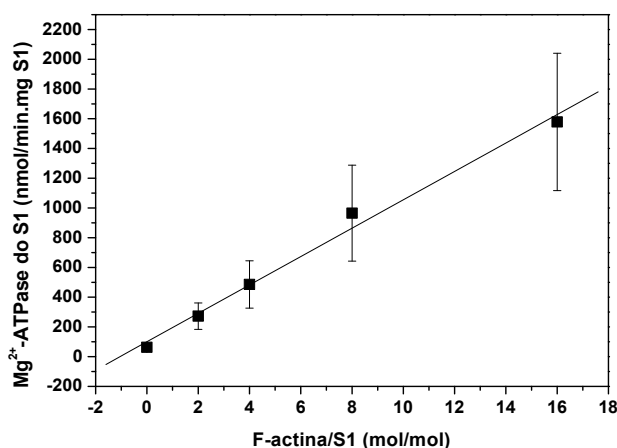


Figura III.3: Actividade Mg^{2+} -ATPase do subfragmento-1 de miosina estimulada por proporções crescentes de F-actina, determinada através do método das enzimas acopladas PK/LDH (n = 4).

Através do gráfico da **Figura III.3**, observa-se um aumento linear da actividade Mg^{2+} -ATPase do S1 consoante o aumento da quantidade de F-actina no meio reaccional, indicando que ainda não se atingiu a saturação desta actividade com 16 mol de F-actina para 1 mol de S1. De facto, os resultados obtidos encontram-se de acordo com os reportados por Ramos [2005], em que a saturação só é atingida para concentrações de F-actina equivalentes a 45 mol de F-actina por mol de S1. Adicionalmente, encontra-se descrito que na presença de F-actina a actividade Mg^{2+} -ATPase pode ser estimulada cerca de 50 a 100 vezes, dependendo das condições experimentais [Sellers, 1999]. Uma vez que para a concentração máxima de F-actina utilizada observa-se uma estimulação da Mg^{2+} -ATPase por F-actina de apenas 25 vezes, este facto reforça o exposto anteriormente. Para além das actividades não fisiológicas, as actividades ATPásicas dependentes de Mg^{2+} também podem ser utilizadas adicionalmente como critérios indicadores da qualidade das preparações do S1. Isto porque quando o grupo SH1 se encontra oxidado, a actividade Mg^{2+} -ATPase estimulada

por F-actina é inibida, enquanto que a actividade basal é potencialmente activada, e quando o grupo SH2 se encontra oxidado, tal como já referido, ocorre a perda completa de todas as actividades enzimáticas do S1 [Bobkova et al, 1999; Reisler, 1982; Sellers, 1999]. Uma vez que tais situações não se observam através da análise dos resultados obtidos, pode-se reafirmar que as duas cisteínas mais reactivas, Cys-707 (SH1) e Cys-697 (SH2), se encontram efectivamente no estado reduzido, reflectindo assim a boa qualidade das preparações do S1.

III.3 – Tratamento do subfragmento-1 de miosina com peroxinitrito sintético e optimização das condições de nitração

No presente estudo pretendeu-se investigar o efeito *in vitro* da nitração de tirosinas do S1 promovido por uma exposição aguda de peroxinitrito sintético, sendo necessário para tal efeito otimizar as condições de nitração. Esta optimização fundamenta-se essencialmente no deslocamento das reacções do ONOO⁻ de modo a beneficiar a formação de 3-nitrotirosinas em detrimento de outras modificações oxidativas, nomeadamente da oxidação de cisteínas do S1. Isto porque é sabido que oxidação das Cys altamente reactivas resulta na inibição de todas as actividades ATPásicas do S1 [Margossian e Lowey, 1982; Reisler, 1982] e, recentemente, foi demonstrado por Tiago et al [2006a] que o peroxinitrito inibe cerca de 50% da actividade Mg²⁺-ATPase do S1 estimulada por F-actina, sendo esta inibição provocada por consequência da oxidação das cisteínas altamente reactivas do S1.

Em primeiro lugar, a razão pela qual se optou por uma exposição aguda do S1 ao ONOO⁻ sintético em vez de uma exposição crónica com o composto 3-morfolinosidnonimina (SIN-1) na optimização das condições de nitração do S1, teve como base o trabalho desenvolvido anteriormente por Simão [2004], no qual foi verificado que a formação de 3-NT no S1 era potenciada com ONOO⁻ preparado sinteticamente. De facto, isto faz sentido uma vez que se encontra descrito que a formação de 3-NT pelo ONOO⁻ requer a formação do seu ácido conjugado, o ácido peroxinitrico (ONOOH), e os baixos valores de formação de 3-NT com o SIN-1 devem-se, possivelmente, às reacções de carácter competitivo entre o radical tirosilo e os radicais [•]NO ou [•]O₂⁻ [Van der Vliet et al, 1995]. Adicionalmente, encontra-se também relatado que a nitração é mais

eficiente apenas com o doador $\bullet\text{NO}$, do que com a coexistência simultânea de $\bullet\text{O}_2^-$ no meio envolvente [Pfeiffer e Mayer, 1998].

Assim, durante a optimização das condições de nitração, o S1 foi tratado com ONOO^- sintético, simulando uma exposição aguda ao S1, em três tampões de tratamento com elevada capacidade tampão mas com composições diferentes. A elevada capacidade tampão utilizada em todos os tampões de tratamento é justificada pelo facto do ONOO^- sintético ter sido preparado em 1,5 M NaOH, sendo esta solução com pH alcalino necessária à estabilização desta espécie reactiva de nitrogénio. Foram assim testadas três soluções tampão com composição diferente devido a estas poderem influenciar de forma diferenciada as reacções oxidativas e/ou nitrosativas promovidas pelo ONOO^- . Os tratamentos em TFP são considerados como controlo relativamente aos restantes tampões utilizados, uma vez que este tampão não interfere com as reacções do ONOO^- [Radi et al, 2001]. Isto deve-se ao facto de outros tampões vulgarmente utilizados, por se tratarem de tampões aminados como é o caso do Tris e do HEPES, reagirem com o ONOO^- inibindo assim os processos oxidativos [Gadelha et al, 1997] e podendo conduzir à formação de radicais intermediários e doadores de $\bullet\text{NO}$ [Kirsch et al, 1998; Schmidt et al, 1998], o que consecutivamente pode diminuir a eficiência de nitração. Por outro lado, encontra-se descrito que o ONOO^- reage com o dióxido de carbono/bicarbonato promovendo o aumento da formação de 3-nitrotirosinas nas proteínas [Gow et al, 1996a; Tien et al, 1999], razão pela qual também se efectuaram os tratamentos do S1 com ONOO^- em TFP+Bicarbonato. Pelo exposto, espera-se portanto um favorecimento da nitração de tirosinas no S1 pela seguinte ordem de meios de tratamento utilizados: Tris, TFP e TFP+Bicarbonato.

III.3.1 – Efeito do peroxinitrito nas actividades ATPásicas do subfragmento-1 de miosina

Os resultados obtidos referentes ao efeito do anião peroxinitrito nas actividades ATPásicas dependentes de Mg^{2+} após o tratamento do S1 com concentrações crescentes de ONOO^- (0; 0,1; 0,25; 0,5; 1 e 2 mM) nos diversos tampões de tratamento encontram-se ilustrados na **Figura III.4**. Começando por analisar os resultados correspondentes à actividade da Mg^{2+} -ATPase basal (**Figura III.4A**), verifica-se que em todos os tampões de tratamento ocorre uma estimulação desta actividade, embora existem algumas diferenças entre os vários tampões testados. De facto, em Tris e em TFP

observa-se primeiramente uma estimulação da Mg^{2+} -ATPase basal para baixas concentrações de $ONOO^-$, observando-se respectivamente para estes tampões uma activação máxima de cerca de 150 % e de 250 %. Contudo, a partir de uma concentração de $ONOO^-$ de 0,5 mM e de 1 mM respectivamente para Tris e TFP, nota-se que esta actividade começa a ser inibida consoante o aumento da concentração de $ONOO^-$. É conhecido que a modificação oxidativa dos grupos SH1 e SH2 têm efeitos opostos na actividade Mg^{2+} -ATPase basal, pois quando o grupo SH1 se encontra oxidado esta actividade é potencialmente activada (cerca de 7 vezes), e por outro lado, quando o grupo SH2 se encontra oxidado esta actividade é inibida (aproximadamente 4 vezes) [Bobkova et al, 1999]. Por comparação e através dos resultados obtidos, nestes dois tampões, é então colocada a hipótese que o grupo SH2 só começa a ser oxidado para concentrações de $ONOO^-$ acima de 0,5 mM e de 1 mM para Tris e TFP, respectivamente.

Para o TFP+Bicarbonato obteve-se uma estimulação de apenas 160 % com a concentração máxima de $ONOO^-$ testada (2 mM), sugerindo que a estimulação desta actividade está a ser desviada para concentrações superiores de $ONOO^-$. Consequentemente, é também sugerido que a oxidação do grupo SH2 provavelmente só ocorrerá para concentrações de $ONOO^-$ ainda mais elevadas. Sendo assim, consoante os resultados obtidos sugere-se que a nitração de tirosinas no S1 esteja a desviar a oxidação dos grupos SH1 e SH2 para concentrações superiores de $ONOO^-$, resultando na estimulação da actividade Mg^{2+} -ATPase basal, ou que adicionalmente a nitração de tirosinas no S1 tenha igualmente como consequência a activação desta actividade. Contudo, é importante referir que o $ONOO^-$ pode estar também a modificar outros resíduos no S1, nomeadamente as metioninas, e que as discrepâncias observadas nesta actividade basal possam ser de facto o resultado do somatório de diferentes efeitos, provenientes da modificação de vários aminoácidos no S1.

Relativamente à actividade da Mg^{2+} -ATPase estimulada por F-actina (**Figura III.4B**), verifica-se em todos os tampões de tratamento que o $ONOO^-$ apresenta um efeito inibitório bastante pronunciado desta actividade, sendo observado que consoante o aumento da concentração de $ONOO^-$ utilizada no tratamento do S1, maior é a inibição da actividade fisiológica do S1.

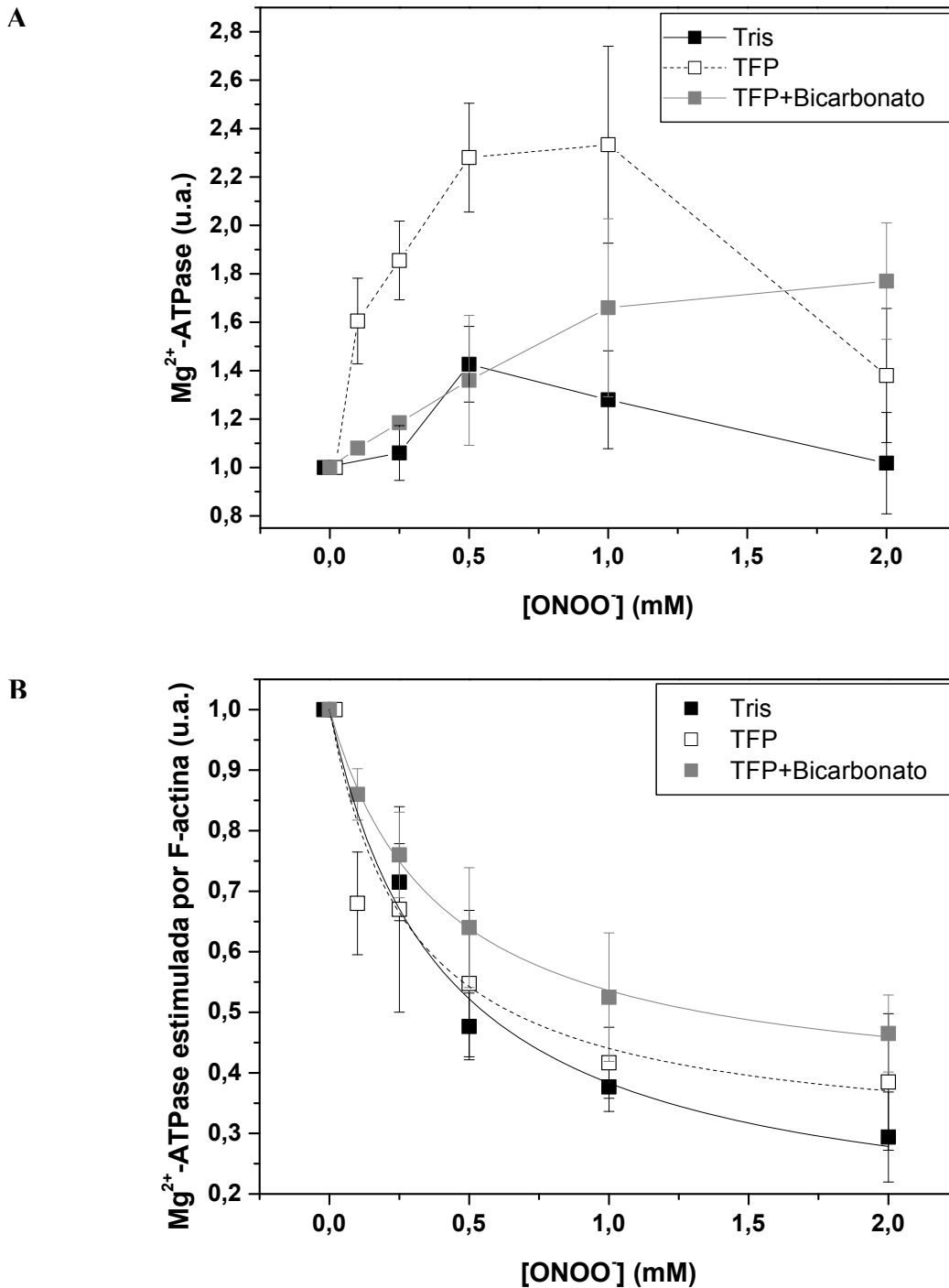


Figura III.4: Atividades ATPásicas dependentes de Mg^{2+} do S1 ($9,1 \mu M$) após tratamento com $ONOO^-$ (0; 0,1; 0,25; 0,5; 1 e 2 mM) à temperatura ambiente durante 5 minutos, nos diversos tampões de tratamento: (■) Tris (0,5 M Tris, pH 7,2), ($2 \leq n \leq 5$); (□) TFP (0,25 M K_2HPO_4 e 0,25 M KH_2PO_4 , pH 7,2), ($2 \leq n \leq 5$) e (■) TFP+Bicarbonato (0,25 M K_2HPO_4 , 0,25 M KH_2PO_4 e 25 mM $KHCO_3$, pH 7,2), ($n = 2$). (A): Mg^{2+} -ATPase basal e (B) Mg^{2+} -ATPase estimulada por F-actina. Esta actividade refere-se à razão entre a actividade Mg^{2+} -ATPase estimulada por F-actina e a actividade Mg^{2+} -ATPase basal. As actividades foram medidas espectrofotométricamente a 340 nm utilizando o método de enzimas acopladas PK/PDH, tal como se descreve no ponto II.4.2 da secção dos Materiais e Métodos.

Através destes resultados foi possível determinar a concentração inibitória a 50 % (IC₅₀) e a inibição máxima desta actividade, ajustando-se uma função hiperbólica modificada que corresponde ao modelo da cinética enzimática Michaelis-Menten ($y = y_0 - (P_1 \cdot x / P_2 + x)$), onde y é a actividade fisiológica do S1, y₀ é o valor controlo da actividade fisiológica do S1 (tratado com 0 mM ONOO⁻), P₁ é correspondente à inibição máxima da actividade, P₂ é o equivalente ao IC₅₀ e o x corresponde à concentração de ONOO⁻. Os respectivos valores de IC₅₀ e de inibição máxima para cada tampão de tratamento encontram-se apresentados na **Tabela III.2**.

Tabela III.2: Valores de IC₅₀ e de inibição máxima da actividade Mg²⁺-ATPase do S1 estimulada por F-actina nos diversos tampões utilizados, após tratamento com ONOO⁻ à temperatura ambiente durante 5 minutos.

Tampão	IC ₅₀ (mM)	Inibição máxima (%)
Tris	0,41 ± 0,10	87 ± 7
TFP	0,29 ± 0,04	72 ± 3
TFP+Bicarbonato	0,40 ± 0,03	65 ± 2

Pela análise dos IC₅₀ referentes a cada tampão de tratamento, pode-se constatar que estes são semelhantes, embora se verifique uma ligeira diminuição do IC₅₀ correspondente ao tratamento em TFP. A nível da inibição máxima atingida nota-se que esta parece estar relacionada com a composição dos tampões estudados, observando-se valores de inibição máxima decrescentes respectivamente para os tampões de tratamento na seguinte ordem: Tris, TFP e TFP+Bicarbonato, ou seja, a ordem esperada de favorecimento da nitração. Segundo os resultados obtidos sugere-se que poderá estar a ocorrer um efeito protector na inibição da actividade fisiológica do S1, pelo facto de se estar a desviar as vias de reacção do ONOO⁻ no favorecimento da nitração de tirosinas e em detrimento de outras modificações oxidativas, nomeadamente a oxidação de cisteínas.

Em estudos anteriores, verificou-se que a oxidação do S1 por uma exposição crónica ao ONOO⁻, derivado da decomposição do composto SIN-1, resulta na inibição da actividade Mg²⁺-ATPase estimulada por F-actina apresentando um valor de IC₅₀ de 46,7 ± 8,3 μM SIN-1 para 8,7 μM S1, isto é, uma razão de 5,4 mol SIN-1/mol S1 [Tiago et al, 2006a]. Porém, neste trabalho obteve-se uma razão de 45 mol ONOO⁻/mol S1 para a inibição da mesma actividade por uma exposição aguda a ONOO⁻ sintético. Para além disto, observou-se também que a inibição máxima atingida no S1 foi aproximadamente de 90 % com 500 μM de SIN-1 [Tiago et al, 2006a], enquanto que no presente estudo esta percentagem de inibição só é atingida com a concentração máxima de

ONOO⁻ testada (2 mM). Por comparação dos resultados obtidos neste trabalho com os reportados por Tiago et al [2006a], pode-se sugerir que uma exposição crónica do S1 ao ONOO⁻ é mais eficaz do que uma exposição aguda na inibição da actividade fisiológica do S1. Adicionalmente, uma vez que o ONOO⁻ é uma espécie química com um tempo de meia vida bastante curto a pH fisiológico, menor do que 1 s em soluções tampões a pH 7 [Murphy et al, 1998] e menor do que 0,1 s no citosol [Koppenol et al, 1992; Radi, 1998], a eficiência do tratamento com ONOO⁻ sintético por exposição aguda (apenas com uma única adição do ONOO⁻) será muito menor do que a esperada por condições onde este é formado lenta e continuamente, tal como acontece numa exposição crónica com o agente SIN-1. Para além disto, é também de referir que no presente estudo e no anteriormente realizado por Tiago et al [2006a], os valores de pH dos meios de tratamento onde o S1 é exposto ao ONOO⁻ são diferentes, sendo estes valores de 7,2 e 8,5, respectivamente. De facto, uma vez que o ONOO⁻ é mais estável em soluções com pH alcalino, sugere-se então que no estudo anterior esta RNS encontrava-se mais estável, resultando conseqüentemente numa inibição mais pronunciada da actividade fisiológica do S1 com concentrações inferiores de ONOO⁻, comparativamente ao presente trabalho.

III.3.2 – Modificações nos resíduos do subfragmento-1 de miosina por exposição a peroxinitrito

O peroxinitrito por se tratar de um poderoso agente oxidante, sendo muito mais reactivo do que os seus precursores, pode alterar a estrutura e a função de várias proteínas devido à sua reactividade e conseqüente modificação tanto nitrosativa como oxidativa de diversos aminoácidos na cadeia peptídica. De modo a determinar quais as alterações moleculares e, consecutivamente, desvendar qual o seu envolvimento a nível funcional nas actividades do S1, no presente estudo também se analisou o efeito do ONOO⁻ nos resíduos do S1, nomeadamente nas tirosinas e nas cisteínas. De facto, já é conhecido que o ONOO⁻ provoca a oxidação de cisteínas tendo como conseqüência a inibição da actividade fisiológica do S1 [Tiago et al, 2008], no entanto a correlação entre a nitração de tirosinas nesta proteína com modificações funcionais e estruturais ainda não se encontra esclarecida.

III.3.2.1 – Efeito do peroxinitrito na nitração de tirosinas do subfragmento-1 de miosina

O peroxinitrito, tal como já foi referido anteriormente, pode promover vários tipos de reacções de carácter oxidativo e nitrosativo em diferentes resíduos de aminoácidos nas proteínas [Alvarez e Radi, 2003; Ischiropoulos e Al-Mehdi, 1995; Radi, 2004]. Adicionalmente, encontra-se também descrito que esta RNS apresenta uma elevada afinidade para nitrar os resíduos de tirosina, resultando numa modificação pós-traducional destes resíduos em 3-nitrotirosinas [Beckman e Koppenol, 1996]. Nos últimos anos, o efeito da nitração de tirosinas nas proteínas tem sido bastante discutido, de forma a elucidar se a formação de 3-NT tem consequências a nível funcional, ou se simplesmente se trata de um biomarcador associado ao stresse nitrosativo. A acumulação de estudos indica que a citotoxicidade provocada pelo peroxinitrito encontra-se relacionada com a sua capacidade para nitrar os resíduos de tirosina nas proteínas [Crow e Beckman, 1995; Pacher et al, 2007], sendo então sugerido que a formação de 3-NT é uma modificação pós-traducional com importantes consequências a nível funcional, resultando numa forte ligação com o mecanismo envolvido no desenvolvimento de doenças [Ischiropoulos, 2003; Schopfer et al, 2003; Souza et al, 2008]. De facto, na maioria dos estudos publicados, a nitração de tirosinas encontra-se relacionada com uma significativa perda de função das proteínas nitradas. A título de exemplo, o ONOO⁻ promove a nitração de Tyr e consequentemente provoca a inibição das proteínas superóxido dismutase (Mn-SOD) [MacMillan-Crow et al, 1996, 1998; Yamakura et al, 1998; Demicheli et al, 2007], tirosina hidroxilase [Ara et al, 1998; Blanchard-Fillion et al, 2001], creatina cinase [Mihm et al, 2001a; Mihm e Bauer, 2002], glutathione reductase [Francescutti et al, 1996], glutamina sintetase [Berlett et al, 1998], prostaciclina sintetase [Zou et al, 1997; Schmidt et al, 2003], entre outras. Portanto, pelo facto da formação de 3-NT inibir a função de várias proteínas, que podem resultar ou não de alterações estruturais, a quantificação de 3-NT no S1 após uma exposição aguda ao ONOO⁻ apresenta extrema relevância de forma a esclarecer o seu envolvimento a nível funcional na proteína em estudo.

De modo a quantificar a formação de 3-NT nas amostras do S1 tratadas com ONOO⁻ foi necessário determinar previamente o respectivo coeficiente de extinção molar nos meios de reacção utilizados. Nesse sentido, construíram-se rectas de calibração (Abs_{415nm} em função [3-nitro-L-tirosina] (μM)) nas duas soluções tampão de tratamento do S1, ou seja, em Tris e em TFP (**Figura**

III.6), e através dos declives das rectas de calibração obtiveram-se os valores de ϵ_{415} de 3330,00 e de 3056,67 $M^{-1}.cm^{-1}$, respectivamente. É relevante referir que não foi determinado o coeficiente de extinção molar de 3-NT em TFP+Bicarbonato, uma vez que em estudos anteriores se verificou que o valor do coeficiente de extinção molar não sofria qualquer alteração com a presença de bicarbonato em solução [Ramos, 2005].

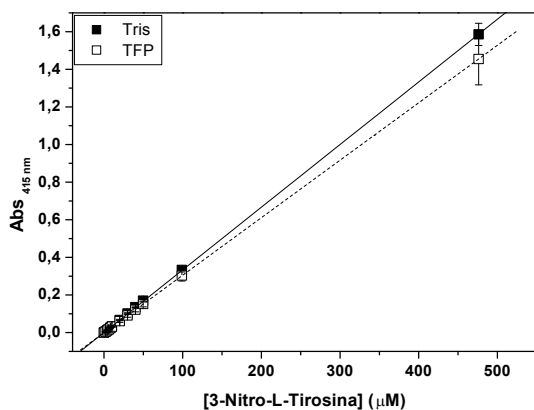


Figura III.6: Rectas de calibração utilizadas para determinar o coeficiente de extinção molar de 3-NT a 415 nm nos tampões de tratamento: (■) Tris (0,5 M Tris, pH 7,2), Equação da regressão linear: $y = 0,00333x + 4,94425 \times 10^{-4}$; Coeficiente de correlação: $r = 0,99999$; ($n = 9$); e (□) TFP (0,25 M K_2HPO_4 e 0,25 M KH_2PO_4 , pH 7,2), Equação da regressão linear: $y = 0,003056x - 3,08688 \times 10^{-4}$; Coeficiente de correlação: $r = 1$ ($n = 9$). Para ambos os casos, os valores foram obtidos em triplicado a partir de 3 soluções stock de 3-nitro-L-tirosina com uma concentração de 10 mM.

Utilizando-se os valores anteriormente estimados, foi então possível efectuar a quantificação de 3-NT no S1, de acordo com o descrito no ponto II.8.2 da secção dos Materiais e Métodos. Os resultados obtidos referentes ao efeito do peroxinitrito na formação de 3-NT no S1, após o tratamento da proteína de interesse com concentrações de $ONOO^-$ (0; 0,1; 0,25; 0,5; 1 e 2 mM) nos diversos tampões de tratamento, encontram-se representados na **Figura III.7**.

Em geral, verifica-se que o $ONOO^-$ promove a nitração de Tyr no S1, ocorrendo a formação de 3-NT nesta proteína em todos os tampões de tratamento analisados. Adicionalmente, também é possível observar-se que a nitração é favorecida quando o S1 se encontra em TFP (tanto na ausência como na presença de bicarbonato), sendo a formação de 3-NT neste meio cerca de 4 vezes superior relativamente ao meio Tris. Uma possível explicação para tal efeito pode dever-se ao facto do $ONOO^-$ reagir com o tampão Tris, tendo como consequência a inibição dos processos oxidativos [Gadelha et al, 1997], e simultaneamente, pode também ocorrer um desvio das reacções nitrosativas induzidas por esta RNS, tal como já fora discutido anteriormente. Por comparação com os resultados obtidos no presente estudo, relativos à inibição da actividade fisiológica do S1, é possível constatar-se que em TFP foram formadas 2 mol 3-NT/mol S1, enquanto que em Tris apenas se nota a formação de 0,3 mol 3-NT/mol S1, quando a actividade da Mg^{2+} -ATPase do S1 estimulada por F-

actina é inibida 50 %. Segundo os resultados desta comparação é assim sugerido que, aparentemente, a nitração de tirosinas no S1 não contribui para a inibição da actividade Mg^{2+} -ATPase do S1 estimulada por F-actina.

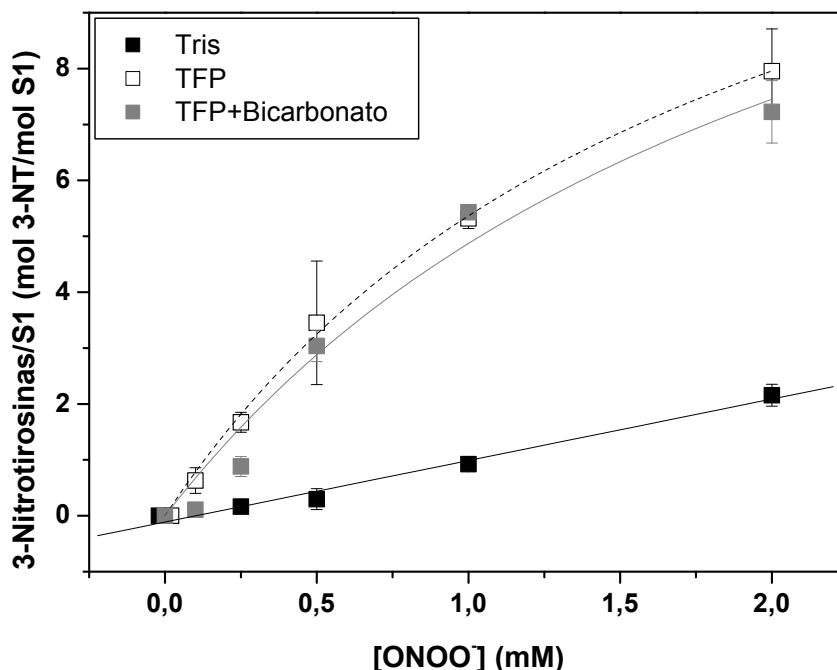


Figura III.7: 3-Nitrotirosinas formadas no S1 (9,1 μ M) após tratamento com $ONOO^-$ (0; 0,1; 0,25; 0,5; 1 e 2 mM) à temperatura ambiente durante 5 minutos, nos diversos tampões de tratamento: (■) Tris (0,5 M Tris, pH 7,2), ($2 \leq n \leq 5$); (□) TFP (0,25 M K_2HPO_4 e 0,25 M KH_2PO_4 , pH 7,2), ($2 \leq n \leq 5$) e (■) TFP+Bicarbonato (0,25 M K_2HPO_4 , 0,25 M KH_2PO_4 e 25 mM $KHCO_3$, pH 7,2), ($n = 2$). A formação de 3-NT no S1 foram quantificadas espectrofotometricamente a 415 nm ($\epsilon_{415} = 3330,00 M^{-1}.cm^{-1}$ em Tris; $\epsilon_{415} = 3056,67 M^{-1}.cm^{-1}$ em TFP), de acordo com o descrito no ponto II.8.2 da secção dos Materiais e Métodos.

Com base nos resultados relativos ao efeito do $ONOO^-$ na formação de 3-NT no S1, nos diversos tampões de tratamento, determinou-se ainda o IC_{50} ajustando a função hiperbólica correspondente ao modelo da cinética enzimática Michaelis-Menten ($y = P_1.x/P_2+x$), sendo os respectivos valores de IC_{50} para cada tampão apresentados na Tabela III.3. É de referir que tal aferição não foi possível de efectuar para os valores obtidos em Tris, uma vez que se observa uma correlação linear entre a formação de 3-NT/S1 e a concentração de $ONOO^-$. Isto significa que a saturação da formação de 3-NT ainda não foi atingida para a concentração máxima de $ONOO^-$ testada (2 mM), logo o valor de IC_{50} da formação de 3-NT em Tris será substancialmente superior.

Tabela III.3: Valores de IC_{50} da formação de 3-NT no S1 nos tampões TFP e TFP+Bicarbonato, após tratamento com $ONOO^-$ à temperatura ambiente durante 5 minutos.

Tampão	IC_{50} (mM)
TFP	$1,87 \pm 0,22$
TFP+Bicarbonato	$2,25 \pm 1,16$

Através da análise dos valores de IC_{50} , que neste caso em particular correspondem à concentração de $ONOO^-$ que promove a nitração de metade dos resíduos de tirosina, pode-se apurar que a nitração dos resíduos de Tyr no S1 é sensivelmente a mesma tanto na ausência como na presença de bicarbonato em TFP, tendo em consideração os devidos erros experimentais. Porém, este efeito não se encontra de acordo com o descrito anteriormente por Tien e colaboradores [1999], cujo autor afirma, numa proteína diferente da utilizada no presente estudo, que a nitração de Tyr da glutamina sintetase a pH 7,5 depende da presença de dióxido de carbono (CO_2), enquanto que a pH 8,6 o CO_2 apresenta um pequeníssimo efeito ou não influencia o processo de nitração mediado pelo $ONOO^-$. Uma vez que o S1 é tratado com $ONOO^-$ preparado sinteticamente, que por sua vez se encontra numa solução extremamente alcalina, poderia-se, porventura, pôr em causa se a elevada capacidade tampão utilizada nos diversos tampões de tratamento era suficientemente forte para garantir o pH 7,2 desejado. No entanto, esta dúvida fora esclarecida no presente estudo, pois tal como referido anteriormente, foram verificadas as variações de pH antes e após os tratamentos do S1 com $ONOO^-$, tendo-se registado uma variação máxima de 0,38 unidades (desde pH 7,20 a pH 7,58). Adicionalmente, encontra-se descrito que os níveis de CO_2 presente em soluções ou em sistemas tampões equilibrados ao ar podem variar, sendo estes dependentes da composição da solução, da força iónica e da temperatura [Radi et al, 2001]. Por exemplo, em 50 mM de tampão fosfato (pH 7,4) equilibrado ao ar encontram-se normalmente valores de CO_2 entre 5 a 10 μM [Radi et al, 1999]. O facto de neste trabalho o S1 em TFP ter sido equilibrado ao ar durante as dialíses e nos respectivos tratamentos com $ONOO^-$, poderá ter contribuído para a presença de bicarbonato na solução tampão. Coloca-se então, segundo os resultados obtidos, a hipótese da concentração de bicarbonato atingida no tampão equilibrado ao ar ser correspondente ao ponto de saturação de favorecimento da formação de 3-NT no S1, ou seja, concentrações de bicarbonato superiores à criada pela exposição do tampão ao ar não proporcionam um aumento significativo da formação de 3-NT no S1.

Curiosamente, em proteínas distintas, verificam-se diferentes tendências de formação de 3-NT dependentes do pH, da presença de CO_2 /bicarbonato no meio, da composição da solução tampão e da força iónica [Tien et al, 1999; Gow et al, 1996a]. Verifica-se ainda, que em sistemas controlo utilizando-se apenas DL-tirosina como alvo de nitração pelo $ONOO^-$ e na ausência de bicarbonato,

a tendência apresentada nem sempre corresponde às anteriormente observadas nas proteínas. Neste sistema, é sugerido que existe uma competição entre a formação de ditirosinas e de 3-NT pelo ONOO^- , cuja formação de ditirosinas é beneficiada consoante o aumento do pH para valores superiores a 7 [Van der Vliet et al, 1995]. De facto, as diferentes tendências de formação de 3-NT em proteínas e em sistemas controlo fazem sentido, uma vez que se encontra descrito que o ambiente aquoso ou hidrofóbico onde a tirosina alvo se encontra pode influenciar o mecanismo de formação de 3-NT [Bartessaghi et al, 2007]. Estes resultados apontam assim para o facto de cada proteína possuir um comportamento singular quando sujeita ao ONOO^- no que diz respeito ao favorecimento da nitração, sendo esta dependente de cada um dos vários factores acima mencionados. Portanto, tendo em consideração que cada proteína é constituída por diferente número de resíduos tirosina e a exposição deste resíduos ao solvente ser variável, é então sugerido que a nitração de tirosinas de determinada proteína é condicionada primeiramente pelo pH, presença de CO_2 /bicarbonato, composição e força iónica da solução tampão, e secundariamente, por outras variáveis como o tipo de exposição da proteína ao ONOO^- (aguda ou crónica) e a respectiva concentração desta RNS.

Sendo assim, consoante o sugerido acima, pode-se justificar em parte os diferentes valores obtidos para a formação de 3-NT no S1 no presente trabalho, relativamente ao estudo publicado anteriormente por Tiago et al [2006a]. Neste verificam-se valores muitíssimo inferiores referentes à formação de 3-NT no S1, sendo as possíveis razões para tal efeito diferenças no que diz respeito a: a) composição e a força iónica dos tampões de tratamento; b) pH dos tampões de tratamento, 7,2 versus 8,5; c) tipo de exposição do S1 ao ONOO^- , ou seja, exposição aguda com ONOO^- versus exposição crónica com SIN-1.

III.3.2.2 – Identificação dos domínios proteolíticos do subfragmento-1 de miosina nitrados pelo peroxinitrito

Uma vez que se verifica que uma exposição aguda do S1 ao ONOO^- resulta na formação significativa de 3-NT, pretendeu-se monitorizar que domínios proteolíticos deste subfragmento seriam mais susceptíveis a sofrer nitração. Nesse sentido, procedeu-se conforme o descrito no ponto II.9 da secção dos Materiais e Métodos, sendo os resultados obtidos apresentados na **Figura III.8**.

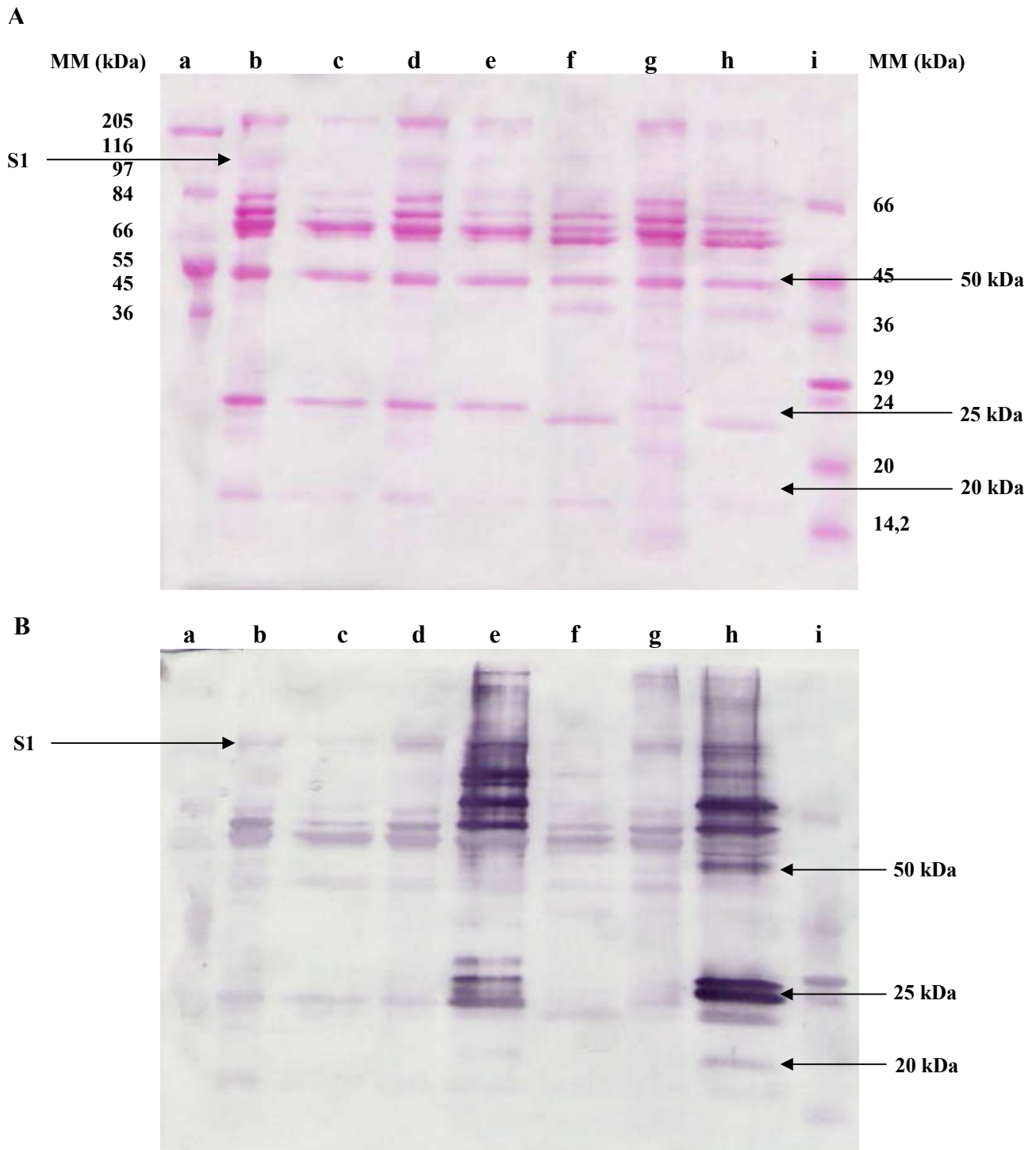


Figura III.8: Detecção dos domínios proteolíticos do S1 nitrados por exposição aguda ao ONOO^- à temperatura ambiente durante 5 minutos em TFP. **(A):** Membrana de nitrocelulose corada com solução de Ponceau, possibilitando a visualização das proteínas. Estas foram previamente separadas em gel de SDS-PAGE (12 % acrilamida) e transferidas para a membrana por electrotransferência, conforme se descreve no ponto II.9.2 da secção do Materiais e Métodos. **(B):** Revelação colorimétrica do respectivo imunoblot, permitindo a monitorização dos níveis de formação de 3-NT nos diferentes domínios proteolíticos do S1. Nos poços a) e i) encontram-se 10 μL dos marcadores de alta (36 – 205 kDa) e de baixa (6,5 – 66 kDa) massa molecular, respectivamente. No poço b) encontra-se 10 μg de S1 stock. Os poços c) e f) correspondem a 10 μg do S1 sem tratamento com ONOO^- (controlo). Os poços d) e g) contêm 10 μg do S1 tratado com 0,1 mM ONOO^- , e os poços e) e h) correspondem a 10 μg do S1 tratado com 0,25 mM ONOO^- . As amostras proteicas pertencentes aos poços f), g) e h) foram sujeitas posteriormente ao tratamento com ONOO^- , à digestão com tripsina durante 45 minutos à temperatura ambiente. As setas indicam as bandas referentes ao S1 e os respectivos domínios proteolíticos do S1 (fragmentos de 50, 25 e 20 kDa) quando este é digerido com tripsina.

A digestão do S1 com tripsina conduz a uma fragmentação específica desta proteína, originando três domínios proteolíticos distintos: um fragmento central de 50 kDa; um fragmento N-terminal de 25 kDa e um fragmento C-terminal de 20 kDa (Figura III.8A), que podem ser devidamente separados por SDS-PAGE [Rayment, 1996; Lowey et al, 1969]. Posteriormente detectou-se a formação de 3-NT por *Western Blot* utilizado um anticorpo primário específico para as 3-NT (Figura III.8B). Pela análise desta figura é possível constatar maiores níveis de nitração quando o S1 é tratado com 0,25 mM ONOO⁻ (poços e) e h)) pelo facto de se visualizar um aumento significativo das bandas, relativamente ao tratamento do S1 com 0,1 mM ONOO⁻ (poços d) e g)) assim como ao S1 na ausência de tratamento (poços b), c) e f)). Examinando apenas a amostra proteica de S1 tratada com 0,25 mM ONOO⁻, verifica-se que após a sua digestão com tripsina (poço h) ocorre intensificação das bandas correspondentes aos fragmentos proteolíticos de 25 e 50 kDa, sendo observada efectivamente uma banda muito mais intensa no domínio de 25 kDa. Estes resultados encontram-se em concordância com os demonstrados por Tiago et al [2006a], onde o autor refere que a formação de 3-NT ocorre no fragmento de S1 de 25 kDa. Uma possível justificação para este resultado é o facto de este ser o domínio catalítico que possui maior número de tirosinas [Rayment et al, 1993; Rayment, 1996] e, de possivelmente, estes resíduos encontrarem-se mais expostos ao solvente, em relação aos outros dois domínios proteolíticos do S1. O facto de no presente estudo se ter verificado também a nitração do domínio de 50 kDa, pode ser explicado por se ter utilizado uma condição cuja nitração de tirosinas é favorecida (exposição aguda do S1 em meio TFP a 0,25 mM ONOO⁻).

Curiosamente, num estudo recente foram identificadas quatro resíduos de tirosinas (Tyr-114, Tyr-116, Tyr-134 e Tyr-142) nitradas na cadeia pesada de miosina, extraída a partir de músculo cardíaco de ratos velhos (com 34 meses) [Hong et al, 2007]. De facto, é de salientar que a localização destas tirosinas nitradas *in vivo* é consistente com a nitração no domínio proteolítico do S1 de 25 kDa, onde foi verificado *in vitro*, no presente estudo e no anteriormente reportado por Tiago et al [2006a], a ocorrência de maiores níveis de nitração por exposição desta proteína ao ONOO⁻.

Actualmente, não existe uma aparente sequência consenso de aminoácidos ou qualquer padrão definido na estrutura primária das proteínas que determine a ocorrência da nitração de tirosinas [Souza et al, 1999; Kanski et al, 2005a]. No entanto, foram reveladas algumas características comuns à nitração de tirosinas: 1) a presença de um ou mais resíduos carregados negativamente (glutamato (Glu) ou aspartato (Asp)) próximos da tirosina alvo; 2) um pequeno número de cisteínas e metioninas na vizinhança da tirosina nitrada; e 3) predominância de nitração de tirosinas nos loop da estrutura tridimensional das proteínas (presença de aminoácidos como a glicina (Gly) e a prolina (Pro) próximos do local de nitração) [Souza et al, 1999]. No sentido de investigar se algumas destas características se encontram presentes nas tirosinas nitradas que foram recentemente identificadas *in vivo* e que são consistentes com a nitração no domínio de 25 kDa, realizou-se a análise da estrutura tridimensional do S1 utilizando ferramentas bioinformáticas. Uma vez que a estrutura cristalográfica de miosina de coelho ainda não se encontra resolvida, utilizou-se nesta análise a estrutura 3D do S1 de galinha (PDBid: 2MYS), pelo facto de ter sido demonstrado anteriormente por Tiago [2005], que a sequência primária do S1 de galinha apresenta o maior grau de homologia comparativamente com a de coelho (Identidade = 90,5 %; Semelhança = 94,8 %; gaps = 0,5 %). Primeiramente, é de referir que os resíduos de tirosinas 116, 118, 135 e 143 no subfragmento-1 de miosina de galinha, correspondem às tirosinas 114, 116, 134 e 142 de miosina de ratos. Na **Figura III.9** é possível observar a estrutura 3D do S1 onde se apresenta a distribuição de moléculas de tirosina. Pela análise da figura verifica-se uma predominância de resíduos de tirosina no domínio proteolítico do S1 de 25 kDa (amarelo). Para além disso, constata-se que este domínio é constituído por vários *loops* o que resulta efectivamente numa maior exposição dos resíduos de tirosinas à nitração por parte do ONOO⁻.

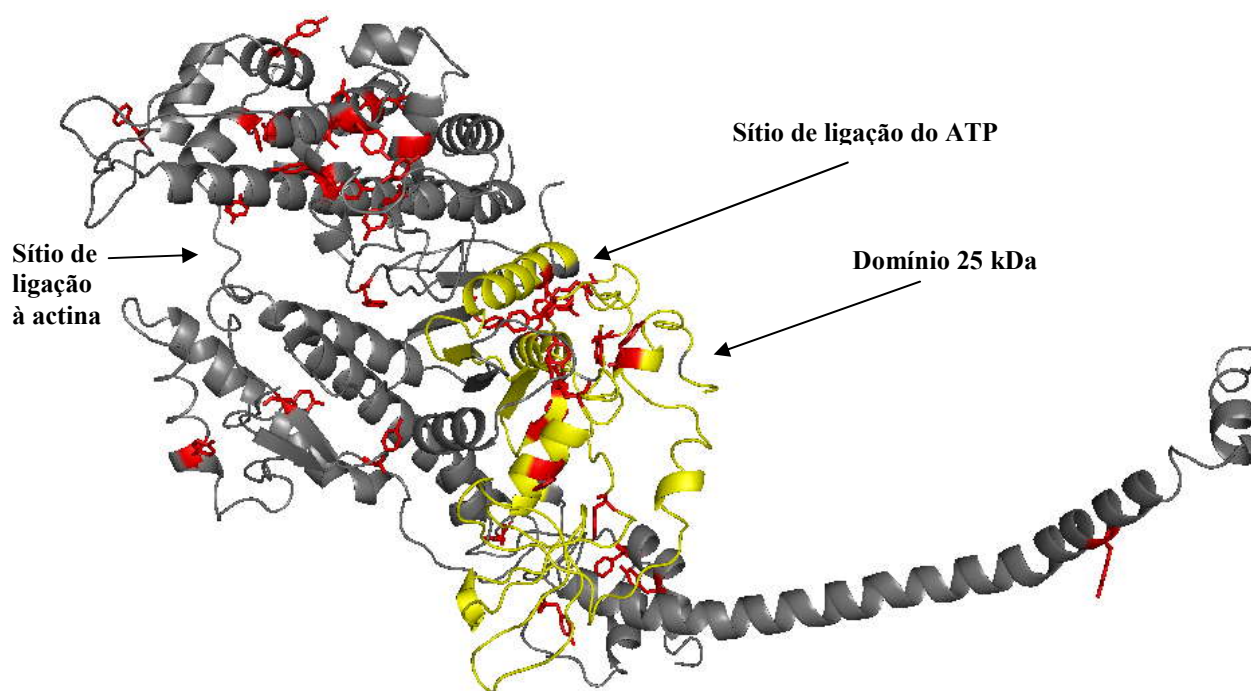


Figura III.9: Localização na estrutura tridimensional do S1 de galinha (PDBid 2MYS) de todos os resíduos de tirosinas que constituem este fragmento. A estrutura 3D do S1 está representada em *cartoon* cinzento, sendo destacado o domínio proteolítico do S1 de 25 kDa a *cartoon* amarelo. Todos os resíduos de tirosina constituintes deste subfragmento encontram-se representados em *sticks* vermelhos.

Numa análise pormenorizada às tirosinas 116, 118, 135 e 143 localizadas no domínio de 25 kDa do S1 (**Figura III.10**) observa-se que a Tyr-135 e a Tyr-143 se encontram efectivamente num loop, e para além disso verifica-se que a Tyr-143 se encontra na proximidade de um aspartato com uma distância de 3,37 Å (distancia calculada através do programa PyMOL). Por outro lado, apesar das Tyr-116 e Tyr-118 não se encontrarem em *loop* mas numa folha β , estas encontram-se próximas de resíduos carregados negativamente, nomeadamente do Glu-89 com distâncias de 5,37 Å e de 2,58 Å, assim como do Asp-90 com distancias de 8,20 Å e de 3,21 Å, respectivamente.

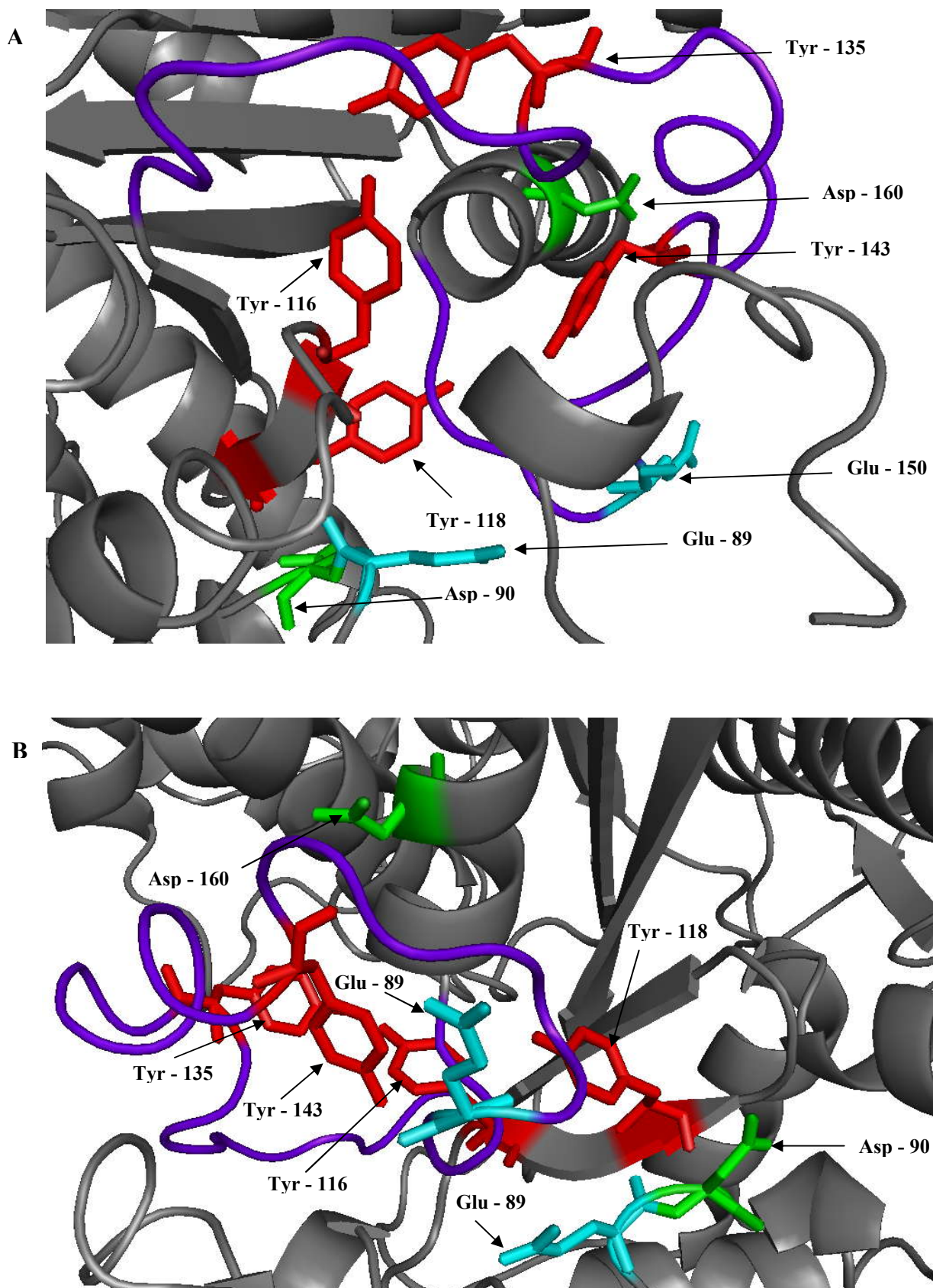


Figura III.10: Localização pormenorizada das tirosinas 116, 118, 135 e 143 na estrutura tridimensional do S1 de galinha (PDBid 2MYS). (A): vista frontal e (B): vista posterior. A estrutura 3D do S1 está representada em *cartoon* cinzento. As tirosinas (Tyr), os aspartatos (Asp) e os glutamatos (Glu) encontram-se representadas em *sticks* vermelhos, verdes e azuis, respectivamente. A roxo encontra-se evidenciado o *loop*. (resíduos de 127 a 154).

III.3.2.3 – Efeito do peroxinitrito na oxidação de cisteínas do subfragmento-1 de miosina

Os aminoácidos que contêm átomos de enxofre são os mais susceptíveis à oxidação, o que torna as cisteínas um dos principais alvos do ONOO^- [Alvarez e Radi, 2003]. Os grupos $-\text{SH}$ das cisteínas são os que reagem mais rápido e directamente com o ONOO^- , sendo assim considerada esta reacção induzida pelo ONOO^- a que ocorre com maior prevalência [Radi et al, 1991]. Encontra-se descrito que a oxidação, mediada pelo ONOO^- , de resíduos específicos de cisteínas conduz à inactivação de várias proteínas envolvidas em processos energéticos celulares, incluindo a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase [Buchczyk et al, 2003; Souza e Radi, 1998], a creatina cinase [Konorev et al, 1998], o complexo I (NADH desidrogenase), o complexo II (sucinato desidrogenase), e o complexo III (citocromo c redutase), bem como o complexo V (ATP sintetase) da cadeia respiratória mitocondrial [Radi et al, 2002a; Radi et al, 2002b; Radi et al, 1994]. Para além destas proteínas, foi também demonstrado para as proteínas do sistema contráctil, especificamente a miosina e a actina, um efeito inibitório bastante pronunciado a nível da função de ambas as proteínas [Tiago et al, 2006a; Tiago et al, 2006b], que se atribuiu à oxidação das cisteínas. Uma vez que no presente trabalho se pretende desviar as reacções do ONOO^- no sentido de beneficiar a nitração de tirosinas no S1 em detrimento de outras modificações moleculares, nomeadamente a oxidação de cisteínas, para além da quantificação de 3-NT, a quantificação das cisteínas reduzidas no S1 consiste num parâmetro indispensável.

O S1 é constituído por 11 cisteínas, dos quais dois resíduos, Cys-707 e Cys-697, são mais reactivos que os restantes e são usualmente designados de SH1 e SH2, respectivamente, pela ordem da sua reactividade química. De facto, estes dois resíduos também são denominados por cisteínas “rápidas”, uma vez que reagem com o DNTB em menos de 30 segundos por se encontrarem expostos ao solvente. As cisteínas totais correspondem ao conjunto das 11 cisteínas que só reagem totalmente com o DTNB quando ao S1 é adicionado SDS, uma vez que este detergente proporciona a desnaturação e, conseqüentemente, a exposição ao solvente de todos os resíduos de cisteínas que anteriormente se encontravam no interior desta proteína [Tiago et al, 2006a].

De forma a quantificar as cisteínas nas amostras do S1 tratadas com ONOO^- , foi necessário determinar previamente o respectivo coeficiente de extinção molar do DTNB nos meios de reacção usados. Com esse intuito, construíram-se rectas de calibração ($\text{Abs}_{412\text{nm}}$ em função [DL-cisteína]

(μM) nas duas soluções tampão de tratamento do S1, ou seja, em Tris e em TFP (Figura III.11), e através dos declives das rectas de calibração obtivera-se os valores de ϵ_{412} de 13,86 e de 14,22 $\text{mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, respectivamente.

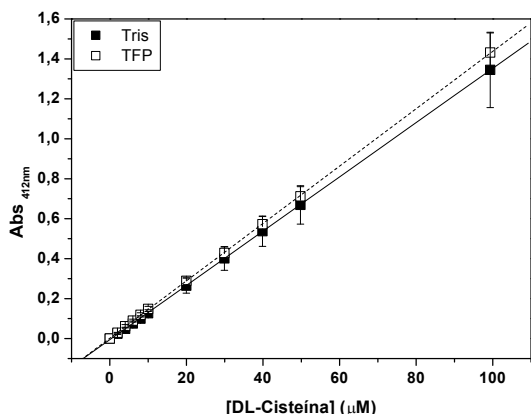


Figura III.11: Rectas de calibração utilizadas para determinar o coeficiente de extinção molar do DTNB a 412 nm nos tampões de tratamento: (■) Tris (0,5 M Tris, pH 7,2), Equação da regressão linear: $y = 0,01386x - 0,0055$; Coeficiente de correlação: $r = 0,99998$ ($n = 9$); e (□) TFP (0,25 M K_2HPO_4 e 0,25 M KH_2PO_4 , pH 7,2), Equação da regressão linear: $y = 0,01422x + 0,00166$; Coeficiente de correlação: $r = 0,99998$ ($n = 9$). Para ambos os casos, os valores foram obtidos em triplicado a partir de 3 soluções stock de DL-cisteína com uma concentração de 15 mM.

Através dos valores adquiridos anteriormente, de modo a realizar a quantificação dos resíduos de cisteínas reduzidas no S1, procedeu-se consoante o descrito no ponto II.10.2 da secção dos Materiais e Métodos. Os resultados obtidos correspondentes à quantificação das cisteínas reduzidas no S1, após o tratamento desta proteína com diferentes concentrações de ONOO^- (0; 0,1; 0,25; 0,5; 1 e 2 mM) nos diversos tampões de tratamento, encontram-se representados na Figura III.12.

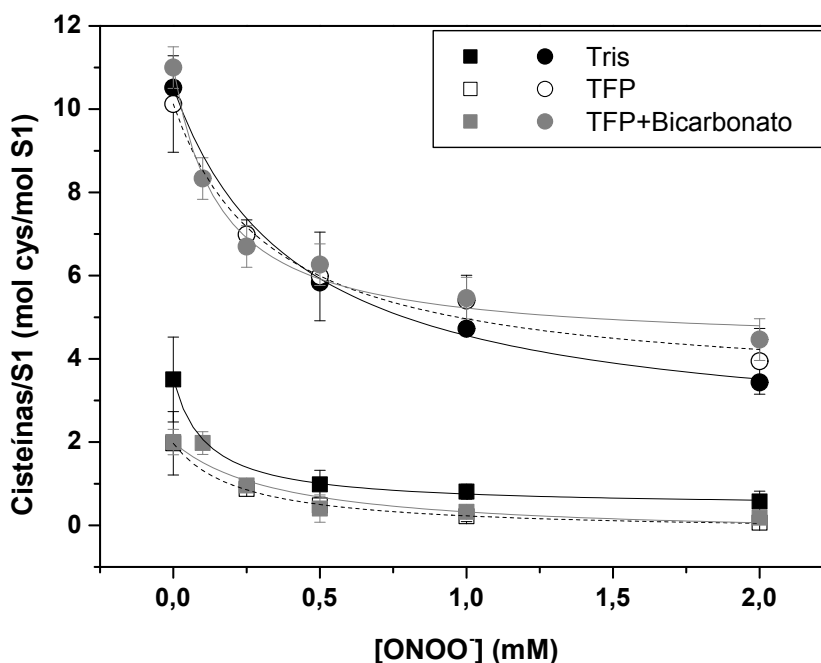


Figura III.12: Cisteínas reduzidas “rápidas” e totais do S1 (9,1 μM) após tratamento com ONOO^- (0; 0,1; 0,25; 0,5; 1 e 2 mM) à temperatura ambiente durante 5 minutos, nos diversos tampões de tratamento: (■/●) Tris (0,5 M Tris, pH 7,2), ($n = 2$); (□/○) TFP (0,25 M K_2HPO_4 e 0,25 M KH_2PO_4 , pH 7,2), ($n = 2$) e (■/●) TFP+Bicarbonato (0,25 M K_2HPO_4 , 0,25 M KH_2PO_4 e 25 mM KHCO_3 , pH 7,2), ($n = 2$). As cisteínas reduzidas do S1 foram quantificadas espectrofotométricamente com DTNB a 412 nm ($\epsilon_{412} = 13,86 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ em Tris; $\epsilon_{412} = 14,22 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ em TFP), segundo o descrito no ponto II.10.2 da secção dos Materiais e Métodos. (■/□/■): Cisteínas reduzidas “rápidas” e (●/○/●): Cisteínas reduzidas totais.

É de referir que nem sempre foram obtidos os valores esperados de cisteínas reduzidas “rápidas” e/ou totais (valores esperados de 2 e 11, respectivamente) nas amostras proteicas do S1 controlo (tratamento do S1 com 0 mM ONOO⁻). Isto leva a supor que tanto a força iónica como a composição dos diversos tampões de tratamento, o pH e a temperatura podem, eventualmente, influenciar a estrutura tridimensional do S1, resultando numa maior acessibilidade dos resíduos de Cys ao DTNB. Para além dos factores anteriores, também se coloca a hipótese de erros experimentais e a limitação do método adoptado, pois durante as detecções espectrofotométricas notou-se que apenas 10 segundos eram suficientes para as cisteínas “rápidas” reagirem com o DTNB, e ao deixar-se a reacção decorrer durante mais tempo obtiam-se valores próximos das cisteínas totais, sem recorrer à adição de SDS. Como tal, sugere-se que estes resultados sejam confirmados, assim como sejam introduzidos mais concentrações de ONOO⁻ entre 0 e 0,5 mM, de modo a observar-se de forma mais clara a oxidação das cisteínas do S1 nestas condições.

Através destes resultados observa-se que para a concentração de ONOO⁻ máxima (2 mM) a oxidação das cisteínas “rápidas” do S1 é sensivelmente a mesma em todos os tampões de tratamento testados. No entanto, relativamente à oxidação das cisteínas totais verifica-se que ocorre maior oxidação do S1 em Tris e menor em TFP+Bicarbonato com aproximadamente 7 e 5 cisteínas oxidadas, respectivamente. Este resultado indica que a ordem pela qual há uma diminuição da oxidação das cisteínas S1 é idêntica à que favorece a nitração de tirosinas no S1, sugerindo que nestes tampões ocorre um deslocamento das reacções promovidas pelo ONOO⁻ no sentido a favorecer a nitração, impedindo a oxidação de cisteínas.

Aos resultados obtidos anteriormente nos diversos tampões de tratamento, ajustaram-se funções hiperbólicas correspondentes ao modelo da cinética enzimática Michaelis-Menten ($y = P_1 \cdot x / P_2 + x$) e determinaram-se os IC₅₀ para as cisteínas “rápidas” e totais, sendo estes representados na Tabela III.4.

Tabela III.4: Valores de IC₅₀ referentes à oxidação das cisteínas “rápidas” e totais do S1 nos diversos tampões testados, após tratamento com ONOO⁻ à temperatura ambiente durante 5 minutos.

Tampão	Cisteínas “rápidas” IC ₅₀ (mM)	Cisteínas totais IC ₅₀ (mM)
Tris	0,11 ± 0,02	0,43 ± 0,06
TFP	0,23 ± 0,01	0,33 ± 0,08
TFP+Bicarbonato	0,37 ± 0,21	0,16 ± 0,03

Através da análise dos valores de IC_{50} , que neste caso em particular correspondem à concentração de $ONOO^-$ que provoca a oxidação de metade dos resíduos de cisteínas, observa-se que os valores de IC_{50} obtidos para as cisteínas “rápidas” aumentam consoante o meio onde a nitração é mais eficaz, ou seja, no meio TFP e em TFP+Bicarbonato é preciso uma maior concentração de $ONOO^-$ para provocar a oxidação de uma cisteína rápida, relativamente ao meio Tris. No entanto, os valores de IC_{50} para a oxidação das cisteínas totais apresentam uma ordem contrária à anterior. Contudo, é de referir que o número máximo de cisteínas oxidadas no S1 é consistente com a ordem apresentada para o favorecimento da nitração, uma vez que se observa para a máxima concentração de $ONOO^-$ testada (2 mM) uma diminuição na oxidação das cisteínas totais do S1 na seguinte ordem de meios: Tris, TFP e TFP+Bicarbonato. Consequentemente, ao se ajustar as funções hiperbólicas aos pontos obtidos, isto pode estar a influenciar o cálculo do IC_{50} para a oxidação das cisteínas totais no S1, resultando na diminuição destes valores no sentido em que a nitração é favorecida. Deste modo, segundo estes resultados comprova-se a hipótese de que ao desviar-se as reacções do $ONOO^-$ no sentido da nitração de tirosinas, obter-se-á simultaneamente um decréscimo na oxidação de cisteínas no S1. Adicionalmente, por comparação destes resultados com os obtidos relativamente à actividade Mg^{2+} -ATPase do S1 basal é reforçada a ideia de que a nitração de tirosinas esteja efectivamente a desviar a oxidação do SH2 para concentrações superiores de $ONOO^-$.

Uma vez que as duas cisteínas altamente reactivas do S1, ou seja a Cys-707 (SH1) e a Cys-697 (SH2), encontram-se intimamente relacionadas com as actividades ATPásicas desta proteína, e pelo facto das suas actividades não fisiológicas, dependentes de Ca^{2+} e de K^+ /EDTA, consistirem em bons critérios de avaliação *in vitro* do estado de oxidação destes grupos sulfidrilo, caracterizou-se também o estado de oxidação das cisteínas do S1 através da medição destas actividades. As actividades não fisiológicas do S1, nomeadamente a Ca^{2+} -ATPase e a K^+ /EDTA-ATPase, apenas foram determinadas em Tris (**Figura III.13**) uma vez que o método adoptado (Fiske-Subbarow modificado), para a medição destas actividades se basear na quantificação de nanomoles de fosfato inorgânico resultantes da hidrólise do ATP, incompatível portanto com o meio TFP (0,25 M K_2HPO_4 e 0,25 M KH_2PO_4 , pH 7,2).

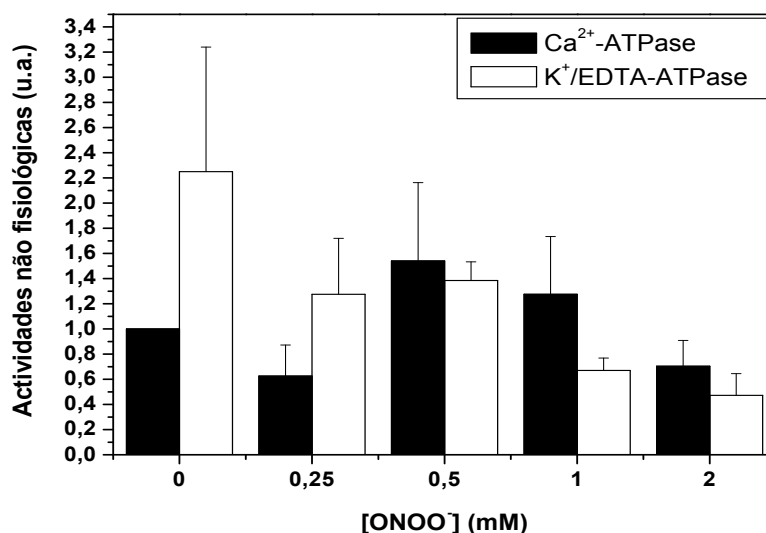


Figura III.13: Actividades não fisiológicas do S1 (9,1 μM) dependentes de Ca^{2+} (■) e de K^{+}/EDTA (□), após tratamento com ONOO^{-} (0; 0,25; 0,5; 1 e 2 mM) à temperatura ambiente durante 5 minutos em tampão Tris (0,5 M Tris, pH 7,2), ($2 \leq n \leq 4$). Estas actividades foram determinadas pelo método de Fiske-Subbarow modificado, tal como se indica no ponto II.4.1 da secção dos Materiais e Métodos.

Através da razão entre as actividades K^{+}/EDTA e Ca^{2+} -ATPase é possível verificar-se que o grupo SH2 começa a ser oxidado com 0,5 mM ONOO^{-} , pelo facto de se obter uma razão entre estas actividades de 0,90, comparativamente à condição controlo (0 mM ONOO^{-}) que exhibe uma razão de 2,25. Portanto, constata-se assim que os resultados obtidos através da medição das actividades não fisiológicas do S1 são consistentes com os obtidos na quantificação de cisteínas reduzidas do S1 por detecção espectrofotométrica com DTNB. Adicionalmente, é de referir que a razão entre as actividades K^{+}/EDTA e Ca^{2+} -ATPase obtida na condição controlo (0 mM ONOO^{-}) é ligeiramente inferior à razão encontrada na caracterização do S1 (ponto III.2.1 da presente secção), sendo as razões de 2,25 e de 2,47, respectivamente. Esta diferença entre as razões das actividades pode dever-se à diálise efectuada durante a noite para remover o agente redutor β -mer, antes de efectuar o tratamento com ONOO^{-} , ficando assim o S1 com maior susceptibilidade à oxidação.

III.4 – Estudos de reversibilidade com DTT nos efeitos induzidos pelo peroxinitrito no subfragmento-1 de miosina

Os organismos encontram-se constantemente expostos a diferentes ROS que podem provocar danos celulares. No entanto, o sistema biológico é composto por uma maquinaria complexa, que possui antioxidantes enzimáticos que apresentam como principal função a protecção da célula em

condições de stresse, como a SOD que catalisa a dismutação do $\bullet\text{O}_2^-$ a H_2O_2 , e a catalase (CAT) que por sua vez transforma o H_2O_2 em H_2O e O_2 . [Klaassen, 2001; Rahman et al, 2006]. Porém, por vezes, estes eventos de defesa aos alvos precursores dos danos celulares, em vez de serem benéficos, acabam por criar situações ainda mais prejudiciais ao organismo [De Grey, 2006]. A título de exemplo, é a reacção entre o $\bullet\text{NO}$, considerado como um supressor de cadeias radicalares, com o $\bullet\text{O}_2^-$ que promove a formação do ONOO^- , sendo este muito mais reactivo que as espécies parentais [Alvarez et al, 2002; Beckman e Koppenol, 1996; Pacher et al, 2007]. De facto, o ONOO^- também pode ser destoxificado pelo organismo através de vários sistemas, incluindo peroxiredoxinas e a glutathiona peroxidase, entre outras [Trujillo et al, 2008; Sies et al, 1997; Sies e Arteel, 2000]. Contudo, as interacções que têm directamente como alvo os próprios danos provocados pelas espécies reactivas, apresentam menores probabilidades de criar situações de risco para o organismo, precisamente porque os danos encontram-se inertes [De Grey, 2006]. Adicionalmente, após os danos causados, existem ainda sistemas biológicos específicos que têm a capacidade de reverter as modificações moleculares induzidas pelas ROS e/ou RNS nas proteínas, como por exemplo, a glutathiona reductase e a tioredoxina reductase que são capazes de reverter *in vivo* a oxidação das cisteínas [Petropoulos e Friguet, 2006; Squier, 2001].

No entanto, tal como referido anteriormente, a nitração de tirosinas nas proteínas é um processo irreversível, sendo considerado como um biomarcador referente aos danos promovidos *in vivo* pelas ROS e/ou RNS. Tal facto tem sido cada vez mais aceite pela comunidade científica, uma vez que a nitração de tirosinas nas proteínas resulta numa modificação química bastante estável e sistemas metabólicos capazes de reparar ou reduzir a nitração são ambos inexistentes ou actuam muito lentamente [Gow et al, 1996b; Kamisaki et al, 1998; Balabanli et al, 1999]. Mais ainda, actualmente não existem evidências sólidas de um sistema metabólico específico capaz de reverter a formação de 3-NT, como por exemplo uma desnitrase [Alvarez e Radi, 2003; Radi et al, 2001].

Portanto, esta é a razão pela qual os estudos de reversibilidade no presente trabalho são indiscutivelmente importantes, pois para além de simular os fenómenos que ocorrem *in vivo*, podem também provir de resultados que permitem a análise do efeito da nitração de tirosinas nas actividades do S1, sem a contribuição dos efeitos provocados pela oxidação das cisteínas desta proteína.

Nesse sentido, procedeu-se à realização dos estudos de reversibilidade utilizando-se o agente redutor DTT, visto encontrar-se descrito que este composto pode promover *in vitro* a reversão de ligações dissulfureto [Cleland, 1964], sendo estas ligações umas das consequências da oxidação de cisteínas nas proteínas. De facto, posteriormente à descoberta deste novo agente redutor, já foram efectuados *in vitro* vários estudos em diversas proteínas que relatam a capacidade do DTT na reversão das cisteínas oxidadas sob a forma de pontes dissulfureto, sendo correlacionado com o restabelecimento da funcionalidade destas [Borutaite et al, 2000; Casadei et al, 2008; Hurne et al, 2000; Radi et al, 1991; Ryu et al, 2004; Saunders e Booker, 2008]. É de referir que os estudos de reversibilidade do S1 com DTT que a seguir se apresentam foram efectuados em TFP, uma vez que neste meio se verifica um favorecimento da nitração de tirosinas em detrimento da oxidação de cisteínas. Para além disso, foi escolhida uma concentração de 0,5 mM ONOO⁻ pelo facto de se observar, para esta concentração, uma elevada estimulação da actividade da Mg²⁺-ATPase basal do S1, ao passo que a actividade fisiológica do S1 já se encontra significativamente inibida.

III.4.1 – Reversibilidade da oxidação das cisteínas do subfragmento-1 de miosina

O efeito do DTT na reversão das cisteínas “rápidas” e totais do S1, após o tratamento com peroxinitrito sintético em TFP, encontra-se ilustrado na **Figura III.14**.

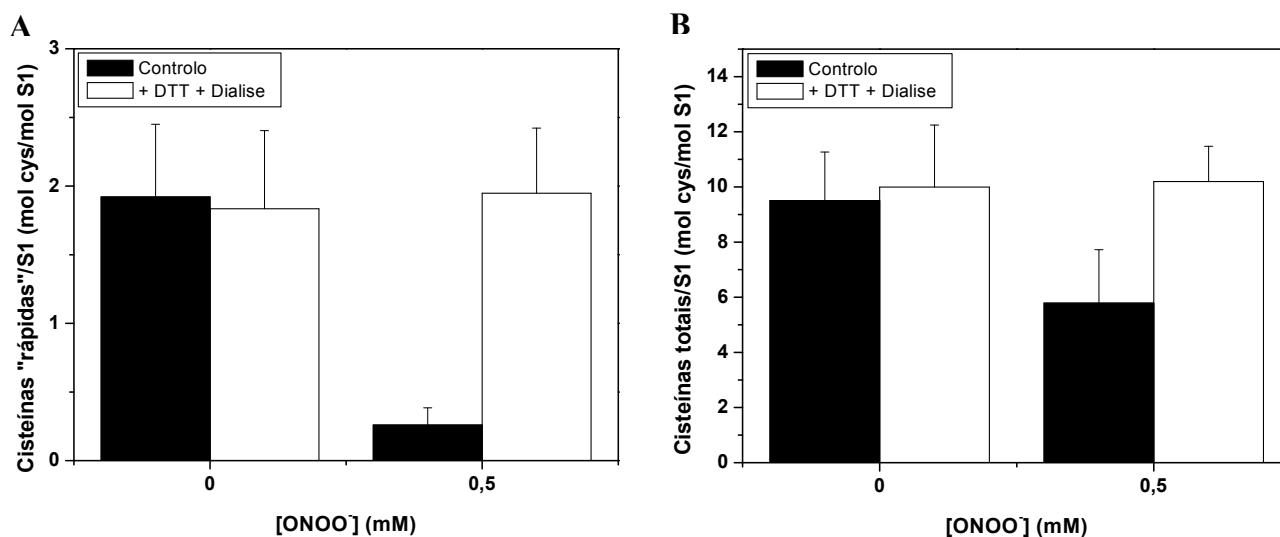


Figura III.14: Efeito do DTT (1 mM) na redução das cisteínas “rápidas” e totais do S1 (9,1 μM) após tratamento com ONOO⁻ (0 e 0,5 mM) à temperatura ambiente durante 5 minutos em TFP (0,25 M K₂HPO₄ e 0,25 M KH₂PO₄, pH 7,2). (A): Cisteínas reduzidas “rápidas” (n = 2) e (B) Cisteínas reduzidas totais (n = 2). (■): Controlo; S1 tratado com ONOO⁻. (□): S1 tratado com ONOO⁻, posteriormente incubado com 1 mM DTT durante 2 horas a 4 °C e sujeito a diálise. As cisteínas reduzidas do S1 foram quantificadas espectrofotometricamente com DTNB a 412 nm (ε₄₁₂ = 14,22 mM⁻¹.cm⁻¹ em TFP), tal como se encontra descrito no ponto II.10.2 da secção dos Materiais e Métodos.

Através destes resultados, é possível observar-se que na situação controlo, particularmente para a condição em que o S1 não é sujeito ao tratamento com ONOO⁻, foram obtidos os valores esperados de cisteínas reduzidas “rápidas” (Figura III.14A) e totais (Figura III.14B), sendo estes valores de 2 e de 11, respectivamente. Quando esta amostra proteica de S1 é posteriormente incubada com DTT durante 2 horas a 4 °C, observam-se resultados idênticos no que diz respeito à quantidade de cisteínas reduzidas. Também se verifica que na situação controlo o número de cisteínas reduzidas diminui quando o S1 é exposto a 0,5 mM ONOO⁻, para aproximadamente 0,5 e 6 mol Cys/mol S1 para as cisteínas reduzidas “rápidas” (Figura III.14A) e totais (Figura III.14B), respectivamente, encontrando-se de acordo com os valores descritos anteriormente no ponto III.3.2.3 da presente secção.

Após incubação do S1, previamente tratado com 0,5 mM ONOO⁻, com DTT durante 2 horas a 4° C observa-se uma reversão da oxidação das cisteínas de 1,5 e de 5 mol Cys/mol S1, respectivamente para as cisteínas “rápidas” (Figura III.14A) e totais (Figura III.14B) do S1. Estes resultados demonstram assim uma completa reversibilidade com DTT de todas as cisteínas do S1 que se encontravam oxidadas devido ao tratamento desta proteína com 0,5 mM ONOO⁻. É de referir que este estudo de reversibilidade com DTT a nível da oxidação das cisteínas do S1, foi também efectuado no tampão de tratamento Tris, sendo os resultados obtidos neste tampão (não mostrados) semelhantes aos obtidos quando o S1 se encontra em TFP.

Num estudo anterior encontra-se descrito que *in vitro* 1 mol do agente redutor DTT reverte 2 mol de ligações dissulfureto, mas não a forma sulfénica, sulfínica e sulfónica das cisteínas oxidadas (Figura III.15) [Radi et al, 1991]. Através dos resultados obtidos no presente estudo e consoante o descrito por Radi e colaboradores [1991], sugere-se que as cisteínas oxidadas no S1, provocadas pela exposição desta proteína ao ONOO⁻, encontram-se oxidadas sob a forma de ligações dissulfureto, uma vez que esta modificação é a única a ser revertida após tratamento com DTT.

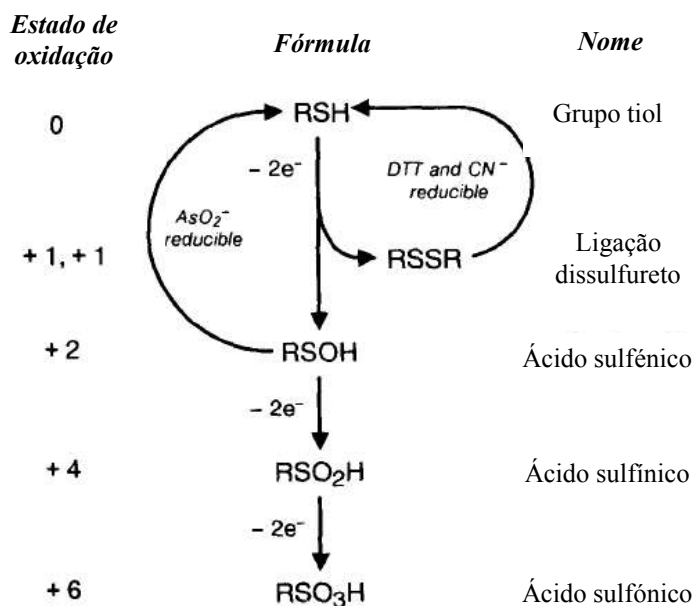


Figura III.15: Diagrama dos produtos resultantes da oxidação dos grupos tiol (-SH) das cisteínas. Neste esquema encontram-se também ilustrados as possíveis reversões *in vitro* de alguns produtos da oxidação dos grupos tiol das cisteínas com agentes redutores, tais como DTT, cianeto (CN⁻) e arsenato (AsO₂⁻). [Adaptado de Radi et al, 1991].

III.4.2 – Reversibilidade da nitração das tirosinas do subfragmento-1 de miosina

Os resultados obtidos referentes ao efeito do DTT na reversão das 3-NT formadas no S1 em TFP, após a exposição aguda desta proteína ao ONOO⁻, encontram-se representados na **Figura III.16**.

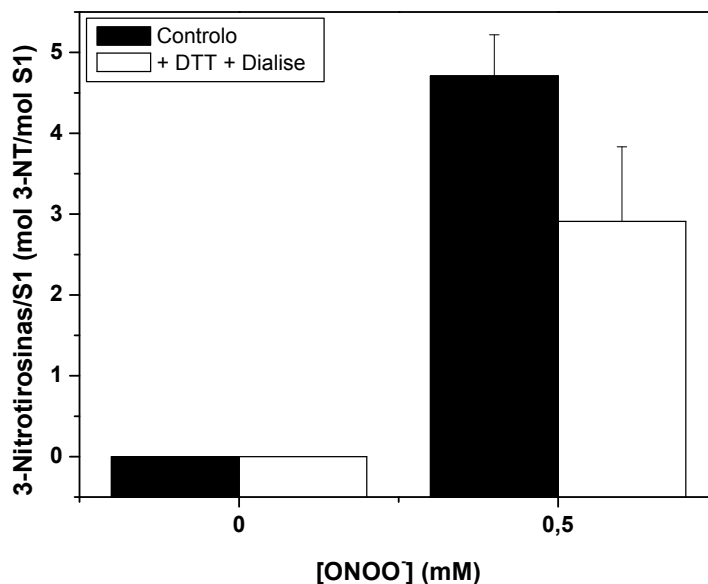


Figura III.16: Efeito do DTT (1 mM) na reversão de 3-nitrotirosinas formadas no S1 (9,1 μM) após tratamento com ONOO⁻ (0 e 0,5 mM) à temperatura ambiente durante 5 minutos em TFP (0,25 M K₂HPO₄ e 0,25 M KH₂PO₄, pH 7,2), (n = 2). (■): Controlo; S1 tratado com ONOO⁻. (□): S1 tratado com ONOO⁻, posteriormente incubado com 1 mM DTT durante 2 horas a 4 °C e sujeito a diálise. As 3-NT no S1 foram quantificadas por espectrofotométrica a 415 nm (ε₄₁₅ = 3056,67 M⁻¹.cm⁻¹ em TFP), de acordo com o descrito no ponto II.8.2 da secção dos Materiais e Métodos.

Pela análise destes resultados verifica-se que quando o S1 em TFP é tratado com 0,5 mM ONOO⁻ (condição controlo) ocorre a formação de 4,5 mol 3-NT/mol S1, cujos valores se encontram de acordo com os anteriormente referidos no ponto III.3.2.1 da presente secção. A incubação com DTT da amostra de S1 previamente tratada com 0,5 mM ONOO⁻ não apresenta qualquer efeito na reversão desta modificação molecular. Apesar de se notar uma ligeira diminuição dos níveis de 3-NT, esta não é significativa uma vez que os erros associados às medições são sobreponíveis. De facto, tal efeito do DTT na nitração encontra-se de acordo com o esperado uma vez que não existem quaisquer indícios de que o DTT seja capaz de reverter esta modificação.

Mais uma vez, é de referir que este estudo de reversibilidade com DTT a nível da nitração de tirosinas do S1, foi também efectuado no tampão de tratamento Tris, sendo os resultados obtidos neste tampão (não mostrados) semelhantes aos obtidos quando o S1 se encontra em TFP.

III.4.3 – Estudos de reversibilidade com DTT a nível funcional do subfragmento-1 de miosina

Os resultados obtidos relativos ao efeito do DTT nas actividades ATPásicas dependentes de Mg²⁺, após o tratamento do S1 com o anião peroxinitrito em TFP, encontram-se representados na **Figura III.17**.

Analisando os resultados correspondentes às actividades Mg²⁺-ATPase basal (**Figura III.17A**) e Mg²⁺-ATPase estimulada por F-actina (**Figura III.17B**), verificam-se nas condições controlo de S1 tratado com 0,5 mM ONOO⁻ respectivamente uma estimulação de aproximadamente 250 % e uma inibição de pelo menos 40 %, encontrando-se estes valores de acordo com os obtidos anteriormente no ponto III.3.1 da presente secção. Adicionalmente, estes resultados também demonstram que após a exposição aguda do S1 ao ONOO⁻, a incubação com DTT (durante 2 horas a 4 °C) e a sua posterior remoção através de diálise (durante 9 horas, com mudança de tampão de tratamento de 3 em 3 horas), não provocam alterações significativas em ambas as actividades. Estes resultados indicam assim que o poder redutor do DTT não resulta no restabelecimento da função do S1, ou seja, a reversão *in vitro* dos grupos tiol das cisteínas oxidadas no S1, nomeadamente da Cys-707 e da Cys-697 para o estado reduzido, não apresenta qualquer efeito no restabelecimento das actividades ATPásicas do S1 dependentes de Mg²⁺. É então sugerido que as alterações funcionais do S1 se devam aparentemente a modificações moleculares que não a oxidação de cisteínas e que a

formação de 3-NT no S1 seja possivelmente a modificação responsável pelas alterações funcionais do S1 quando exposto ao ONOO⁻. Contudo, é também de referir que o ONOO⁻ pode estar a modificar outros resíduos no S1, nomeadamente as metioninas, e que esta modificação possa ter eventualmente um efeito a nível funcional. Para além do exposto, deve-se ter em consideração que o tratamento do S1 ao ONOO⁻ pode possivelmente provocar uma perda de estrutura na proteína, que não seja revertida pela incubação com DTT, e que contribua para as alterações funcionais do S1.

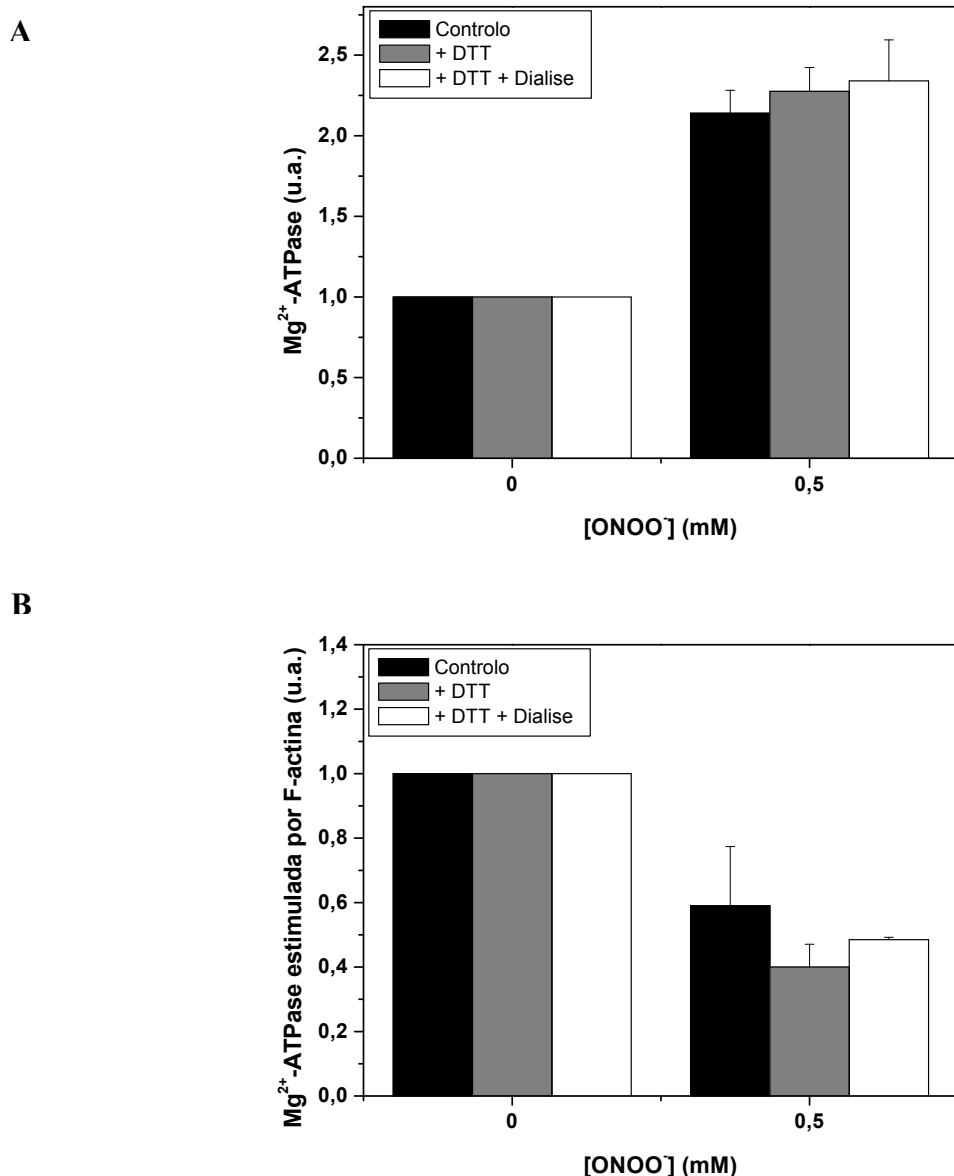


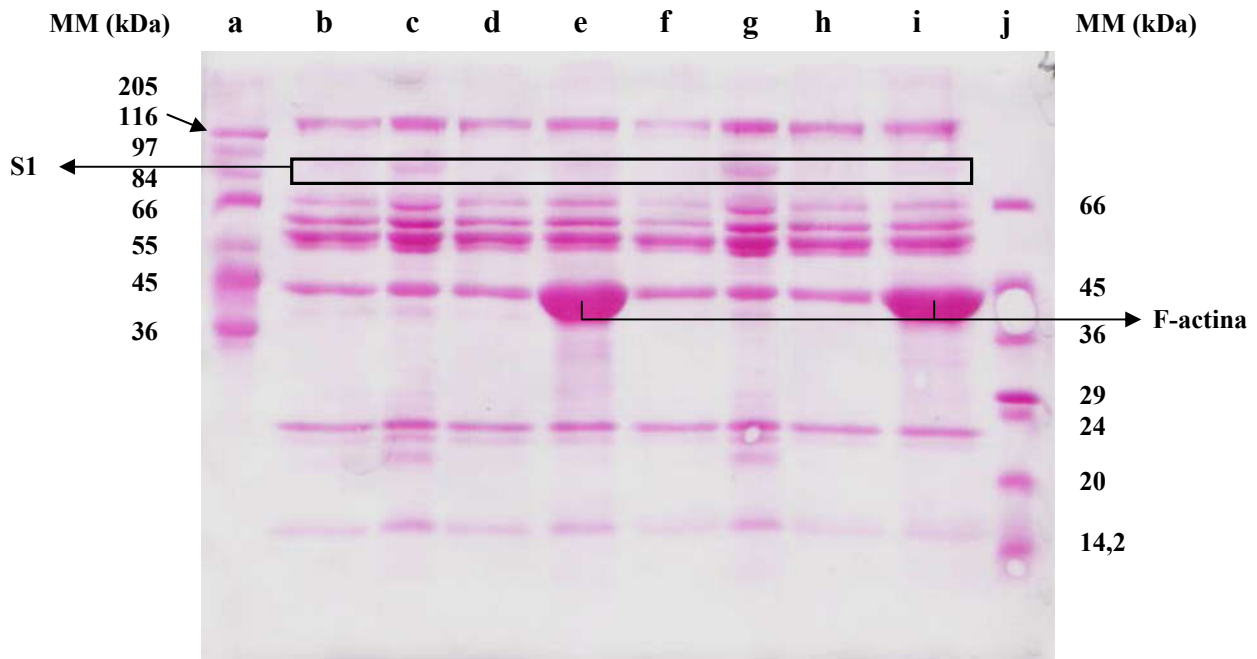
Figura III.17: Efeito do DTT (1 mM) nas actividades ATPásicas dependentes de Mg²⁺ do S1 (9,1 μM) após tratamento com ONOO⁻ (0 e 0,5 mM) à temperatura ambiente durante 5 minutos em TFP (0,25 M K₂HPO₄ e 0,25 M KH₂PO₄, pH 7,2). **(A):** Mg²⁺-ATPase basal (n = 2) e **(B)** Mg²⁺-ATPase estimulada por F-actina (n = 2). (■): Controlo; S1 tratado com ONOO⁻. (▒): S1 tratado com ONOO⁻ e posteriormente incubado com 1 mM DTT durante 2 horas a 4 °C. (□): S1 tratado com ONOO⁻, posteriormente incubado com 1 mM DTT durante 2 horas a 4 °C e sujeito a diálise. As actividades foram medidas espectrofotométricamente a 340 nm utilizando o método de enzimas acopladas PK/PDH, tal como se descreve no ponto II.4.2 da secção dos Materiais e Métodos.

III.5 – Efeito dos ligandos naturais do subgramento-1 de miosina na nitração de tirosinas

Uma vez que os resultados anteriores indicam um possível envolvimento da nitração de tirosinas nas consequências funcionais no S1, procurou-se investigar se os ligandos naturais desta proteína, especificamente o ATP e a F-actina, desempenhavam algum efeito na nitração de tirosinas. Esta análise apresenta também extrema relevância no presente estudo, pelo facto de reflectir os fenómenos *in vivo* da contracção muscular, na qual a miosina se pode encontrar associada tanto ao ATP como à F-actina. Nesse sentido, suplementou-se os meios de tratamento onde ocorreu a exposição do S1 ao ONOO⁻ com MgATP ou com F-actina. A detecção de 3-NT bem como a identificação dos domínios nitrados foram efectuadas por imunodeteccção, sendo os resultados obtidos das amostras proteicas do S1 não digeridas e digeridas com tripsina apresentados respectivamente na **Figura III.18** e na **Figura III.19**.

Quando a amostra proteica do S1 é tratada com 0,25 mM ONOO⁻ em TFP (poço f), observa-se na situação de ausência de digestão (**Figura III.18**) a intensificação da banda correspondente ao S1, indicando portanto formação de 3-NT relativamente à situação controlo (poço b). Por outro lado, quando esta amostra é tripsinizada (**Figura III.19**) nota-se a presença de bandas intensas nos fragmentos proteolíticos de 25 e 50 kDa, que indicam que a formação de 3-NT no S1 ocorrem preferencialmente neste domínios. Relativamente à amostra proteica do S1 tratada com 0,25 mM ONOO⁻ em Tris também se verifica-se a formação de bandas, embora muito menos intensas, com localização idêntica à situação anterior em meio TFP, tanto nas amostras não digeridas (**Figura III.18**) como nas amostras digeridas com tripsina (**Figura III.19**). Isto encontra-se em consonância com o reportado no ponto III.3.2.1, cujos resultados demonstram que os níveis de formação de 3-NT no S1 em tampão Tris são bastante inferiores aos obtidos em TFP.

A



B

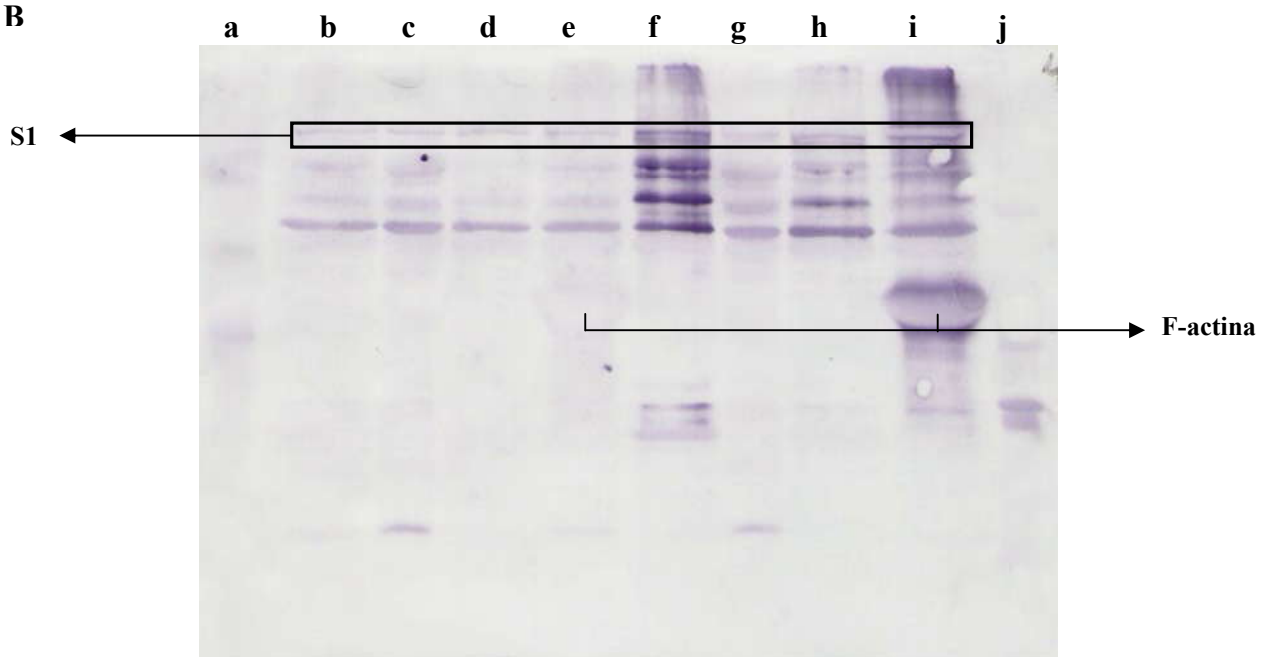
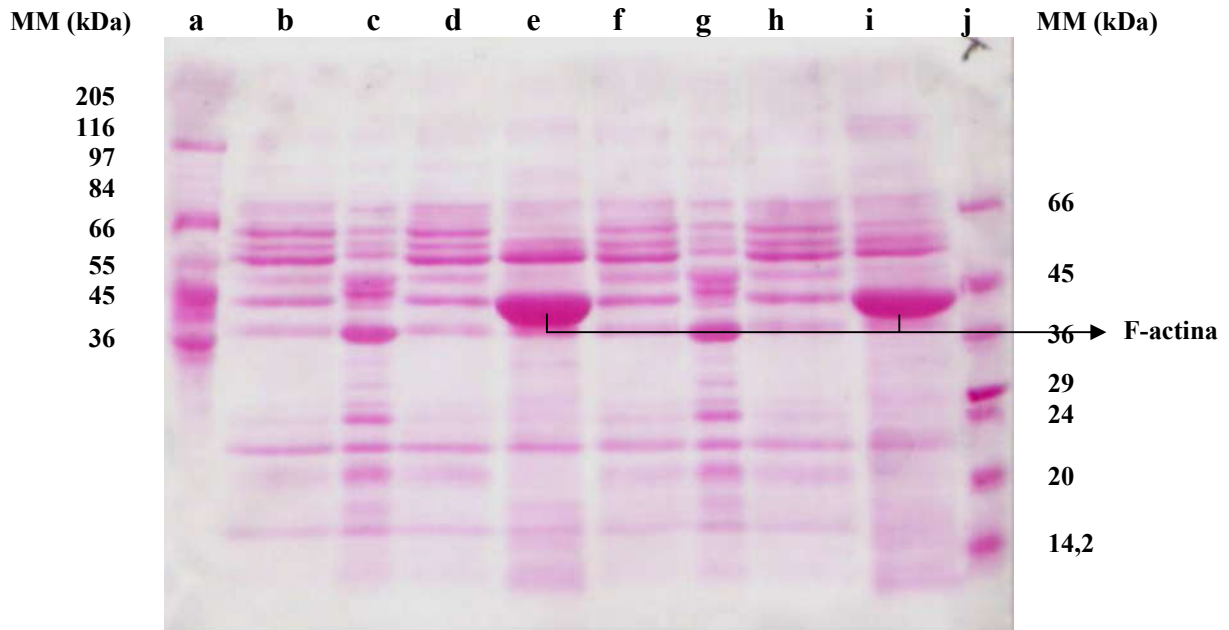


Figura III.18: Detecção de 3-NT formadas no S1 após exposição aguda ao ONOO^- , à temperatura ambiente durante 5 minutos (amostras proteicas do S1 não sujeitas à digestão proteolítica com tripsina). **(A):** Membrana de nitrocelulose corada com solução de Ponceau, possibilitando a visualização das proteínas. Estas foram previamente separadas em gel de SDS-PAGE (12 % acrilamida) e transferidas para a membrana por electrotransferência, conforme se descreve no ponto II.9.2 da secção do Materiais e Métodos. **(B)** Revelação colorimétrica do respectivo imunoblot, permitindo a monitorização dos níveis de formação de 3-NT no S1. Nos poços a) e j) encontram-se 10 μL dos marcadores de alta (36 – 205 kDa) e de baixa (6,5 – 66 kDa) massa molecular, respectivamente. Os poços b) e f) contêm a 10 μg do S1 em TFP tratado com 0 e 0,25 mM ONOO^- , respectivamente. Os poços c) e g) correspondem a 10 μg do S1 em Tris tratado com 0 e 0,25 mM ONOO^- , respectivamente. Nos poços d) e h) correspondem a 10 μg do S1 em TFP+MgATP (TFP suplementado com 2,5 mM ATP e com 2,5 mM MgCl_2) tratado com 0 e 0,25 mM ONOO^- , respectivamente. Os poços e) e i) contêm a 10 μg do S1 em TFP+F-actina (TFP suplementado com 27,3 μM F-actina dialisada contra solução H sem β -mer) tratado com 0 e 0,25 mM ONOO^- , respectivamente.

A



B

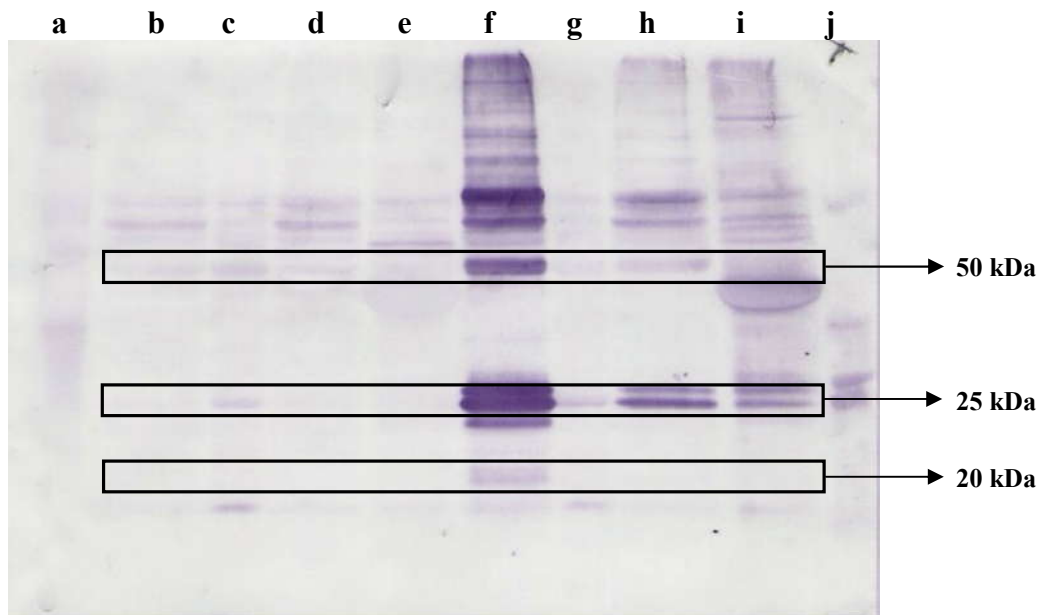


Figura III.19: Detecção de 3-NT e dos correspondentes domínios proteolíticos do S1 nitrados após exposição aguda ao ONOO^- , à temperatura ambiente durante 5 minutos (amostras proteicas do S1 sujeitas à digestão proteolítica com tripsina durante 45 minutos à temperatura ambiente). **(A):** Membrana de nitrocelulose corada com solução de Ponceau, possibilitando a visualização das proteínas. Estas foram previamente separadas em gel de SDS-PAGE (12 % acrilamida) e transferidas para a membrana por electrotransferência, conforme se descreve no ponto II.9.2 da secção do Materiais e Métodos. **(B)** Revelação colorimétrica do respectivo imunoblot, permitindo a monitorização dos níveis de formação de 3-NT no S1. Nos poços a) e j) encontram-se 10 μL dos marcadores de alta (36 – 205 kDa) e de baixa (6,5 – 66 kDa) massa molecular, respectivamente. Os poços b) e f) contêm a 10 μg do S1 em TFP tratado com 0 e 0,25 mM ONOO^- , respectivamente. Os poços c) e g) correspondem a 10 μg do S1 em Tris tratado com 0 e 0,25 mM ONOO^- , respectivamente. Nos poços d) e h) correspondem a 10 μg do S1 em TFP+MgATP (TFP suplementado com 2,5 mM ATP e com 2,5 mM MgCl_2) tratado com 0 e 0,25 mM ONOO^- , respectivamente. Os poços e) e i) contêm a 10 μg do S1 em TFP+F-actina (TFP suplementado com 27,3 μM F-actina dialisada contra solução H sem β -mer) tratado com 0 e 0,25 mM ONOO^- , respectivamente.

Na presença de ATP (poço h) observa-se que a formação de 3-NT é menor na banda correspondente ao S1 (**Figura III.18**) e nas bandas referentes aos fragmentos proteolíticos de 25 e 50 kDa (**Figura III.19**), uma vez que as bandas são bastante menos intensas comparativamente ao S1 tratado na ausência de ATP (poço f). Estes resultados indicam que o ATP apresenta um efeito protector na nitração de tirosinas no S1, sendo este efeito bastante pronunciado no domínio de 50 kDa.

Na presença de F-actina (poço i) averigua-se que as bandas correspondentes ao S1 (**Figura III.18**) e aos fragmentos proteolíticos de 25 e 50 kDa (**Figura III.19**) são ainda menos intensas, comparativamente às condições em que o S1 foi tratado com ONOO⁻ na presença de ATP (poço h) e apenas tratado com ONOO⁻ (poço f). Isto significa que a F-actina apresenta um forte efeito protector na nitração de tirosinas no S1 em ambos os domínios proteolíticos (25 e 50 kDa). Uma vez que nesta condição em particular existem como alvo do ONOO⁻ duas proteínas, miosina e actina, poderia-se pôr como hipótese que o efeito protector da nitração do S1 fosse o resultado da competição destas duas proteínas para a reacção com o ONOO⁻. No entanto, consoante dos resultados obtidos observa-se na banda correspondente à actina a ausência de formação de 3-NT (**Figura III.18** e **Figura III.19**).

É de referir que o ATP liga-se ao domínio proteolítico de 25 kDa, enquanto que a F-actina liga-se ao domínio proteolítico de 50 kDa [Rayment, 1996], mas interessantemente ambos os ligandos naturais da miosina apresentam um efeito protector da nitração nos dois fragmentos proteolíticos (25 e 50 kDa). De facto, também se encontra descrito que a ligação quer do ATP quer da F-actina ao S1 promovem modificações conformacionais na estrutura tridimensional desta proteína [Geeves e Holmes, 1999; Holmes e Geeves, 2000; Rayment, 1996; Rayment et al, 1996].

Sendo assim, é então sugerido que o ATP por induzir alterações estruturais no S1, torna possivelmente as tirosinas menos acessíveis ao meio envolvente, e tal resulta na efectiva protecção da formação de 3-NT nesta proteína após uma exposição aguda ao ONOO⁻. Relativamente à actina é sugerido que a protecção da nitração de tirosinas do S1 resulta de dois factores, primeiro pelos impedimentos estéreos criados pela ligação desta proteína ao domínio de 50 kDa do S1 e também pela indução de alterações conformacionais.

Consoante, os resultados apresentados ao longo deste estudo sugere-se que a nitração de tirosinas no S1 apresenta um importante papel na actividade contráctil desempenhada pelo complexo acto-S1. De facto, estes resultados encontram-se de acordo com os reportados recentemente por Snook et al [2008], cujo autor refere que a formação de 3-NT na miosina de músculo cardíaco, mediada por exposição a ONOO⁻, contribui significativamente para a disfunção contráctil.

Analogamente à situação *in vivo*, a formação de 3-NT é uma modificação pós-traducional irreversível, e actualmente não existem evidência sólidas acerca de uma desnitrase, enquanto que a oxidação de cisteínas pode ser revertida por sistemas enzimáticos específicos. Consecutivamente, é colocada a hipótese de que a formação de 3-NT possa estar eventualmente implicada na perda de força muscular e de velocidade contráctil que se encontra correlacionada com o envelhecimento [Höök et al, 2001], bem como no desenvolvimento de variadíssimas doenças no sistema muscular e cardíaco. Uma vez que as 3-NT são modificações pós-traducionais irreversíveis, sugere-se ainda que as consequências anteriormente mencionadas durante o envelhecimento sejam de facto o resultado da acumulação dos danos causados pelo ONOO⁻.

IV – CONCLUSÕES

Nos últimos anos o efeito da nitração de tirosinas nas proteínas tem sido bastante questionado, uma vez que foram detectados elevados níveis de formação de 3-NT em diversas condições patofisiológicas. É também conhecido que as ROS e as RNS são constantemente produzidas nos músculos esquelético e cardíaco, estando estabelecido que estas consistem num importante factor no desenvolvimento de doenças associadas ao envelhecimento, incluindo as doenças cardiovasculares. De facto, já se encontra descrito que o ONOO^- provoca a oxidação de cisteínas tendo como consequência a inibição da actividade fisiológica do S1, no entanto, a correlação entre a nitração de tirosinas nesta proteína com modificações funcionais e estruturais ainda não se encontra totalmente esclarecida. Deste modo, o presente estudo teve como objectivo responder à pergunta: nitração de tirosinas na miosina, será que tem consequências funcionais, ou apenas se trata de um biomarcador associado ao stresse nitrosativo?

Na optimização das condições de nitração verifica-se que a exposição aguda do S1 ($9,1 \mu\text{M}$) ao ONOO^- resulta numa inibição bastante pronunciada da actividade Mg^{2+} -ATPase estimulada por F-actina, em todos os meios de tratamento testados. Os valores obtidos de IC_{50} para a inibição desta actividade foram de $0,41 \pm 0,10$; $0,29 \pm 0,04$ e de $0,40 \pm 0,03$ mM ONOO^- , enquanto que as percentagens de inibição máximas atingidas com 2 mM ONOO^- foram de 87 ± 7 ; 72 ± 3 e de 65 ± 2 , respectivamente para os tampões de tratamento, Tris, TFP e TFP+Bicarbonato. Estes resultados sugerem que poderá estar a ocorrer um efeito protector na inibição da actividade fisiológica do S1, quando se desvia as reacções mediadas pelo ONOO^- no favorecimento da nitração de tirosinas em detrimento de outras modificações oxidativas, nomeadamente na oxidação de cisteínas. Adicionalmente, diferenças interessantes foram obtidas relativamente à actividade Mg^{2+} -ATPase basal do S1, cuja actividade apresenta uma estimulação máxima de cerca de 150 % em Tris e de 250 % em TFP quando o S1 é exposto a 0,5 e 1 mM ONOO^- , respectivamente, e a partir destes valores esta actividade começa a ser inibida. Segundo estes resultados, é então sugerido que a oxidação dos grupos SH1 e SH2 está a ser desviada para concentrações superiores de ONOO^- , pelo facto de se estar a promover a nitração de tirosinas no S1.

Relativamente à nitração de tirosinas do S1, conclui-se que esta reacção nitrosativa mediada pelo ONOO⁻ é favorecida quando o S1 se encontra em TFP, uma vez que se observam com 2 mM ONOO⁻ níveis de formação de 3-NT aproximadamente 4 vezes superiores neste meio comparativamente ao meio Tris. No entanto, é de referir que a adição de bicarbonato ao TFP a pH 7,2 não proporcionou um aumento significativo na formação de 3-NT no S1, tendo-se obtido valores de IC₅₀ para esta reacção de $1,87 \pm 0,22$ mM ONOO⁻ em TFP e de $2,25 \pm 1,16$ mM ONOO⁻ em TFP+Bicarbonato. Constatou-se também que em TFP são formadas 2 mol 3-NT/mol S1, enquanto que em Tris ocorre somente a formação de 0,3 mol 3-NT/mol S1, quando a actividade Mg²⁺-ATPase estimulada por F-actina é inibida 50 %, o que sugere que a nitração não estará a afectar significativamente a actividade fisiológica do S1.

Na identificação dos domínios proteolíticos do S1 mais susceptíveis à nitração pelo ONOO⁻, observa-se que a formação de 3-NT ocorre nos domínios proteolíticos do S1 com 25 e 50 kDa. Após análise estrutural, sugere-se assim que a nitração de tirosina no S1 seja superior no fragmento de 25 kDa devido a este domínio conter maior número de resíduos de tirosinas, por ser constituído por vários *loops* (o que torna as tirosinas mais expostas ao solvente) e por existirem na proximidade das tirosinas alvo um ou mais resíduos carregados negativamente.

Ainda a nível molecular, constata-se que o deslocamento das reacções promovidas pelo ONOO⁻ no sentido de favorecer a nitração resulta na diminuição das cisteínas oxidadas do S1, sendo os valores de IC₅₀ obtidos para a oxidação das cisteínas “rápidas” de $0,11 \pm 0,02$; $0,23 \pm 0,01$ e de $0,37 \pm 0,02$ mM ONOO⁻ para os meios de tratamento Tris, TFP e TFP+Bicarbonato, respectivamente.

Através dos estudos de reversibilidade com DTT realizados no presente estudo, observa-se a completa reversão *in vitro* das cisteínas oxidadas, sob a forma de ligações dissulfureto, promovidas no S1 pelo tratamento com ONOO⁻. Contudo, esta reversão não apresenta qualquer efeito no restabelecimento das actividades ATPásicas do S1 dependentes de Mg²⁺, sendo então sugerido que, possivelmente, a formação de 3-NT no S1 ou eventualmente outras modificações moleculares, tais como a oxidação de metioninas, estejam envolvidas nas alterações funcionais desta proteína. Adicionalmente, é também colocada a hipótese de que o ONOO⁻ possa possivelmente provocar uma perda de estrutura na proteína, que contribua para as alterações funcionais do S1.

Por fim, constatou-se que os ligandos naturais da miosina, nomeadamente o ATP e a F-actina, apresentam um efeito protector na nitração de tirosinas quer na molécula do S1, quer em ambos os domínios proteolíticos de 25 e de 50 kDa. Desta forma, sugere-se que tal efeito seja o resultado das modificações estruturais que são induzidas pelos ligandos naturais da miosina, tornando assim os resíduos de tirosina do S1 menos acessíveis ao meio envolvente.

Portanto, através dos resultados apresentados no presente estudo, pode-se dar como resposta à pergunta principal deste trabalho, que a nitração de tirosinas na miosina, para além de ser um biomarcador, também poderá apresentar consequências a nível funcional desta proteína, podendo justificar, em parte, a perda de força muscular e de velocidade contráctil que se encontram correlacionadas com o envelhecimento e com diversas doenças tanto musculares como cardíacas.

Não tendo sido possível responder de forma concreta e definitiva à pergunta principal deste trabalho, sugere-se assim estudos futuros de modo a melhor esclarecer o efeito da nitração de tirosinas na miosina a níveis funcionais e estruturais.

V – ESTUDOS FUTUROS

No sentido de esclarecer melhor o papel da nitração de tirosina a nível funcional da miosina, após uma exposição aguda desta proteína ao ONOO⁻, sugere-se como estudos futuros:

- Caracterização dos efeitos no S1 que resultam da reacção do ONOO⁻ com outros aminoácidos, tais como metioninas, triptofanos e histidinas, bem como na formação de grupos carbonilo;
- Estudo da oxidação de cisteínas no S1 quando esta proteína é exposta a baixas concentrações de ONOO⁻, especificamente entre 0 e 0,5 mM, segundo as condições de utilizadas no presente estudo;
- Análise dos efeitos a nível de formação de 3-NT e das consequências funcionais do S1, após exposição desta proteína ao ONOO⁻ em tampão Tris suplementado com bicarbonato;
- Quantificação da formação de 3-NT no S1, quando o meio de tratamento da proteína em questão é suplementado com MgATP antes da exposição aguda ao ONOO⁻;
- Estudos de reversibilidade, nomeadamente na oxidação de cisteínas do S1, utilizando os sistemas biológicos: glutathione/glutathione reductase e tioredoxina/tioredoxina reductase;
- Estudos com agentes antioxidantes, como por exemplo glutathione, SOD, CAT, NADH e ascorbato, na protecção da formação de 3-NT assim como nas actividades desta proteína;
- Avaliar o favorecimento da formação de 3-NT e simultaneamente a formação de ditirosinas variando o pH tanto na ausência como na presença de bicarbonato;
- Estudar as modificações estruturais induzidas na miosina pela nitração de tirosinas, através da determinação da estabilidade térmica da proteína nitrada por calorimetria com varrimento diferencial (DSC);
- Estudar por mutagénese dirigida às tirosinas 116, 118, 135 e 143, que foram encontradas nitradas *in vivo* durante o envelhecimento e que são coincidentes com o fragmento de 25 kDa do S1, de modo a verificar se a perda de actividade fisiológica é consequência da nitração de várias tirosinas ou apenas de um destes resíduos em particular;

- Imunodeteção de 3-NT na miosina proveniente de coelhos jovens e de coelhos idosos;
- Análises utilizando ferramentas bioinformática de forma a verificar na íntegra da molécula de miosina quais as tirosinas que são mais susceptíveis à nitração;
- Estudos bioinformáticos de modo a determinar quais as alterações estruturais que são induzidas na molécula de miosina através da nitração de tirosinas, que passam a 3-NT envolvendo modificações pós-traducionais.

Adicionalmente, sugere-se também o esclarecimento da nitração de tirosinas na actina, quer a nível do mecanismo da estimulação da actividade Mg^{2+} -ATPásica do S1, quer na sua polimerização e despolimerização. Será que nitração de tirosinas na actina apresenta consequências funcionais ou será apenas um biomarcador? Propõem-se assim que nos próximos estudos com actina seja utilizado peroxinitrito preparado sinteticamente e que o tratamento à proteína simule uma exposição aguda, de forma a otimizar as condições de nitração.

VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ☞ Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P. e Lomri, A.; **“Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases”**; *Joint Bone Spin*; 74:324-329; 2007.
- ☞ Alderton, W. K., Cooper C. E. e Knowles, R. G.; **“Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition”**; *Biochem. J.*; 357:539-615; 2001.
- ☞ Alvarez, B. e Radi, R.; **“Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins”**; *Amino Acids*; 25:295-311; 2003.
- ☞ Alvarez, M. B., Trujillo, M. e Radi, R.; **“Peroxynitrite formation from biochemical and cellular fluxes of nitric oxide and superoxide”**; *Methods Enzymol.*; 359:353-366; 2002.
- ☞ Ara, J., Przedborski, S., Naini, A. B., Jackson-Lewis, V., Trifiletti, R.R., Horwitz, J. e Ischiropoulos, H.; **“Inactivation of tyrosine hydroxylase by nitration following exposure to peroxynitrite and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)”**; *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 95:7659-7663; 1998.
- ☞ Azevedo, C.; **“Biologia celular e molecular”**; 4ª Edição; *Lidel, edições técnicas*; 2005.
- ☞ Bagshaw, C. R.; **“Outline studies in biology: muscle contraction”**; *Chapman and Hall Ed.*; 1982.
- ☞ Balabandi, B., Kamisaki, Y., Martin, E. e Murad, F.; **“Requirements for heme and thiols for the nonenzymatic modifications of nitrotyrosine”**; *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 96:13136-13141; 1999.
- ☞ Balafanova, Z., Bolli, R., Zhang, J., Zheng, Y., Pass, P. M., Bhatnagar, A., Tang, X. L., Wang, O., Cardwell, E. e Ping, P.; **“Nitric oxide (NO) induces nitration of protein kinase Cepsilon (PKCepsilon), facilitating PKCepsilon translocation via enhanced PKCepsilon-RACK2 interactions: a novel mechanism of no-triggered activation of PKCepsilon”**; *J Biol. Chem.*; 277(17):15021-15027; 2002.
- ☞ Bartesaghi, S., Ferrer-Sueta, G., Peluffo, G., Valez, V., Zhang, H., Kalyanaraman, B. e Radi, R.; **“Protein tyrosine nitration in hydrophilic and hydrophobic environments”**; *Amino Acids*; 32:501-515; 2007.
- ☞ Barthany, C., Souza, J. M., Duran, R., Cassina, A., Cervenansky, C. e Radi, R.; **“Time course and site(s) of cytochrome c tyrosine nitration by peroxynitrite”**; *Biochemistry*; 44(22):8038-8046; 2005.
- ☞ Beckman, J.S. e Koppenol, W.; **“Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly”**; *Am. J. Physiol.*; 271:C1424-C1437; 1996.
- ☞ Berlett, B. S., Levine, R. L. e Stadtman, E. R.; **“Carbon dioxide stimulates peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine residues and inhibits oxidation of methionine residues of glutamine synthetase: both modifications mimic effects of adenylation”**; *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 95(6):2784-2789; 1998.
- ☞ Birnboim, H. C., Lemay, A. M., Lam, D. K., Goldstein, R. e Webb, J. R.; **“Cutting edge: MHC class II-restricted peptides containing the inflammation-associated marker 3-nitrotyrosine evade central tolerance and elicit a robust cell-mediated immune response”**; *J. Immunol.*; 171(2):528-532; 2003.

- Blanchard-Fillion, B., Souza, J. M., Friel, T., Jiang, G. C., Vrana, K., Sharov, V., Barrón, L., Schöneich, C., Quijano, C., Alvarez, B., Radi, R., Przedborski, S., Fernando, G. S., Horwitz, J. e Ischiropoulos, H.; **“Nitration and inactivation of tyrosine hydroxylase by peroxynitrite”**; *J. Biol. Chem.*; 276(49):46017-46023; 2001.
- Bobkova, E. A., Bobkov, A. A., Levitsky, D. I. e Reisler, E.; **“Effects of SH1 and SH2 modifications on myosin, similarities and differences”**; *Biophys. J.*; 76:1001-1007; 1999.
- Bonini, M. J., Radi, R., Ferrer-Sueta, G., Ferreira, A. M. D. C. e Augusto, O.; **“Direct epr detection of the carbonate radical anion produced from peroxynitrite and carbon dioxide”**; *J. Biol. Chem.*; 274:10802-10806; 1999.
- Borutaite, V., Budriunaite, A. e Brown, G. C.; **“Reversal of nitric oxide-, peroxynitrite- and S-nitrosothiol-induced inhibition of mitochondrial respiration or complex I activity by light and thiols”**; *Biochim. Biophys. Acta*; 1459:405-412; 2000.
- Bradford, M. M.; **“A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”**; *Analyt. Biochem.*; 72:248-254; 1976.
- Buchczyk, D. P., Grune, T., Sies, H. e Klotz, L. O.; **“Modifications of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase induced by increasing concentrations of peroxynitrite: early recognition by 20S proteasome”**; *Biol. Chem.*; 384:237-241; 2003.
- Casadei, M., Persichini, T., Polticelli, F., Musci, G. e Colasanti, M.; **“S-Glutathionylation of metallothioneins by nitrosative/oxidative stress”**; *Exp. Gerontol.*; 43:415-422; 2008.
- Cassina, A. M., Hodara, R., Souza, J. M., Thomson, L., Castro, L., Ischiropoulos, H., Freeman, B. A. e Radi, R.; **“Cytochrome c nitration by peroxynitrite”**; *J. Biol. Chem.*; 275(28):21409-21415; 2000.
- Castro, L. e Freeman, B.; **“Reactive oxygen species in human health and disease”**; *Nutrition*; 17:161-165; 2001.
- Cleland, W. W.; **“Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups”**; *Biochemistry*; 3(4):480-482; 1964.
- Creighton, T. E.; **“Proteins: structures and molecular properties”**; 2nd edition; *W. H. Freeman and Company*; 1997.
- Crow, J. P. e Beckman, J. S.; **“The role of peroxynitrite in nitric oxide-mediated toxicity”**; *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*; 196:57-73; 1995.
- Cuenda, A., Hernao, F. e Gutiérrez-Merino, C.; **“Distances between funcional sites of the Ca²⁺ + Mg²⁺-ATPase from sarcoplasmic reticulum using Co²⁺ as a spectrosopic ruler”**; *Eur. J. Biochem*; 194:663-670; 1990.
- Cui, K., Luo, X., Xu, K. e Ven Murthy, M.R.; **“Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants”**; *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*; 28:771-799; 2004.
- Dairou, J., Pluvinage, B., Noiran, J., Petit, E., Vinh, J., Haddad, I., Dupret, J. M. e Rodrigues-Lima, L.; **“Nitration of a critical tyrosine residue in the allosteric inhibitor site of muscle glycogen phosphorylase impairs its catalytic activity”**; *L. Mol. Biol.*; 372(4):1009-1021; 2007.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D. e Milzani, A.; **“Biomarkers of oxidative damage in human disease”**; *Clin. Chem.*; 52(4): 601-623; 2006.

- De Grey, A. D. N. J.; “**Free radicals in aging: Causal complexity and its biomedical implications**”; *Free Radic. Res.*; 40(12):1244-1249; 2006.
- Demicheli, V, Quijano, C., Alvarez, B. e Radi, R.; “Inactivation and nitration of human superoxide dismutase (SOD) by fluxes of nitric oxide and superoxide”; *Free Radic. Biol. Med.*; 42:1359-1368; 2007.
- Denicola, A., Freeman, B. A., Trujillo, M. e Radi, R.; “**Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations**”; *Arch. Biochem. Biophys.*; 333(1):49-58; 1996a.
- Denicola, A., Souza J. M. e Radi, R.; “**Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes**”; *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 95:3566-3571; 1998.
- Denicola, A., Souza, J. M., Radi, R. e Lissi, E.; “**Nitric oxide diffusion in membranes determined by fluorescence quenching**”; *Arch. Biochem. Biophys.*; 328:208-212; 1996b.
- Dringen, R.; “**Glutathione metabolism and oxidative stress in neurodegeneration**”; *Eur. J. Biochem.*; 267(16):4903-4903; 2000.
- Dröge, W.; “**Free radicals in the physiological control of cell function**”; *Physiol. Rev.*; 82:47-95; 2002.
- Farrell, A. J. e Blake, D. R.; “**Nitric oxide**”; *Ann. Rheum. Dis.*; 55(1):7-20; 1996.
- Fiske, C. H. e Subbarow, Y.; “**The colorimetric determination of phosphorus**”; *J. Biol. Chem.*; 66:375-400; 1925.
- Francescutti, D., Baldwin, J., Lee, L. e Mutus, B.; “**Peroxynitrite modifications of glutathione reductase: modelling studies and kinetics evidence suggest the modification of tyrosines at the glutathione disulfide binding site**”; *Protein Eng.*; 9(2):189-194; 1996.
- Fridovich, I.; “**Superoxide radical and superoxide dismutases**”; *Annu. Rev. Biochem.*; 64:97-112; 1995.
- Gadelha, F. R., Thomson, L., Fagian, M. M., Costa, A. D., Radi, R. e Vercesi, A. E.; “**Ca²⁺-independent permeabilization of the inner mitochondrial membrane by peroxynitrite is mediated by membrane protein thiol cross-linking and lipid peroxidation**”; *Arch. Biochem. Biophys.*; 345:243-250; 1997.
- Geeves, M. A. e Holmes, K. C.; “**Structural mechanism of muscle contraction**”; *Annu. Rev. Biochem.*; 68:687-728; 1999.
- Goldsby, R. A., Kindt, T. J. e Osborne, B. A.; “**Kuby Immunology**”; 4th edition; *W. H. Freeman and Company*; 2000.
- Goldstein, S. e Czapski, G.; “**The reaction of NO[•] with O₂^{•-} and HO₂[•]: a pulse radiolysis study**”; *Free Radic. Biol. Med.*; 19:505-510; 1995.
- Goldstein, S. e Merényi, G.; “**The chemistry of peroxynitrite: implications for biological activity**”; *Methods Enzymol.*; 436:49-61; 2008.
- Gole, M. D., Souza, J. M., Choi, I., Hertkom, C., Malcolm, S., Foust III. R. F., Finkel, B., Lanken, P. N. e Ischiropoulos, H.; “**Plasma proteins modified by tyrosine nitration in acute respiratory distress syndrome**”; *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*; 278(5):L961-L967; 2000.

- Goodwin, D. C., Gunther, M. R., Hsi, L. C., Crews, B. C., Eling, T. E., Mason, R. P. e Marnett, L. J.; **“Nitric oxide trapping of tyrosyl radicals generated during prostaglandin endoperoxide synthase turnover. Detection of the radical derivative of tyrosine 385”**; *J. Biol. Chem.*; 273(15):8903-8909; 1998.
- Gow, A., Duran, D., Thom, S. R. e Ischiropoulos, H.; **“Carbon dioxide enhancement of peroxynitrite-mediated protein tyrosine nitration”**; *Arch. Biochem. Biophys.*; 333(1):42-48; 1996a.
- Gow, A., Duran, D., Malcolm, S. e Ischiropoulos, H.; **“Effects of peroxynitrite-induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation”**; *FEBS Lett.*; 385:63-66; 1996b.
- Greenacre, S. A. e Ischiropoulos, H.; **“Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction”**; *Free Radic. Res.*; 34:541-581; 2001.
- Grune, T., Blasig, I. E., Sitte, N., Roloff, B., Haseloff, R. e Davies, K. J.; **“Peroxynitrite increases the degradation of aconitase and other cellular proteins by proteasome”**; *J. Biol. Chem.*; 273(18):10857-10862; 1998.
- Grune, T., Jung, T., Merker, K. e Davies, K. J.; **“Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion bodies, plaques, lipofuscin, ceroid, and “aggresomes” during oxidative stress, aging, and disease”**; *Int. J. Biochem. Cell Biol.*; 36(12):2519-2530; 2004.
- Guittet, O., Ducastel, B., Salem, J. S., Henry, Rubin, H., Lemaire, G. e Lepoivre, M.; **“Differential sensitivity of the tyrosyl radical of mouse ribonucleotide reductase to nitric oxide and peroxynitrite”**; *J. Biol. Chem.*; 273(34):22136-22144; 1998.
- Gutiérrez-Merino, C.; **“Get to liquid crystalline phase transition promotes a conformational reorganization of $\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+}$ -ATPase from sarcoplasmic reticulum in dimyristoylphosphatidylcholine reconstituted system”**; *Arch. Biochem. Biophys.*; 252:303-314; 1987.
- Halpern, M. J.; **“Bioquímica”**; Lidel, edições técnicas; 1997.
- Herzog, J., Maekawa, Y., Cirrito, T. P., Illian, B. S. e Unanue, E. R.; **“Activated antigenpresentig cells select and present chemically modified peptides recognised by unique CD4 T cells”**; *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 102 (22):7928-7933; 2005.
- Holmes, K. C. e Geeves, M. A.; **“The structural basis of muscle contraction”**; *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*; 355(1396):419-431; 2000.
- Holmgren, A.; **“Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems”**; *Antioxid. Redox. Signal.*; 2:811-820; 2000.
- Holmgren, A., Johansson, C., Berndt, C., Lonn, M. E., Hudemann, C. e Lilling, C. H.; **“Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems”**; *Biochem. Soc. Trans.*; 33:1375-1377; 2005.
- Hong, S. J., Gokulrangan, G. e Schöneich, C.; **“Proteomic analysis of age dependent nitration of rat cardiac proteins by solution isoelectric focusing coupled to nanoHPLC tandem mass spectrometry”**; *Exp. Gerontol.*; 42:639-651; 2007.
- Höök, P., Sriramoju, V. e Larsson, L.; **“Effects of aging on actin sliding speed on myosin from single skeletal muscle cells of mice, rats, and humans”**; *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*; 280:C782-C788; 2001.

- 📖 Huie, R. E. e Padmaja, S.; **“The reaction of NO with superoxide”**; *Free Radic. Res. Commun.*; 18:195-199; 1993.
- 📖 Hurne, A. M., Chai, C. L. L. e Waring, P.; **“Inactivation of rabbit muscle creatine kinase by reversible formation of an internal disulfide bond induced by the fungal toxin gliotoxin”**; *J. Biol. Chem.*; 275(33):25202-25206; 2000.
- 📖 Ischiropoulos, H. e Al-Mehdi, A. B.; **“Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications”**; *FEBS Lett.*; 364:279-282; 1995.
- 📖 Ischiropoulos, H. e Beckman, J. S.; **“Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: Cause, effect, or association?”**; *J. Clin. Invest.*; 111(2):163-169; 2003.
- 📖 Ischiropoulos, H., Zhu, L. e Beckman, J. S.; **“Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide”**; *Arch. Biochem. Biophys.*; 298(2):446-451; 1992.
- 📖 Jackson, M. J.; **“Reactive oxygen species and redox-regulation of skeletal muscle adaptations to exercise”**; *Phil. Trans. R. Soc. B.*; 360:2285-2291; 2005.
- 📖 Jackson, M. J. e O’Farrell, S.; **“Free radicals and muscle damage”**; *Br. Med. Bull.*; 49:630-641; 1993.
- 📖 Jacob, C., Holme, A. L. e Fry, F. H.; **“The sulfinic acid switch in proteins”**; *Org. Biomol. Chem.*; 2:1953-1956; 2004.
- 📖 Ji, Y., Neverona, I., Van Eyk, J. E. e Bennett, B. M.; **“Nitration of tyrosine 92 mediates the activations of rat microsomal glutathione s-transferase by peroxynitrite”**; *J. Biol. Chem.*; 281(4):1986-1991; 2006.
- 📖 Kamisaki, Y., Wada, K., Bian, K., Balabanli, B., Davis, K., Martin, E., Behbod, F., Lee, Y. C. e Murad, F.; **“An activity in rat tissues that modifies nitrotyrosines-containing proteins”**; *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 95(20):11584-11589; 1998.
- 📖 Kanski, J., Behring, A., Pelling, J. e Schöneich, C.; **“Proteomic identification of 3-nitrotyrosine-containing rat cardiac proteins: effects of biological aging”**; *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*; 288(1):H371-H381; 2005a.
- 📖 Kanski, J., Hong, S. J. e Schöneich, C.; **“Proteomic analysis of protein nitration in aging skeletal muscle and identification of nitrotyrosine-containing sequences *in vivo* by nanoelectrospray ionization tandem mass spectrometry”**; *J. Biol. Chem.*; 280(25):24261-24266; 2005b.
- 📖 Kirsch, M., Lomonosova, E. E., Korth, H. G., Sustmann, R. e Groot, H.; **“Hydrogen peroxide formation by reaction of peroxynitrite with HEPES and related tertiary amines”**; *J. Biol. Chem.*; 273(21):12716-12724; 1998.
- 📖 Kissner, R., Nauser, T., Bugnon, P., Lye, P. G. e Koppenol, W. H.; **“Formation and properties of peroxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis”**; *Chem. Res. Toxicol.*; 10:1285-1292; 1997.
- 📖 Klaassen, C. D.; **“Casarett & Doull’s Toxicology: the basic science of poisons”**; 6th edition; *McGraw-Hill*; 2001.
- 📖 Konorev, E. A., Hogg, N. e Kalyanaraman, B.; **“Rapid and irreversible inhibition of creatine kinase by peroxynitrite”**; *FEBS Lett.*; 427:171-174; 1998.

- 📖 Kooy, N. W., Lewis, S. J., Royall, J. A., Ye, Y. Z., Kelly, D. R. e Beckman, J. S.; **“Extensive tyrosine nitration in human myocardial inflammation: evidence for the presence of peroxynitrite”**; *Crit. Care Med.*; 25(5):812-819; 1997.
- 📖 Koppenol, W. H., Moreno, J. J., Pryor, W. A., Ischiropoulos, H. e Beckman, J. S.; **“Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide”**; *Chem. Res. Toxicol.*; 5:834-842; 1992.
- 📖 Kunsch, C. e Medford, R. M.; **“Oxidative stress as a regulator of gene expression in vasculature”**; *Circ. Res.*; 85:753-766; 1999.
- 📖 Laemmli, U. K.; **“Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4”**; *Nature*; 227:680-685; 1970.
- 📖 Landcaster, J. R. Jr.; **“Stimulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide”**; *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 91:8137-8141; 1994.
- 📖 Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D. e Darnel, J.; **“Molecular cell biology”**; 4th edition; *W. H. Freeman and Company*; 2000.
- 📖 Lowey, S., Slayter, H. S., Weeds, A. G. e Baker, H.; **“Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation”**; *J. Biol. Chem.*; 42:1-29; 1969.
- 📖 Lyman, S. V. e Hurst, J. K.; **“Rapid reaction between peroxynitrite ion and carbon dioxide: implication for biological activity”**; *J. Am. Chem. Soc.*; 117:8867-8868; 1995.
- 📖 MacMillan-Crow, L. A., Crow, J. P., Kerby, J. D., Beckman, J. S. e Thompson, J. A.; **“Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts”**; *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 93(21):11853-11858; 1996.
- 📖 MacMillan-Crow, L. A., Crow, J. P. e Thompson, J. A.; **“Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues”**; *Biochemistry*; 37:1613-1622; 1998.
- 📖 Margossian, S. S. e Lowey, S.; **“Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle”**; *Methods Enzymol.*; 85:55-71; 1982.
- 📖 Marla, S. S., Lee, J. e Groves, J. T.; **“Peroxynitrite rapidly permeates phospholipid membranes”**; *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 94:14243-14248; 1997.
- 📖 Martín-Romero, F. J., Gutiérrez-Martín, Y., Hernao, F. e Gutiérrez-Merino, C.; **“The NADH oxidase activity of the plasma membrane of synaptosomes is a major source of superoxide anion and is inhibited by peroxynitrite”**; *J. Neurochem.*; 82:604-614; 2002.
- 📖 Mihm, M. J. e Bauer, J. A.; **“Peroxynitrite-induced inhibition and nitration of cardiac myofibrillar creatine kinase”**; *Biochimie*; 84:1013-1019; 2002.
- 📖 Mihm, M. J., Coyle, C., Schanbacher, B. L., Weinstein, D. W. e Bauer, J. A.; **“Peroxynitrite induced nitration and inactivation of myofibrillar creatine kinase in experimental heart failure”**; *Cardiovasc. Res.*; 49:798-807; 2001a.
- 📖 Mihm, M. J., Yu, F., Carnes, C. A., Reiser, P. J., McCarthy, P. M., Van Wagoner, D. R. e Bauer, J. A.; **“Impaired myofibrillar energetics and oxidative injury during human atrial fibrillation”**; *Circulation*; 104:174-180; 2001b.
- 📖 Mihm, M. J., Yu, F., Reiser, P. J. e Bauer, J. A.; **“Effects of peroxynitrite on isolated cardiac trabeculae: selective impact on myofibrillar energetic controllers”**; *Biochimie*; 85:587-596; 2003.

- 📖 Murphy, M. P., Packer, M. A., Scarlett, J. L. e Martin, S. W.; **“Peroxynitrite: a biologically significant oxidant”**; *Gen. Pharmacol.*; 31(2):179-186; 1998.
- 📖 Ohshima, H., Friesen, M., Brouet, I. e Bartsch, H.; **“Nitrotyrosine as a new marker for endogenous nitrosation and nitration of proteins”**; *Food Chem. Toxicol.*; 28(9):647-652; 1990.
- 📖 Pacher, P., Beckman, J. S. e Liaudet, L.; **“Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease”**; *Physiol. Rev.*; 87(1):315-424; 2007.
- 📖 Pardee J. D. e Spudich, J. A.; **“Purification of muscle actin”**; *Methods Enzymol*; 85:164-181; 1982.
- 📖 Petropoulos, I e Friguet, B.; **“Maintenance of proteins and aging: the role of oxidized protein repair”**; *Free Radic. Res.*; 40(12):1269-1267; 2006.
- 📖 Pfeiffer, S. e Mayer, B.; **“Lack of tyrosine nitration by peroxynitrite generated at physiological pH”**; *J. Biol. Chem.*; 273(42): 27280-27285; 1998.
- 📖 Quintas, A., Freire, A. P., Halpern, M.J.; **“Bioquímica, Organização molecular da vida”**; Lidel edições técnicas; 2008.
- 📖 Radi, R.; **“Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration”**; *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 101(12):4003-4008; 2004.
- 📖 Radi, R.; **“Peroxynitrite reactions and diffusion in biology”**; *Chem. Res. Toxicol.*; 11(7):720-721; 1998.
- 📖 Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M. e Freeman, B. A.; **“Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potencial of superoxide and nitric oxide”**; *J. Biol. Chem.*; 266(7):4244-4250; 1991.
- 📖 Radi, R., Cassina, A. e Hondara, R.; **“Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria”**; *Biol. Chem.*; 383:401-409; 2002a.
- 📖 Radi, R., Cassina, A., Hondara, R., Quijano, C. e Castro, L.; **“Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria”**; *Free Radic. Biol. Med.*; 33:1451-1464; 2002b.
- 📖 Radi, R., Denicola, A. e Freeman, B. A.; **“Peroxynitrite reactions with carbon dioxide-bicarbonate”**; *Methods Enzymol.*; 301:353-367; 1999.
- 📖 Radi, R., Peluffo, G., Alvarez, M. N., Naviliat, M. e Cayota, A.; **“Unraveling peroxynitrite formation in biological systems”**; *Free Radic. Biol. Med.*; 30(5):463-488; 2001.
- 📖 Radi, R., Rodriguez, M., Castro, L. e Telleri, R.; **“Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite”**; *Arch. Biochem. Biophys.*; 308:89-95; 1994.
- 📖 Rahman, I., Biswas, S. K. e Kode, A.; **“Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases”**; *Eur. J. Pharmacol.*; 533:222-239; 2006.
- 📖 Ramos, S.; **“Efeito do anião peroxinitrito na função e estrutura da actina de músculo esquelético de coelho”**; Relatório de estágio do curso de licenciatura em Bioquímica; Faculdade de Ciências e Tecnologia; Universidade do Algarve; 2005.
- 📖 Rayment, I.; **“The structural basis of the myosin ATPase activity”**; *J. Biol. Chem.*; 271(27):15850-15853; 1996.
- 📖 Rayment, I., Rypniewski, W. R., Schmidt-Base, K., Smith, R., Tomchick, D. R., Benning, M. M., Winkelmann, D. A., Wesenberg, G. e Holden, H. M.; **“Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor”**; *Science*; 261:50-58; 1993.

- Rayment, I., Smith, C. e Yount, R. G.; **“The active site of myosin”**; *Annu. Rev. Physiol.*; 58:671-702; 1996.
- Reid, M. B.; **“Redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don’t”**; *J. Appl. Physiol.*; 90:724-731; 2001.
- Reisler, E.; **“Sulfhydryl modification and labeling of myosin”**; *Methods Enzymol.*; 85:84-93; 1982.
- Reynolds, M. R., Berry, R. W. e Binder, L. I.; **“Nitration in neurodegeneration: deciphering the “Hows” “nYs””**; *Biochemistry*; 46(25):7325-7336; 2007.
- Roberts, E. S., Lin, H., Crowley, J. R., Vuletich, J. L., Osawa, Y. e Hollenberg, P. F.; **“Peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine and inactivation of the catalytic activity of cytochrome P450 2B1”**; *Chem. Res. Toxicol.*; 11(9):1067-1074; 1998.
- Roby, J. F. e White, B. J.; **“Biochemical techniques theory and practice”**; *Waveland Press Inc.*; 1990.
- Ryu, S. D., Yi, H. G., Cha, Y. N., Kang, J. H., Kang, J. S., Jeon, Y. C., Park, H. K., Yu, T. M., Lee, J. N. e Park, C. S.; **“Flavin-containing monooxygenase activity can be inhibited by nitric oxide-mediated S-nitrosylation”**; *Life Sci.*; 75(21):2559-2572; 2004.
- Santos, A.; **“Estudo da reversão das alterações funcionais da actina após processo de oxidação/redução”**; Relatório de estágio da licenciatura em Bioquímica; Faculdade de Ciências e Tecnologia; Universidade do Algarve; 2007.
- Saunders, A. H. e Booker, S. J.; **“Regulation of the activity of *Escherichia coli* quinolinate synthase by reversible disulfide-bond formation”**; *Biochemistry*; 47(33):8467-8469; 2008.
- Savvides, S. N., Scheiwein, M., Bohme, C. C., Arteel, G. E., Karplus, P. A., Becker, K. e Schirmer, K.; **“Crystal structure of the antioxidant enzyme glutathione reductase inactivated by peroxynitrite”**; *J. Biol. Chem.*; 277(4):2779-2784; 2002.
- Sayre, L. M., Perry, G. e Smith, M. A.; **“Oxidative stress and neurotoxicity”**; *Chem. Res. Toxicol.*; 21:172-188; 2008.
- Schmidt, K., Pfeiffer, S. e Mayer, B.; **“Reaction of peroxynitrite with HEPES or MOPS results in the formation of nitric oxide donors”**; *Free Radic. Biol. Med.*; 24:859-862; 1998.
- Schmidt, P., Youhnovshi, N., Daiber, A., Balan, A., Arsic, M., Bachschmid, M., Przybylski, M. e Ullrich, V.; **“Specific nitration at tyrosine 430 revealed by high resolution mass spectrometry as basis for redox regulation of bovine prostacyclin synthase”**; *J. Biol. Chem.*; 278:12813-12819; 2003.
- Schopfer, F. J., Baker, P. R. e Freeman, B. A.; **“NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response?”**; *Trends. Biochem. Sci.*; 28(12):646-654; 2003.
- Seidel, E. R., Ragan, V. e Liu, L.; **“Peroxynitrite inhibits the activity of ornithine decarboxylase”**; *Life Sci.*; 68(13):1477-1483; 2001.
- Sellers, J. R.; **“Myosins”**; 2nd edition; *Oxford University Press*; 1999.
- Sies, H.; **“Oxidative stress: oxidants and antioxidants”**; *Exp. Physiol.*; 82(2):291-295; 1997.

- ☞ Sies, H. e Arteel, G. E.; “**Interaction of peroxynitrite with selenoproteins and glutathione peroxidase mimics**”; *Free Radic. Biol. Med.*; 28(10):1451-1455; 2000.
- ☞ Sies, H., Sharov, V. S., Klotz, L.-O. e Briviba, K.; “**Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations**”; *J. Biol. Chem.*; 272(44):27812-27817; 1997.
- ☞ Silva, D.; “**Efeito de peroxinitrito nos resíduos de actina e na sua polimerização**”; Relatório de estágio da licenciatura em Bioquímica; Faculdade de Ciências e Tecnologia; Universidade do Algarve; 2006.
- ☞ Simão, S.; “**Susceptibilidade do subfragmento-1 de miosina de músculo esquelético de coelho ao peroxinitrito**”; Relatório de estágio da licenciatura em Bioquímica; Faculdade de Ciências e Tecnologia; Universidade do Algarve; 2004.
- ☞ Snook, J. H., Li, J., Helmke, B. P. e Guilford, W. H.; “**Peroxynitrite inhibits myofibrillar protein function in an in vitro assay of motility**”; *Free Radic. Biol. Med.*; 44:14-23; 2008.
- ☞ Souza, J. M., Daikhin, E., Yudkoff, M., Raman, C. S. e Ischiropoulos, H.; “**Factors determining the selectivity of protein tyrosine nitration**”; *Arch. Biochem. Biophys.*; 371(2):169-178; 1999.
- ☞ Souza, J. M., Peluffo, G. e Radi, R.; “**Protein tyrosine nitration – Functional alteration or just a biomarker?**”; *Free Radic. Biol. Med.*; 45(4):357-366; 2008.
- ☞ Souza, J. M. e Radi, R.; “**Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inactivation by peroxynitrite**”; *Arch. Biochem. Biophys.*; 360:187-194; 1998.
- ☞ Squier, T. C.; “**Oxidative stress and protein aggregation during biological aging**”; *Exp. Gerontol.*; 36:1539-1550; 2001.
- ☞ Szabó, C., Ischiropoulos, H. e Radi, R.; “**Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics**”; *Nat. Rev. Drug. Discov.*; 6:662-680; 2007.
- ☞ Taussky, H. H. e Shorr, E.; “**A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorous**”; *J. Biol. Chem.*; 202:675-685; 1953.
- ☞ Thannickal, V. J. e Fanburg, B. L.; “**Reactive oxygen species in cell signaling**”; *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*; 279:L1005-L1028; 2000.
- ☞ Thomson, L., Christie, J., Vadseth, C., Lanken, P. N., Fu, X., Hazen, S. L. e Ischiropoulos, H.; “**Identification of immunoglobulins that recognise 3-nitrotyrosine in patients with acute lung injury after major trauma**”; *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*; 36(2):152-157; 2007.
- ☞ Tiago, T.; “**Vanádio (V) como sonda de estudo na contração muscular**”; Tese de doutoramento; Faculdade de Ciências e Tecnologia; Universidade do Algarve; 2005.
- ☞ Tiago, T., Aureliano, M. e Gutiérrez-Merino, C.; “**Effects of reactive oxygen and nitrogen species on actomyosin and their implications for muscle contractility**”; *Free Radic. Biol. Med.*; 6:131-149; 2008.
- ☞ Tiago, T., Simão, S., Aureliano, M., Martín-Romero, F. J. e Gutiérrez-Merino, C.; “**Inhibition of skeletal muscle S1-Myosin ATPase by peroxynitrite**”; *Biochemistry*; 45(11):3794-3804; 2006a.
- ☞ Tiago, T., Ramos, S., Aureliano, M. e Gutiérrez-Merino, C.; “**Peroxynitrite induces F-actin depolymerization and blockade of myosin ATPase stimulation**”; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 342:44-49; 2006b.

- 📖 Tien, M., Berlett, B. S., Levine, R. L., Chock, P. B. e Stadtman, E. R.; **“Peroxynitrite-mediated modification of proteins at physiological carbon dioxide concentration: pH dependence of carbonyl formation, tyrosine nitration, and methionine oxidation”**; *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 96:7809-7814; 1999.
- 📖 Traverse, J. H., Nesmelov, Y. E., Crampton, M., Lindstrom, P., Thomas, D. D. e Bache, R. J.; **“Measurement of myocardial free radicals production during exercise using EPR spectroscopy”**; *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*; 290:H2453-H2458; 2006.
- 📖 Trostchansky, A., O'Donnell, V. B., Goodwin, D. C., Landino, L. M., Marnett, L. J., Radi, R. e Rubbo, H.; **“Interactions between nitric oxide and peroxynitrite during prostaglandin endoperoxide H synthase-1 catalysis: a free radical mechanism of inactivation”**; *Free Radic. Biol. Med.*; 42(7):1029-1038; 2007.
- 📖 Trujillo, M., Ferrer-Sueta, G. e Radi, R.; **“Peroxynitrite detoxification and its biologic implications”**; *Antioxid. Redox Signal.*; 10(9):1607-1620; 2008.
- 📖 Turko, I. V. e Murad, F.; **“Protein nitration in cardiovascular diseases”**; *Pharmacol. Rev.*; 54(4):619-634; 2002.
- 📖 Turrens, J. F.; **“Mitochondrial formation of reactive oxygen species”**; *J. Physiol.*; 552.2:335-344; 2003.
- 📖 Uppu, R. M. e Pryor, W. A.; **“Synthesis of peroxynitrite in a two-phase system using isoamyl nitrite and hydrogen peroxide”**; *Anal. Biochem.*; 236:242-249; 1996.
- 📖 Van der Vliet, A., Eiserich, J. P., O'Neill, C. A., Halliwell, B. e Cross, C. E.; **“Tyrosine modification by reactive nitrogen species: a closer look”**; *Arch. Biochem. Biophys.*; 319(2):341-349; 1995.
- 📖 Videira, A.; **“Engenharia genética: princípios e aplicações”**; *Lidel edições técnicas*; 2001.
- 📖 Voet, D. e Voet, J. G.; **“Biochemistry”**; 2nd edition; *John Wiley & Sons, Inc.*; 1995.
- 📖 Walsh, G.; **“Proteins: biochemistry and biotechnology”**; *John Wiley & Sons, Ltd*; 2002.
- 📖 Wilson, K. e Walker, J.; **“Principles and techniques of practical biochemistry”**; 5th edition; *Cambridge University Press*; 2000.
- 📖 Waterlow, J. C., Garlick, P. J. e Millward, D. J.; **“Protein turnover in mammalian tissues and whole body”**; *North-Holland Publishing*; 1978.
- 📖 Yamakura, F., Taka, H., Fujimura, T. e Murayama, K.; **“Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxynitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine”**; *J. Biol. Chem.*; 273:14085-14089; 1998.
- 📖 Ye, Y. Z., Strong, M., Huang, Z. Q. e Beckman, J. S.; **“Antibodies that recognize nitrotyrosine”**; *Methods Enzymol.*; 269:201-209; 1996.
- 📖 Zou, M., Martin, C. e Ullrich, V.; **“Tyrosine nitration as a mechanism of selective inactivation of prostacyclin synthase by peroxynitrite”**; *Biol. Chem.*; 378(7):707-713; 1997.

ANEXOS

ANEXO A: Abstract da comunicação em painel apresentado no XVI Congresso Nacional de Bioquímica da SPB, Açores 2008.

EFFECT OF TYROSINE NITRATION MEDIATED BY PEROXYNITRITE ON MYOSIN

Teresa Tiago^{1,2}, Pedro Palma¹, Carlos Gutiérrez-Merino² and Manuel Aureliano¹

¹) Center for Marine Sciences (CCMar), Depto. Química, Bioquímica e Farmácia, FCT, Universidade do Algarve, 8000-139 Faro, Portugal; ²) Grupo de Bioenergética en Neuronas y Miocitos, Depto. Bioquímica y Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, 06071-Badajoz, Spain;

The commonly used fingerprint-marker of peroxynitrite (ONOO⁻)-reactivity to proteins, 3-nitrotyrosine, has been shown to increase on myofibril proteins in skeletal muscle and heart during biological aging and in numerous disease settings including myocardial inflammation [J. Kanski et al. J. Biol. Chem., 280:24261-24266 (2005); N.W. Kooy et al. Crit. Care Med, 25:812-819 (1997)]. On the other hand, we have demonstrated that exposure of purified myosin to submicromolar fluxes of peroxynitrite produces strong inhibition of the actomyosin-ATPase activity that could be related with oxidation of the highly-reactive Cys on myosin [T. Tiago et al., Biochemistry; 45:3794-3804 (2006)]. Considering that Cys oxidation is largely reversible *in vivo* whereas Tyr-nitration is an irreversible post-translational modification, our aim was to evaluate the relevance of myosin nitration to the impairment of muscle contractility.

In order to optimize nitration conditions comparative studies were performed in phosphate (0.5M, pH7.2) versus Tris-buffer (0.5M, pH7.2). We found that nitration is more effective in phosphate than in Tris buffer with 2mol and 0.3mol of 3-nitrotyrosine/mol myosin when 50% of the F-actin-stimulated myosin-ATPase activity is lost, respectively. The presence of F-actin and Mg-ATP during the acute exposure to peroxynitrite prevented myosin nitration as shown by western-immunoblotting. Interesting differences were also observed with respect to the basal myosin-Mg-ATPase activity that was found to be stimulated by 250% and 150% for phosphate and Tris-buffer, respectively. Moreover, reversion of Cys oxidation by reducing agents such as DTT failed to re-established any of the previous ATPase activities, suggesting an important role for tyrosine-nitration in the impairment of the actomyosin-ATPase activity.

Teresa Tiago is supported by a post-doctoral grant (SFRH/BPD/20777/2004) from the Portuguese Foundation for Science and Technology (FCT). Work supported by the research project: FCT/POCI/SAU-MMO/57598/2004.

ANEXO B: Lista de reagentes utilizados na realização das actividades experimentais.**Quadro B.1:** Reagentes utilizados na realização das actividades experimentais e respectivas informações destes, nomeadamente a empresa responsável pela sua comercialização e o seu grau de pureza.

Reagente	Empresa	Grau de pureza (min.%)
Acetato de sódio (CH ₃ COONa)	Merck	99
Acetona (C ₃ H ₆ O)	JMGS	99,5
Ácido acético glacial (C ₂ H ₄ O ₂)	Merck	99,8
Ácido clorídrico (HCl)	Riedel-de Haen	37
Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)	BDH	98
Ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄)	Merck	95-97
Ácido tricloroacético (CCl ₃ COOH)	Sigma	99,0
Acrilamida (C ₃ H ₅ NO)	Fluka	99,0
Ácido 4-amino-3-hidroxi-1-naftalenosulfónico (C ₁₀ H ₉ NO ₄ S)	Sigma	99,9
Albumina de soro bovino (BSA)	Merck	97
Anticorpo primário (anti-nitrotirosina, rato)	Calbiochem	*
Anticorpo secundário (anti-rato <i>horseradish peroxidase</i> (HRP))	Biorad	*
Azida de sódio (NaN ₃)	Riedel-de Haen	99
α-Quimotripsina	Sigma	**
Bicarbonato de di-potássio (K ₂ CO ₃)	Riedel-de Haen	99
Bicarbonato de potássio (KHCO ₃)	Sigma	99,9
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃)	Pronalab	99,5
Bissulfito de sódio (Na ₂ S ₂ O ₅)	Sigma	99
β-Mercaptoetanol (C ₂ H ₆ OS)	Merck	98,0
Carbonato de sódio (Na ₂ CO ₃)	JMGS	99,5
Cloreto de cálcio (CaCl ₂)	Merck	99,5
Cloreto de magnésio (MgCl ₂)	Riedel-de Haen	99
Cloreto de potássio (KCl)	Panreac	99,5
Di-hidrogenofosfato de potássio (KH ₂ PO ₄)	Pronalab	99,5
Dimetilsulfóxido (DMSO) (C ₂ H ₆ OS)	Riedel-de Haen	99,9
Dióxido de manganês (MnO ₂)	BDH	99
5-5'-Ditiobis(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) (C ₁₄ H ₈ N ₂ O ₈ S ₂)	Sigma	98
Ditiotreitól (DTT) (C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂)	Acros	99%
DL-Cisteína (C ₃ H ₇ NO ₂ S.HCl)	Sigma	95
Dodecil sulfato de sódio (SDS) (C ₁₂ H ₂₅ O ₄ S.Na)	Sigma-Aldrich	98,5
Etanol (C ₂ H ₆ O)	Riedel-de Haen	99,8
Fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (C ₇ H ₇ FO ₂ S)	Sigma	99
Fosfoenolpiruvato (PEP) (C ₃ H ₄ NaO ₆ P)	Sigma	97
Glicerol (C ₃ H ₈ O ₃)	Sigma	99
Glicina (C ₂ H ₅ NO ₂)	Sigma	99
Hidrogenofosfato de di-potássio (K ₂ HPO ₄)	Merck	99,0
Hidróxido de sódio (NaOH)	Pronalab	98,6
Hidróxido de potássio (KOH)	Pronalab	87,5
Inibidor de tripsina	Sigma	**
Kit de substrato e de amplificação Opti-4CN para Western blotting	Biorad	*
Lactato desidrogenase (LDH)	Roche	*
Marcador de alta massa molecular (36 – 205 kDa)	Sigma	*
Marcador de baixa massa molecular (6,5 – 66 kDa)	Sigma	*
Metanol (CH ₄ O)	Panreac	99,8
Molibdato de amónia ((NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O)	Pronalab	99
Na ₂ ATP (C ₁₀ H ₁₄ N ₅ Na ₂ O ₁₃ P ₃)	Sigma	99
NADH (C ₂₁ H ₂₈ N ₇ O ₁₇ P ₃ .xH ₂ O)	Sigma	97
Nitrito de sódio (NaNO ₂)	Merck	99
N,N'-metil- <i>bis</i> -acrilamida	BDH	97

N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED) (C ₆ H ₁₆ N ₂)	Sigma	99
Peróxido de hidrogénio (H ₂ O ₂)	Panreac	30
Persulfato de amónia (PSA) ((NH ₄) ₂ S ₂ O ₈)	Sigma	99
Piruvato cinase (PK)	Roche	*
Ponceau S	BDH	75
Reagente de Bradford	Sigma	*
Sacarose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	Panreac	99,5
Sulfito de sódio (Na ₂ SO ₃)	Pronalab	98
TES (C ₆ H ₁₅ NO ₆ S)	Sigma	99
Tripsina	Sigma	*
Tris (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Riedel-de Haen	99,5
Tween-20	Biorad	*

*: Informação não referida pela empresa no rótulo do respectivo reagente.

** : Parcialmente purificado

ANEXO C: Lista de equipamentos utilizados na realização das actividades experimentais.**Quadro C.1:** Equipamentos utilizados na realização das actividades experimentais e correspondentes marcas e modelos.

Equipamento	Marca / Modelo
Agitador (vortex)	Heidolph
Balança analítica	Oertling
Balança semi-analítica	Shimadzu
Banho térmico	Julabo 7A
Bomba de vácuo	Büchi Vac V-500
Cassetes de diálise	Pierce
Centrífuga de bancada	Eppendorf 5415D
Centrífuga refrigerada	Beckman J2-MC
Colunas de filtração em gel	Amersham Bioscience PD-10
Espectrofotómetro (UV/Vis)	Shimadzu UV-2401 PC
Medidor de pH	Grison GLP 21
Membrana de diálise	Sigma D-0405
Pipetas automáticas	Eppendorf
Placa térmica e de agitação	Agimatic-N
Tina de electroforese e de western blotting	Biorad
Ultracentrífuga	Beckman XL-80

ANEXO D: Constituição dos marcadores moleculares (proteínas padrão) da Sigma utilizados na electroforese e respectivas massas moleculares.

Tabela D.1: Proteínas padrão constituintes do marcador de alta massa molecular (36 – 205 kDa) da Sigma e respectivas massas moleculares.

Proteínas padrão	Massa molecular (kDa)
Miosina (músculo de coelho)	205
β -Galactosidase (<i>E. coli</i>)	116
Fosforilase b (músculo de coelho)	97
Frutose-6-fosfato cinase (músculo de coelho)	84
Albumina de soro bovino	66
Desidrogenase glutâmica (fígado de bovino)	55
Ovalbumina (ovo de galinha)	45
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (músculo de coelho)	36

Tabela D.2: Proteínas padrão constituintes do marcador de baixa massa molecular (6,5 – 66 kDa) da Sigma e respectivas massas moleculares.

Proteínas padrão	Massa molecular (kDa)
Albumina de soro bovino	66
Ovalbumina (ovo de galinha)	45
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (músculo de coelho)	36
Anidrase carbónica (eritrócitos de bovino)	29
Tripsinogénio (pâncreas de bovino)	24
Inibidor de tripsina (feijão de soja)	20
α -Lactalbumina (leite de bovino)	14,2
Aprotinina (pulmão de bovino)	6,5