

Universidade do Algarve

Faculdade de Ciência e Tecnologia

CCMAR

Centro de Ciências do Mar do Algarve



Estudo da reversão das alterações funcionais da
actina após processo de oxidação/ redução

André Gonçalo Antunes dos Santos

Relatório de Estágio da Licenciatura em Bioquímica

Orientadores:

Professor Doutor Manuel Aureliano Alves

Doutora Teresa Tiago

Faro, Dezembro de 2007

“O mais importante da vida não é a situação em que estamos, mas a direcção para a qual nos movemos.”

Oliver W. Holmes

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Doutor Manuel Aureliano Alves, por toda a disponibilidade e motivação despendida e todos os ensinamentos não só a nível científico mas também humano.

À Doutora Teresa Tiago, pela preciosa orientação, pela sua disponibilidade e conselhos transmitidos ao longo do estágio.

À doutora Denise, da Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais, da Universidade do Algarve, pela disponibilidade e ajuda na utilização da ultracentrifuga.

A todos os colegas de laboratório, Miguel, Ana, Sandra e Pedro pela companhia e boa disposição, nos bons e nos maus momentos. Em especial à Dorinda pela ajuda fundamental no início do estágio.

Aos meus pais por todo o sacrifício que fizeram para eu frequentar esta licenciatura, por todo o apoio e confiança que depositaram em mim. Aos meus irmãos, familiares e amigos de infância por todo o apoio transmitido.

Um agradecimento muito especial à Rosa que esteve sempre comigo ao longo deste tempo e que soube ouvir-me nos maus momentos, pela capacidade de me fazer feliz e de me ajudar em tudo o que foi necessário.

Ao Marco, Jorge, Cátia, Valdemar, Eduardo, Lopes, Cláudio, Pedro, Carlos, Ana Catarina, Ana Margarida, Ana Patrícia, Emilie, Palmira por todos os bons momentos que passamos juntos.

A todos os membros da Associação Desportiva Recreativa e Lúdica “O ANTRO” (desculpem, mas são muitos) por todos os bons momentos de convívio passados.

Lista de abreviaturas

Abs – Absorvência

ADP – Adenosina 5' -difosfato

ATP – Adenosina 5' –trifosfato

BSA – Albumina de soro bovino

CaCl₂ – Cloreto de Cálcio

CAT – Catalase

CNT – Anião 3-carboxilato-4-nitrotiofenolato

CO₂ – Dióxido de Carbono

CO₃²⁻ - Ião carbonato

•CO₃⁻ - Radical anião carbonato

Cys – Resíduo de cisteína

Da - Dalton

DNA – Ácido desoxiribonucleico

D.O. – Densidade óptica

DTNB – 5-5'-Ditiobis (2-ácido nitrobenzóico)

DTT – Ditiotritol

ε – Coeficiente de extinção molar

E – Diferença de potencial

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

f - Coeficiente de fricção

F-actina – Filamento de actina

G – Aceleração da gravidade

g – gramas

G-actina – Monómero de actina

GSH – Glutathiona reduzida

GSSG - Glutathiona oxidada

H₂O – Água

H₂O₂ – Peróxido de hidrogénio

HCl – Ácido clorídrico

IC₅₀ – Concentração que inibe 50%

K₂HPO₄ – Hidrogenofosfato dipotássio

KCl – Cloreto de potássio

KOH – Hidróxido de potássio

M – Metal

Met – Resíduo de metionina

β-mer. – β-mercaptoetanol

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

Na₂ATP – Adenosina 5'-trifosfato dissódio

NaCl – Cloreto de sódio

NaCO₃ – Carbonato de sódio

NAD⁺ - Nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada)

NADH – Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reduzida)

NADP⁺ - Fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada)

NADPH – Fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido (forma reduzida)

NaHCO₃ – Hidrogenocarbonato de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

•NO – Radical óxido nítrico

•NO₂ – Radical dióxido nítrico

NO – Óxido nítrico

NOS – Óxido nítrico sintetase

NO₃⁻ - Anião nitrato

•O₂⁻ - Anião radical superóxido

•OH – Radical hidroxilo

ONOO⁻ - Anião peroxinitrito

ONOOH – Ácido peroxinitroso

PDB ID – Código de identificação no “Protein data bank”

Pi – Fosfato inorgânico

PMSF – Flureto de fenilmeilsulfonilo

PSA – Persulfato de amónia

RNS – Espécies reactivas de nitrogénio

ROS – Espécies reactivas de oxigénio

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SDS –PAGE – Electroforese em gel de poliacrilamida em SDS

-S-H – Grupo tiol ou sulfidrilo

-S-S- - Ligação disulfeto ou dissulfídrica

SIN-1 – 3-Morfolinosidnomina

SOD – Superóxido dismutase

t_{1/2} – Tempo de meia vida

TEMED – N,N,N’N’-tetrametiletlenodiamida

Tris – 2-amino-2-hidroxi-metil-1,2-propanodiol

u.a. – Unidades arbitrárias

Resumo

A actina é uma das proteínas mais susceptíveis à oxidação através de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e de espécies reactivas de nitrogénio (RNS). Uma das espécies que oxida a actina é o peroxinitrito (ONOO^-), provocando oxidação das cisteínas e das metioninas. Esta oxidação parece estar directamente associada à despolimerização e inibição da formação dos filamentos de actina. Contudo, os organismos apresentam mecanismos de reversão da oxidação das cisteínas e das metioninas. Sabendo que agentes redutores, como o DTT e β -mercaptoetanol reduzem as ligações dissulfeto, assim procedeu-se à análise da possível reversibilidade das alterações funcionais induzidas por uma exposição crónica a peroxinitrito, através da reversão da oxidação das cisteínas pelos agentes redutores. Para tal determinou-se a cinética e extensão da polimerização, quantificou-se as cisteínas reduzidas e analisou-se a oxidação das metioninas na G-actina, sem contudo fazer os estudos preliminares necessários. Verificou-se que os filamentos de actina são bastante estáveis em solução de polimerização e que as metioninas 44 e 47 se encontram totalmente inacessíveis, enquanto que as cisteínas parecem estar parcialmente inacessíveis. Verificou-se ainda que a acessibilidade aos grupos tiol na G-actina é igual independentemente da concentração de actina e que os agentes redutores eliminam e/ou impedem a formação dos dímeros. Por fim, verificou-se a inexistência de total reversibilidade nas alterações funcionais da actina, tendo-se obtido um aumento de 78% na velocidade de polimerização e uma redução na extensão do filamento para amostras oxidadas. Após o tratamento com agentes redutores, ocorreu uma redução na velocidade de polimerização, na ordem dos 25-30 %. Sugere-se que as metioninas sejam o principal responsável pela não reversão da polimerização, porque não sofrem reversão da

oxidação. A total reversão da oxidação das cisteínas parece estar associada à ligeira recuperação da velocidade de polimerização na actina tratada com agente redutor após sofrer oxidação.

Abstract

Actin is one of the most abundant proteins in different organisms and can be found in two forms: monomeric (G-actin) and filament actin (F-actin). It performs basic functions, depending on its location, such as constitution of the cytoskeleton, cellular transportation and muscle contraction. Due to its abundance it's susceptible to oxidation by reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). One of these species is peroxynitrite (ONOO^-), causing oxidation in cysteines and methionines. This oxidation appears to be directly linked to depolymerization of actin filaments as well as the inhibition of the polymerization. However, the cells have mechanisms for reversing the oxidation of cysteines and methionines. Prior studies demonstrated that reducing agents such as DTT and β - mercaptoethanol reduce disulfide bonds, so we proceeded to the analysis of the possible reversibility on functional changes induced by chronic exposure to peroxynitrite, by reversing the oxidation of cysteines through reducing agents. The kinetics and extent of polymerization was monitored; reduced cysteines were quantified and oxidation of methionines in G-actin was probed. We found that actin filaments are quite stable in a polymerization solution and that methionines 44 and 47 are completely inaccessible, although the cysteines appear to be partially inaccessible. We found that the accessibility of thiol groups in G-actin is equal regardless of the concentration of actin. Peroxynitrite was found to be related in the elimination and/or inhibition of actin dimers. Finally, there was a total lack of reversible changes on the function of actin and an increase of 78% in the rate of polymerization was detected; there was also an impairment on the extent of the filament was detected in samples with oxidized actin. After treatment with reducing agents, a decrease in the rate of polymerization of about 25-30% was detected. Since methionines

are not prone to reversible oxidation, we pointed that fact to be the reason why polymerization does not occur in a totally reversible way. While the reversal oxidation of cysteines seems to be associated with mild recovery in the velocity of actin polymerization treated with a reducing agent after oxidation.

Índice:

| | |
|---|-----------|
| I. Introdução..... | 1 |
| I.1 Actina | 1 |
| I.1.1 Estrutura da actina | 2 |
| I.1.1.1 Actina globular (G-actina) | 2 |
| I.1.1.2 Filamentos de actina (G-actina) | 2 |
| I.1.2 Localização e funções da actina..... | 5 |
| I.2 Stresse oxidativo e nitrosativo | 6 |
| I.2.1 Produção de espécies oxidantes..... | 7 |
| I.2.1.1 Produção de espécies reactivas de oxigénio | 7 |
| I.2.1.2 Produção de espécies reactivas de nitrogénio..... | 9 |
| I.2.2 Reactividade de peroxinitrito..... | 11 |
| I.2.2.1 Alvos biológicos de peroxinitrito..... | 14 |
| I.2.2.1.1 Reactividade com cisteínas | 15 |
| I.2.2.1.2 Reactividade com metioninas..... | 16 |
| I.2.2.1.3 Reactividade com outros aminoácidos..... | 17 |
| I.2.2.1.4 Reactividade com lípidos..... | 18 |
| I.2.3 Patologias associadas ao peroxinitrito..... | 19 |
| I.3 Stresse oxidativo e nitrosativo na actina..... | 21 |
| I.4 Objectivo | 21 |
| II Materiais e Métodos..... | 22 |
| II.1 Reagentes | 22 |
| II.2 Isolamento de proteínas | 22 |
| II.2.1 Isolamento e purificação da actina..... | 24 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| II.2.1.1 | Obtenção do “Pó de acetona” | 24 |
| II.2.1.2 | Obtenção de G-actina e F-actina | 25 |
| II. 3 | Caracterização da actina..... | 27 |
| II.3.1 | Quantificação da actina | 27 |
| II.3.2 | Electoforese em condições desnaturantes | 28 |
| II.4 | Preparação de SIN-1 | 31 |
| II.4.1 | Decomposição de SIN-1..... | 31 |
| II.5 | Tratamento da actina com SIN-1..... | 32 |
| II.5.1 | Medição da polimerização e despolimerização de actina por dispersão de luz (“light scattering”)..... | 32 |
| II.5.2 | Quantificação de cisteínas reduzidas | 33 |
| II.5.3 | Quantificação da oxidação de metioninas na actina | 35 |
| II.5.4 | Determinação da formação dímeros | 36 |
| II.6 | Estudos de reversibilidade | 36 |
| III | Resultados e Discussão | 38 |
| III.1 | Isolamento e caracterização da actina | 38 |
| III.1.1 | Isolamento..... | 38 |
| III.1.2 | Caracterização | 38 |
| III.2 | Estudo da decomposição de SIN-1..... | 40 |
| III.3 | Estabilidade do filamento de actina e do acesso aos resíduos na F-actina | 41 |
| III.3.1 | Estabilidade do polímero de actina em solução de polimerização..... | 41 |
| III.3.2 | Acessibilidade às metioninas 44 e 47 na actina | 45 |
| III.3.2.1 | Acessibilidade às metioninas 44 e 47 após desnaturação proteica..... | 48 |
| III.3.3 | Quantificação das cisteínas reduzidas na F-actina | 50 |
| III.4 | Efeito da concentração de G-actina na acessibilidade aos grupos tiol..... | 54 |

| | |
|---|-----------|
| III.5 Formação de dímeros de G-actina..... | 58 |
| III.6 Estudo da reversibilidade da oxidação, por peroxinitrito, através de agentes redutores..... | 61 |
| III.6.1 Reversibilidade da oxidação nas cisteínas..... | 63 |
| III.6.2 Reversibilidade da oxidação nas metioninas 44 e 47..... | 67 |
| III.6.2.1 Reversibilidade da oxidação nas metioninas 44..... | 67 |
| III.6.2.2 Reversibilidade da oxidação nas metioninas 47..... | 69 |
| III.6.3 Estudo da reversibilidade do índice de polimerização da actina..... | 71 |
| IV. Conclusão..... | 77 |
| V. Estudos futuros..... | 78 |
| VI. Referências..... | 79 |

I. Introdução

A actina é uma das proteínas mais abundantes nos eucariotas e nos procariotas, encontrando-se frequentemente no citoplasma e nas células musculares dos animais superiores (Scheterline et al., 1998). O facto de estar em concentrações elevadas dentro das células torna-a susceptível à acção de espécies reactivas do oxigénio (ROS) e de nitrogénio (RNS) (Hinshaw et al., 1991). Estudos realizados anteriormente por diferentes autores, entre os quais Tiago e Dalle-Donne comprovam que a susceptibilidade da actina a estas espécies é muito elevada (Tiago et al., 2006 e Dalle-Donne et al., 1999 e 2022). No entanto o mecanismo de acção das espécies oxidantes nas biomoléculas, em especial na actina, ainda não se encontra totalmente revelado, bem como o respectivo mecanismo de defesa antioxidante.

I.1 Actina

A actina é uma das proteínas mais abundantes nas células eucariotas e constitui uma família altamente conservada de proteínas citoplasmáticas, podendo ser encontrada nas células de duas formas, a forma monomérica ou globular (G-actina) ou sob a forma de filamento (F-actina). Convencionalmente as actinas possuem uma massa molecular de 42 kDa, o que pode explicar o elevado grau de conservação da sequência de aminoácidos (374). A existência de várias isoformas nos eucariotas superiores, sugere que cada uma delas possui diferentes localizações e funções (Scheterline et al., 1998).

I.1.1 Estrutura da actina

I.1.1.1 Actina globular (G-actina)

A sequência de aminoácidos da actina do músculo esquelético de coelho foi determinada por Elzinga et al., (1973). A cadeia polipeptídica é constituída por 374 resíduos, dos quais 5 cisteínas na forma reduzida (Fig. 1.1 a vermelho) e 16 metioninas (Fig. 1.1 a ciano).

In vitro a actina apresenta-se na forma globular na ausência de sais (força iónica baixa), contudo quando a força iónica aumenta a actina polimeriza formando um filamento de cadeia dupla (F-actina) (Elzinga et al., 1973).

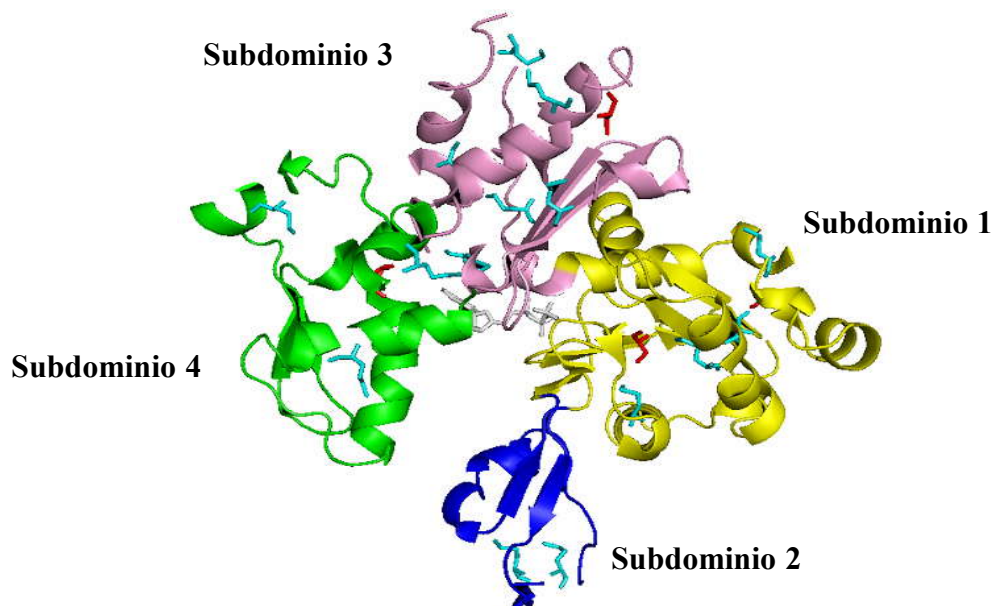


Figura 1.1: Estrutura da actina (PDB ID: 1ATN) obtida por pymol. (Amarelo) subdomínio 1, (Azul) subdomínio 2, (Rosa) subdomínio 3 e a (Verde) subdomínio 4. Os resíduos de cisteína e de metionina estão representados a vermelho e ciano, respectivamente.

I.1.1.2 Filamentos de actina (G-actina)

A F-actina (Fig. 1.2) é constituída por dois filamentos de G-actina dispostos em forma de hélice, medindo cerca de 1 μ M e 80 Å de diâmetro, nas células do músculo esquelético. Nas células, em geral, a F-actina e a G-actina encontram-se em equilíbrio

dinâmico, constituindo as moléculas de G-actina um conjunto citoplasmático que participa na formação dos novos filamento (Azevedo, 1999 e Scheterline et al., 1998, 1998).

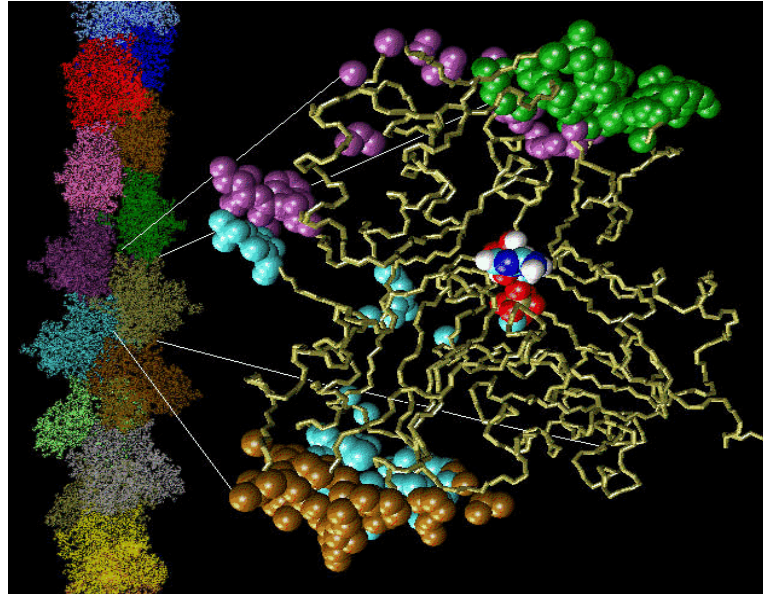


Figura 1.2: Estrutura tridimensional de um filamento de actina (esquerda) e de actina globular (direita) (Wriggers e Schulten et al., 1997).

O mecanismo de polimerização dos filamentos foi estudado por diferentes autores, entre os quais Carlier et al., (1998), que esquematizou o mecanismo de polimerização (Fig.1.3) proposto por Wegner et al., (1976). Segundo o qual, a F-actina possui duas extremidades, denominadas extremidades "mais" ou "barbed end" e "menos" ou "pointed ends". A polimerização da G-actina dá-se na extremidade "mais", quando a concentração crítica de G-actina (concentração mínima necessária para haver polimerização) é atingida ou ultrapassada. A G-actina complexada com o ATP promove o aumento do polímero enquanto que na extremidade "menos" ocorre a libertação de G-actina complexada com ADP, sob a forma de G-actina+ADP, o que promove a diminuição do filamento. Assim, o tamanho relativo da F-actina depende do influxo e da despolimerização de G-actina pelas extremidades "mais" e "menos",

respectivamente. A este mecanismo de associação e dissociação da G-actina denomina-se de “Treadmilling”.

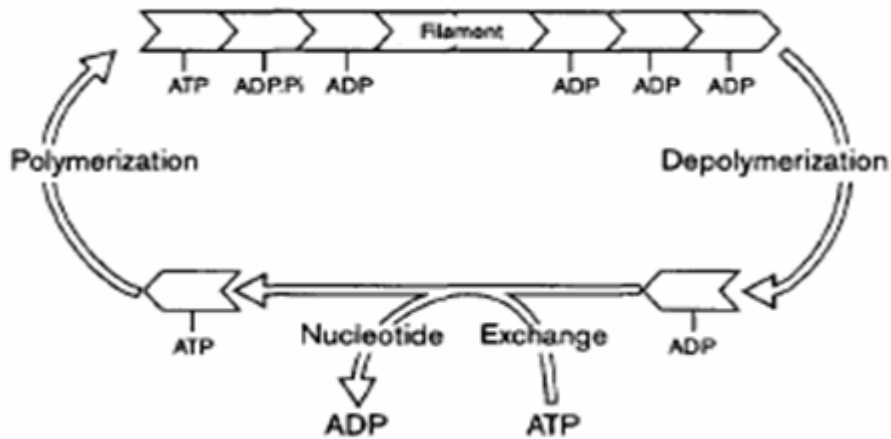



Figura 1.3: Mecanismo de formação da F-actina. A G-actina () na presença de ATP polimeriza originando F-actina, à medida que o filamento é polimerizado os monómeros vão se movimentando no sentido da “pointed end” passando por vários estados intermediários. Passa de ATP-G-actina a ADP+Pi-G-actina, por hidrólise do ATP, que após a libertação do Pi origina ADP-G-actina, seguindo-se a despolimerização (libertando-se ADP-G-actina). Através de um processo de troca a actina volta a complexar com o ATP e pode voltar a polimerizar (Carlier et al., 1998).

In vivo existem vários mecanismos que regulam a polimerização dos filamentos, como por exemplo proteínas que se ligam às extremidades, impossibilitando a polimerização ou despolimerização dos filamentos, assegurando um sistema altamente dinâmico (Carlier et al 1998 e Azevedo, 1999).

I.1.2 Localização e funções da actina

A actina tem várias funções dependendo do local onde se encontra, sendo que nas células musculares está envolvida no processo de contracção muscular através de interacções com miosina. Nas restantes células está envolvida na formação do citoesqueleto, transporte a nível intracelular, mobilidade celular. (Azevedo, 1999; Scheterline et al., 1998; Brener et al., 2002). Nos espermatozóides para além da formação do citoesqueleto é responsável pela formação do acrossoma (Makioka et al., 2000)

A actina encontra-se em maior abundância nas células musculares dos diferentes tipos de músculo, esquelético, liso e cardíaco. O músculo esquelético é constituído por fibras musculares, que por sua vez são constituídas por miofibrilas (Fig. 1.4). Cada uma contém vários sarcómeros que são constituídos por filamentos de miosina e filamentos de actina que interactuam entre si na presença de ATP e Ca^{2+} gerando força (Azevedo, 1999).

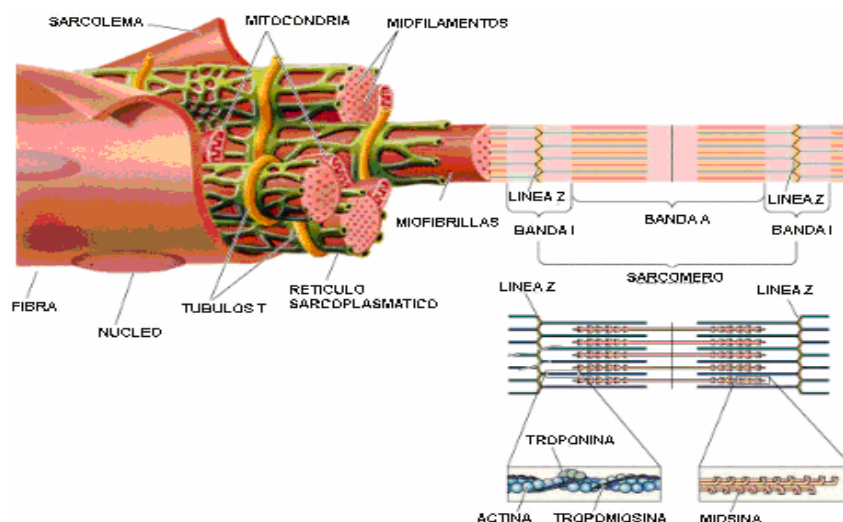


Figura 1.4: Organização estrutural de uma miofibrila (célula musculo esquelético).

No que diz respeito ao citoesqueleto, sabe-se que é formado por três tipos de polímeros, os microtúbulos, os microfilamentos (F-actina) e filamentos intermédios. A

actina do citoesqueleto contribui para alterações da forma da célula, alterando a estrutura “cross-linking” (rede) dos filamentos permitindo processos como o de fagocitose e de locomoção celular. Outras funções extremamente importantes são por exemplo servir de “âncora” para várias proteínas citoplasmáticas e transmembranares, transporte de organelos, controlo das funções dos canais iónicos e separação dos cromossomas na mitose e meiose (Elzinga et al., 1973, Scheterline et al., 1998 e Azevedo, 1999).

I.2 Stresse oxidativo e nitrosativo

O stresse oxidativo e/ou nitrosativo ocorre quando há um aumento de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e/ou de nitrogénio (RNS) e a capacidade de eliminação destes é inferior à de formação. Assim, o equilíbrio (Fig.1.5) entre as espécies oxidantes e antioxidantes é desviado no sentido das espécies oxidantes (Scandalios, 2002 A). A acumulação destas espécies promove a oxidação das biomoléculas, como proteínas, lípidos, DNA, glícidos alterando a sua estrutura e função (Ischiropoulos e Beckman, 2003). Estas alterações induzem o desenvolvimento de diferentes doenças, nomeadamente neurodegenerativas, cardíacas, vasculares, inflamatórias, cancro e diabetes, por alterações moleculares. Contudo, o mecanismo de oxidação e/ou nitrosilação também está envolvido no processo de sinalização celular, como indução da morte celular (apoptose), ou no processo de eliminação de agentes exteriores, como bactérias, através das células do sistema imunitário (Pacher et al., 2007; Castro e Freeman, 2001).

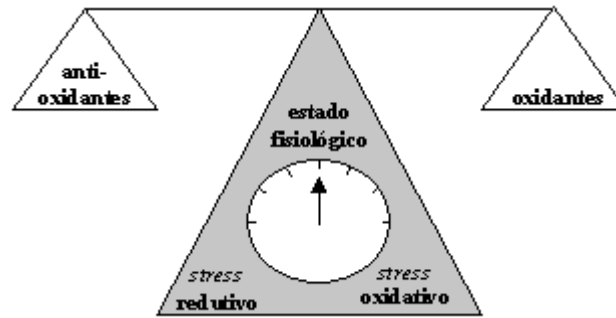


Figura 1.5: Equilíbrio entre espécies oxidantes e antioxidantes. Quando há uma acumulação de alguma destas espécies, há um desequilíbrio, provocando stresse redutivo no caso da acumulação de antioxidantes ou stresse oxidativo quando se acumula agentes oxidantes (www.dqb.fc.ul.pt/docentes/fantunes/stress1.gif).

I.2.1 Produção de espécies oxidantes

Durante os últimos 50 anos verificou-se um aumento do estudo dos agentes oxidantes e da sua eliminação. Tudo começou em 1954 quando Rebeca Gerschman e Daniel Gilbert descobriram que o efeito da radiação X no pulmão tem efeito semelhante à da elevada concentração de oxigénio (Castro e Freeman, 2001). Após esta descoberta e com o desenvolvimento da tecnologia começou-se a estudar os mecanismos de produção das diferentes espécies oxidantes.

I.2.1.1 Produção de espécies reactivas de oxigénio

Aproximadamente 95% do oxigénio (O_2) consumido pelos organismos aeróbicos, é reduzido a água (H_2O) na cadeia respiratória mitocondrial, contudo antes da formação de H_2O , por vezes, o O_2 é apenas reduzido por um electrão formando o radical anião superóxido ($\cdot O_2^-$), que após redução com um segundo electrão origina o peróxido de hidrogénio (H_2O_2). Durante a redução do H_2O_2 a H_2O ocorre a formação do radical

mais reactivo produzido no organismo, o radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) (Scandalios, 2005). O mecanismo de produção de O_2 em H_2O está representado na figura 1.6.

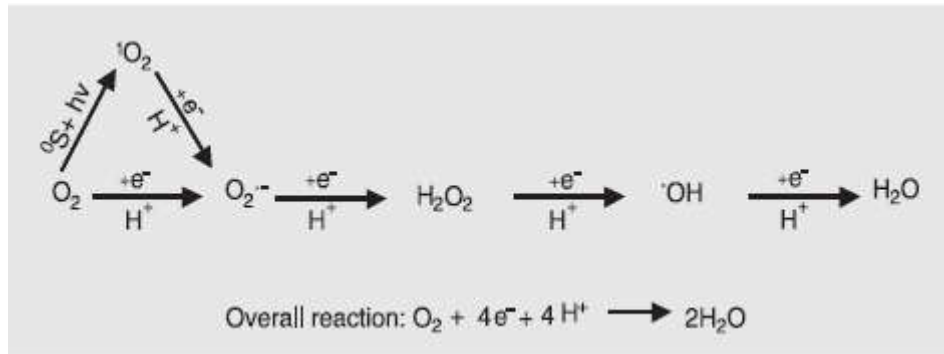


Figura 1.6: Mecanismo de formação do radical anião superóxido ($\cdot\text{O}_2$), do peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e do radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), no processo de redução do oxigénio (O_2) a água (H_2O) na cadeia respiratória mitocondrial (Scandalios, 2005).

O $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 e o $\cdot\text{OH}$, bem como outras espécies derivadas de oxigénio molecular produzidas de forma contínua nas células aeróbias, são denominados de espécies reactivas de oxigénio (ROS). Não só a cadeia respiratória é fonte de ROS nas células eucariotas. Os citocromos P450, flavoproteínas oxidases e o metabolismo de ácidos gordos peroximais são fontes destes agentes oxidantes. Os ROS produzidos nas NADPH oxidases de algumas células, as quais produzem $\cdot\text{O}_2^-$ através da oxidação do NADPH, sendo o radical um precursor de oxidantes secundários como H_2O_2 , oxigénio no estado singlete e halogénios oxidados utilizados pelos fagócitos para eliminar ou induzir danos nos microrganismos invasores (Castro e Freeman, 2001; Scandalios 2002 B). Contudo, existem evidências de que estas espécies têm um papel fundamental na sinalização intracelular, como por exemplo regulação na genética (Scandalios, 2005).

I.1.1.2 Produção de espécies reactivas de nitrogénio

Mais recentemente, nos anos 80, foi descoberta uma nova espécie radicalar denominada de óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$). Este radical é formado por uma família de enzimas denominadas de óxido nítrico sintetase (NOS) através da oxidação do grupo guanidina da L-arginina na presença de O_2 e de NADPH originando $\cdot\text{NO}$ e L-citrulina. Na figura 1.7 encontra-se o mecanismo de formação do radical óxido nítrico a partir da L-arginina (Ferrel e Blake, 1996).

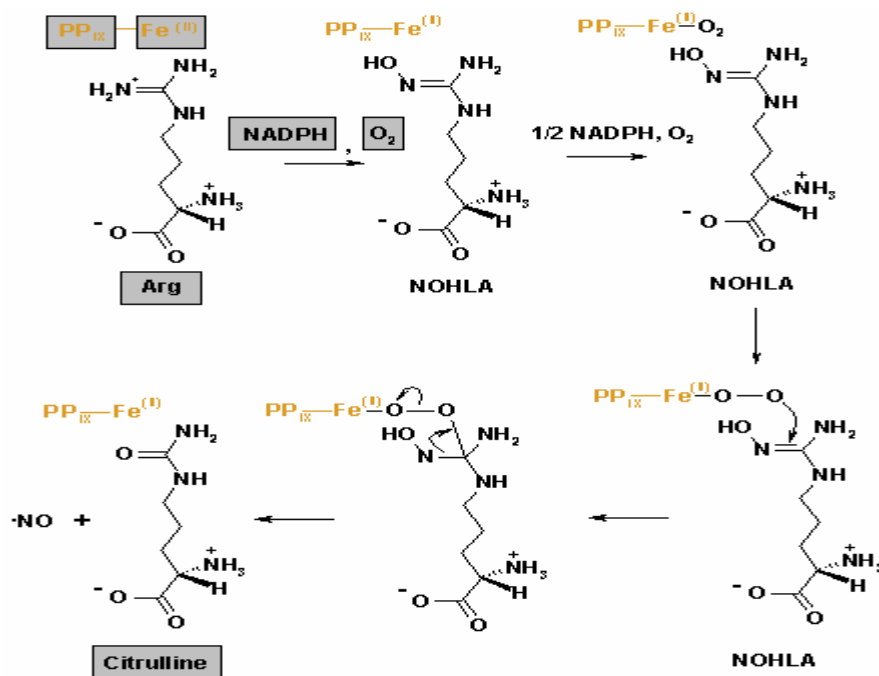
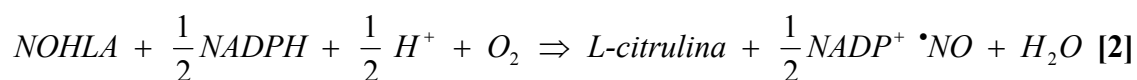


Figura 1.7: Mecanismo de produção do radical óxido nítrico pela óxido nítrico sintetase (NOS) através da oxidação do grupo guanidina da L-arginina originando citrulina na presença de oxigénio molecular e de NADPH. NOHLA- N^0 -hydroxy-L-arginine e $\text{PP}_\alpha\text{-Fe}^{(4)}$ – grupo heme das NOS (Furchgott e Zawadzki,1980), adaptado de www.answers.com/topic/nitric-oxide-synthase.

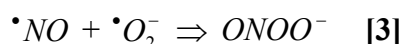
As equações seguintes (Eq. 1 e 2) resumem o mecanismo de formação do óxido nítrico através da NOS.



Ao contrário das ROS, o radical óxido nítrico tem um tempo de meia vida na ordem dos segundos e reage essencialmente com os grupos heme das proteínas (Castro e Freeman, 2001). Um excesso de produção deste pode ser tóxico porque reage facilmente com outras espécies radicalares, como por exemplo o $\cdot O_2^-$ formando o peroxinitrito ($ONOO^-$). A estas espécies oxidantes formadas a partir do $\cdot NO$ e ao próprio denominam-se de espécies reactivas de nitrogénio (RNS) (Furchgott e Zawadzki, 1980; Castro e Freeman, 2001).

I.2.1.2.1 Formação de peroxinitrito

A acumulação do radical óxido nítrico ($\cdot NO$) e do radical anião superóxido ($\cdot O_2^-$) favorece a produção do anião peroxinitrito ($ONOO^-$) (Eq. 3) (Beckman et al 1989) Esta reacção é controlada por difusão e altamente eficiente apresentando uma constante de reacção de segunda ordem de $6,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Huie et al., 1993; Goldstein et al., 1995; Kissner et al., 1997).



O peroxinitrito pode-se apresentar em equilíbrio com o seu ácido conjugado, contudo como o pKa é 6,8, 80 % do peroxinitrito apresenta-se sob a forma de anião a pH fisiológico. Os restantes 20 % na forma protonada reagem rapidamente ($k = 0,9 \text{ s}^{-1}$ a 37 °C a pH 7,4) formando nitrato (NO_3^-) (Eq. 4).



O peroxinitrito é mais reactivo do que os seus dois precursores, sendo considerado um oxidante forte que reage com as diferentes biomoléculas (Koppenol et al., 1992).

In vitro é possível obter o ONOO^- através da decomposição do composto 3-morpholino-sydnonimine (SIN-1). A decomposição do SIN-1, por oxidação, ocorre em três fases originando do radical anião superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e o radical óxido nítrico (NO) (Fig. 1.8). O NO e o $\text{O}_2^{\cdot-}$ reagem rapidamente entre si formando ONOO^- ($k = 3\text{-}6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Singht et al., 1999). A decomposição do SIN-1 produz pulsos lentos e contínuos de peroxinitrito, simulando desta forma uma exposição crónica (Singht et al., 1999).

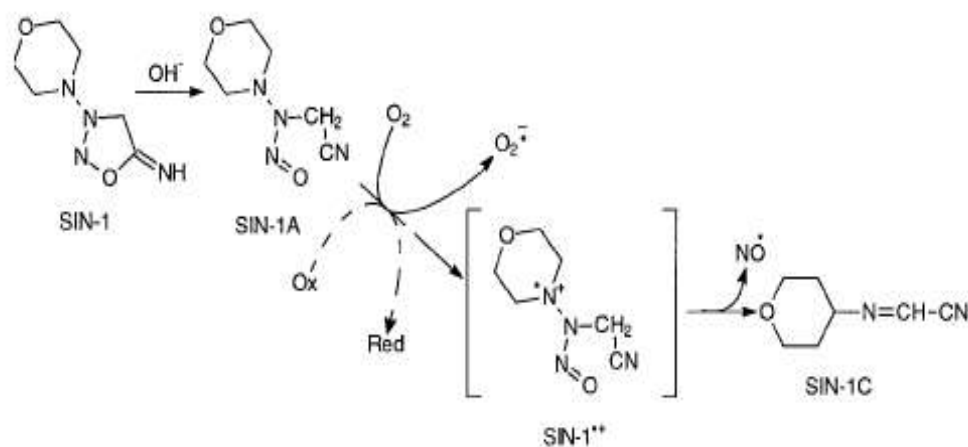


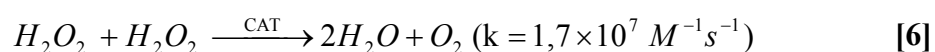
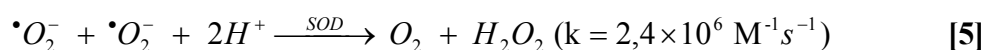
Figura 1.8: Esquema da oxidação do SIN-1 a SIN-1C e radical óxido nítrico (NO). Fase I - abertura do anel subdomínio por catálise básica, originando SIN-1A. Fase II – SIN-1A reduz o oxigénio molecular (O_2) a radical anião superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) originando o cation radical SIN-1^+ . Fase III – O SIN-1^+ é decomposta a radical óxido nítrico (NO) e SIN-1C. (Singht et al., 1999).

I.1.2 Reactividade de peroxinitrito

O peroxinitrito reage com biomoléculas por dois mecanismos possíveis: 1) o anião peroxinitrito (ONOO^-) e o ácido peroxinitroso (ONOOH) reagem directamente com algumas biomoléculas, como por exemplo proteínas, lípidos e DNA; 2) O ONOOH

pode sofrer homólise formando o radical dióxido de nitrogénio ($\cdot\text{NO}_2$) e o radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), que reagem com várias moléculas, provocando a nitração de tirosinas e peroxidação lipídica (Alvarez e Radi, 2003). Os grupos tiol que reagem directamente com o peroxinitrito também podem ser oxidados por estes dois radicais. O peroxinitrito e o seu ácido conjugado podem também reagir com metais oxidando-os e produzindo o radical dióxido nítrico ou a anião dióxido nítrico (Alvarez e Radi, 2003). Uma das vias radicalares mais importantes, nos organismos aeróbicos, é a reacção entre o peroxinitrito e o dióxido de carbono (CO_2), devida à elevada concentração de CO_2 no organismo. A reacção origina o radical carbonato ($\cdot\text{CO}_3^-$) e o radical dióxido nitrogénio. A sua combinação forma o ONOOCO_2^- que reage facilmente com biomoléculas. Este complexo mecanismo, de reacção do peroxinitrito com diferentes espécies químicas encontra-se exposto na figura 1.9 (Alvarez e Radi, 2003).

Contudo o peroxinitrito reage directamente com as biomoléculas com altas constantes de reacção, sendo que mais de 99 % reage antes de haver homólise (Alvarez e Radi, 2003). Apesar da elevada reactividade nem todo o peroxinitrito reage com as biomoléculas devido à existência de um mecanismo de defesa responsável pela eliminação dos agentes oxidantes (Castro e Freeman, 2001). As ROS podem ser eliminadas por moléculas como o ascorbato (Vitamina C), β -caroteno, glutathione reduzida (GSH), poliaminas, tocoferol (vitamina E) e por enzimas como ascorbato peroxidase, peroxidases, catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione reductase e glutathione-S-transferase (Scandalios, 2005). A SOD e a CAT estão presentes no mecanismo de eliminação do radical anião superóxido, estando representado, a seguir, as respectivas equações de reacção (Eq. 5 e 6) (Scandalios et al. 2005).



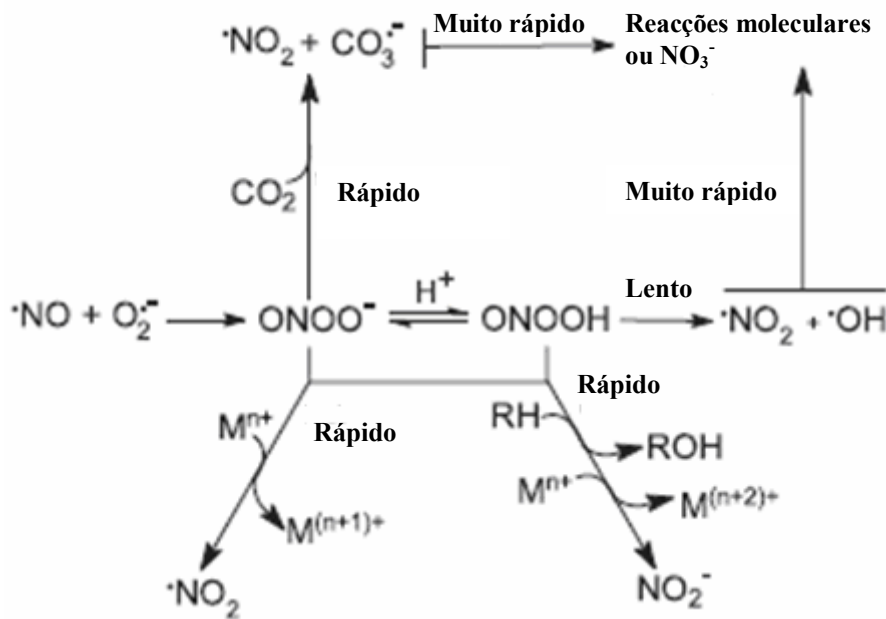


Figura 1.9: Esquema dos diferentes mecanismos de reacção envolvendo o anião peroxinitrito (ONOO⁻). A formação do peroxinitrito ocorre através da reacção entre o óxido nítrico ([•]NO) e o radical superóxido ([•]O₂⁻). O anião peroxinitrito e o ácido peroxinitroso (ONOOH) promovem a oxidação directa de um ou dois electrões nos metais de transição (M) originando radical dióxido de nitrogénio ([•]NO₂) e o anião dióxido de nitrogénio (NO₂⁻). O anião peroxinitrito reage com o dióxido de carbono (CO₂) originando o radical dióxido de nitrogénio e o radical anião carbonato ([•]CO₃⁻) que reagem rapidamente com biomoléculas. O ácido peroxinitroso pode sofrer homólise originando radical dióxido de nitrogénio e o radical hidroxilo ([•]OH) que por sua vez reagem com as biomoléculas (Adaptado de Alvarez e Radi, 2003).

Devido aos diferentes locais de formação do radical anião superóxido, existem diferentes tipos de SOD, a Cu/ZnSOD, a MnSOD, FeSOD e NiSOD. A Cu/ZnSOD encontra-se normalmente no citosol das células eucariótas, dos cloroplastos e em algumas células procariótas, enquanto que MnSOD encontra-se nos procariótas e nas mitocôndrias. A FeSOD existe nos procariótas, algas e algumas plantas superiores. No

caso da NiSOD verifica-se a existência nos estreptomicetes (Scandalios, 2005). Já a CAT está normalmente nos proteossomas, o local onde há maior produção de peróxido de hidrogénio (Scandalios, 2005). Como o radical superóxido é um precursor do peroxinitrito, a sua eliminação impede a formação do ONOO⁻. Quando ocorre a necessidade de eliminação do o peroxinitrito e existem mecanismos apropriados, entre os quais a reacção com o ascorbato (Bartellet et al., 1999), ácido úrico (Santos et al., 1999), com a vitamina E e ubiquinol (Shöpfer et al., 2000), glutationala peroxidase (Sies et al., 1997) e a peroxiredoxina (Bryk et al., 2000).

I.2.2.1 Alvos biológicos de peroxinitrito

Como já fora referido, o peroxinitrito é um agente oxidante muito forte promovendo oxidação de diferentes biomoléculas como proteínas, lípidos, DNA e glícidos.

Nas proteínas, o peroxinitrito começa por reagir directamente com alguns aminoácidos como as cisteínas (cys) e as metioninas (met), só depois com os metais de transição presentes nos grupos prostéticos. Por fim, alguns radicais derivados do peroxinitrito reagem com vários resíduos de aminoácidos (Alvarez e Radi, 2003). O facto dos grupos sulfídricos das cisteínas e das metioninas, bem como os grupos aromáticos do triptofano, tirosina, penicilina e histidina apresentarem um potencial de redução negativo promove uma maior reactividade com o peroxinitrito (Alvarez et al., 1999). Contudo, apenas as cisteínas, as metioninas e o triptofano reagem directamente com este agente oxidante (Alvarez et al 1999). A tirosina, fenilalanina e histidina não reagem directamente com peroxinitrito, podem no entanto ser modificados, através de derivados do peroxinitrito como o radical hidroxilo, o radical anião carbonato e o

radical dióxido nitrogeno na presença de metais transição (Alvarez et al., 1999; Alvarez e Radi, 2003).

I.2.2.1.1 Reactividade com cisteínas

A cisteína é o resíduo que reage mais rapidamente com o peroxinitrito, apresentando uma constante de reacção de segunda ordem de $k = 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, apenas superado pela constante de reacção com os grupos tiol da peroxiredoxina, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, creatina cinase e tirosina fosfatase ($k = 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

O mecanismo de oxidação dos grupos tiol (-S-H) das cisteínas pelo peroxinitrito passa por um estado intermediário em que a o grupo tiol se apresenta sob a forma de radical RSH^{\bullet} , que reage com outro grupo radical formando uma ligação dissulfídrica (Alvarez e Radi, 2003).

Na figura seguinte é possível verificar todos os outros estados intermediários formados, como o radicalar (Fig. 1.10 B), ácido sulfénico (Fig. 1.10 C), ácido sulfínico (Fig. 1.10 D) e ácido sulfónico (Fig. 1.10 E). O ácido sulfénico, sulfínico e as ligações dissulfeto são normalmente reversíveis por diferentes mecanismo. No caso das ligações dissulfídricas o mecanismos é reversível através da glutathione e por tioredoxinas (Petropoulos e Friguet,). Já o ácido sulfénico pode ser revertido através da reacção de modificação com S-glutathione ou S – sulfenamida e por tioredoxinas, contudo a oxidação a ácido sulfónico não é reversível (Petropoulos e Friguet, 2006) O facto de os grupos tiol estarem normalmente associados aos centros activos de diversas proteínas, indica que a sua oxidação por peroxinitrito pode estar associada à toxicidade das RNS.

Uma das formas de evitar a oxidação dos grupos tiol é através da glutathionilação em que a glutathione se liga aos grupos tiol protegendo-os do ataque das ROS/RNS (Ying et al., 2007).

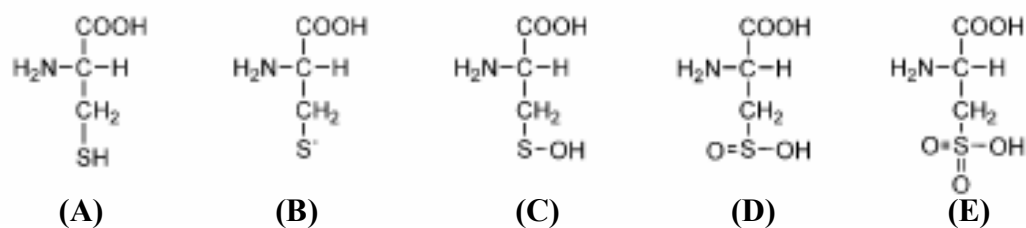


Figura 1.10: Formas de estrutura da cisteína (A) e dos estados intermediários da sua oxidação. (B) – estado radicalar, (C) – estado ácido sulfénico, (D) – estado ácido sulfínico e (E) - estado ácido sulfónico (Jacob et al., 2004).

I.2.2.1.2 Reactividade com metioninas

A oxidação das metioninas (Fig. 1.11 A) por parte do peroxinitrito dá-se através de uma reacção de segunda ordem com um $k = 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, tendo como produto final um sulfoxido (Fig. 1.11 B) que pode ser oxidado de forma irreversível a uma sulfona (Fig. 1.11 C) (Vogt, 1994; Alvarez e Radi, 2003). Contudo a metionina sulfoxido pode ser revertida a metionina pela metionina sulfoxi redutase que se encontra em praticamente todas as células (Brotl e Weissbach, 2000). Apesar de haver reversibilidade em alguns casos, noutros isso não acontece e verifica-se que a oxidação das metioninas diminui a actividade de várias enzimas, como por exemplo a lisozima, pepsina, calmodolina e o péptido β -amilóide (Brotl e Weissbach, 2000 e Weissbach et al., 2002).

Levine e colaboradores et al., (1996), propõem que os resíduos de metionina expostos na superfície proteica constituem um mecanismo de defesa interno, porque ao reagirem rapidamente com o agente oxidante protege os restantes resíduos susceptíveis a oxidação.

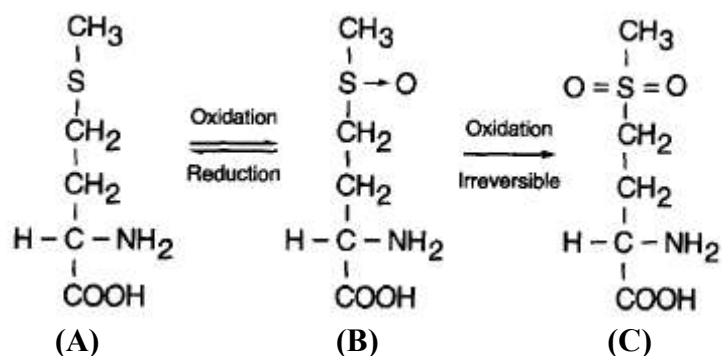


Figura 1.11: Estrutura da metionina (A) e dos produtos de oxidação. (B) Metionina sulfoxido e (C) metionina sulfona (Vogt, 1994).

I.2.2.1.3 Reactividade com outros aminoácidos

As tirosinas (Fig. 1.12 A) não reagem directamente com o peroxinitrito, mas expostas a este originam 3-nitrotirosinas (Fig. 1.12 B), 3'3-ditirosina (Fig. 1.12 C) e 3-hidroxytirosina (L-dopa) (Fig.1.12 D). Neste caso a reacção ocorre através dos radicais hidroxilo e dióxido de nitrogénio (Alvarez et al., 1999 e Alvarez e Radi, 2003).

Também as histidinas não reagem directamente com o peroxinitrito, mas com radicais derivados do peroxinitrito. A exposição de um resíduo de histidina ao peroxinitrito leva à formação de um produto cuja massa molecular indica a adição de um nitrato e a eliminação de uma molécula de água (Alvarez et al., 1999 e Alvarez e Radi, 2003).

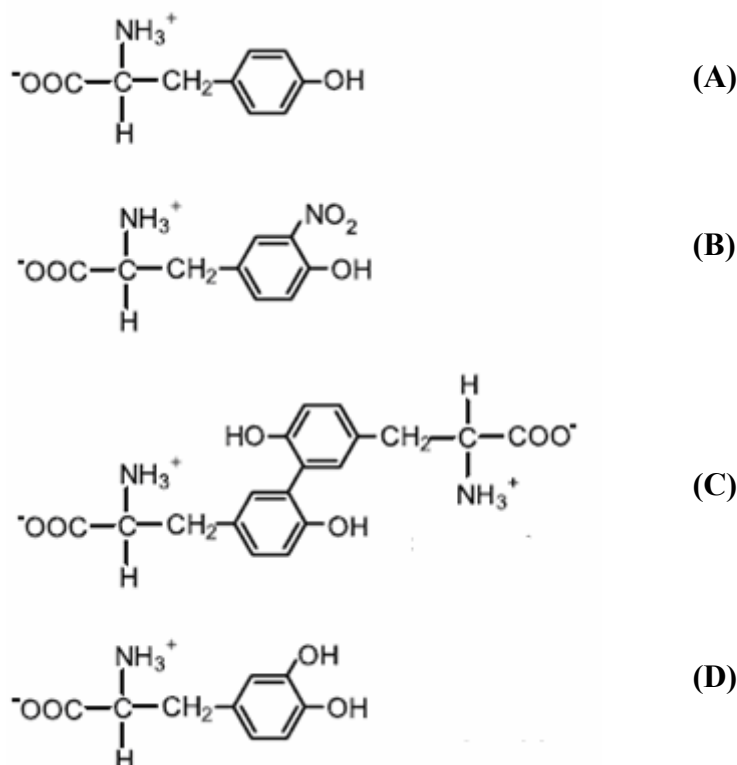


Figura 1.12: Representação das modificações oxidativas na tirosinas induzidas por reacções dependentes do peroxinitrito. (A) L-tirosina, (B) 3-nitro-L-tirosina, (C) 3,3'-ditirosina (D) L-3-hidroxitirosina são produtos primários formados por reacções com derivados de peroxinitrito (dióxido de carbono, radical anião carbonato e radical hidroxilo) com a tirosina (Alvarez e Radi, 2003)

1.2.2.1.4 Reactividade com lípidos

A propensão que o peroxinitrito tem para causar peroxidação lipídica nas membranas, lipossomas e lipoproteínas, por remoção de um átomo de hidrogénio dos ácidos gordos insaturados, é um dos maiores factores de toxicidade desta RNS (Radi et al 1991 A). O resultado desta reacção induz o aparecimento de hidroperoxiradicais lipídicos que reagem com outros ácidos gordos insaturados propagando a reacção radicalar, levando à degradação dos lípidos membranares, provocando permeabilidade membranar e fluidez (Denicola et al., 2005 e Hogg et al., 1999). O peroxinitrito também

reage com a membrana de mielina presente nas células do sistema nervoso, induzindo a desmielinização (Smith. et al., 1999). Outros alvos são as lipoproteínas de baixa densidade (LDL), impedindo que desenvolvam a sua função (Leeuwenburgh et al., 1997), e existem evidências de que a interação entre o peroxinitrito e os lípidos membranares, formando lípidos nitrados, seja responsável pela mediação de transdução de sinal (Baker et al., 2004).

I.2.3 Patologias associadas ao peroxinitrito

O mecanismo de oxidação de biomoléculas está associado a diferentes funções, como regulação celular, regulação da pressão sanguínea e transição de sinal. Como em todos os processos biológicos, no final existem mecanismos responsáveis pela eliminação ou reversão da oxidação das espécies resultantes. Quando existem desequilíbrios, entre a quantidade de agentes oxidantes e antioxidantes, ocorre um excesso oxidação das diferentes biomoléculas, oxidação que pode ser ou não reversível. Na figura 1.13 encontra-se representado um mecanismo de eliminação ou recuperação de proteínas oxidadas. Quando não é possível reverter a oxidação, os danos provocados podem induzir a diminuição da actividade enzimática, degradação molecular, desorganização das bicamadas lípidicas entre outros danos. Assim muitas patologias estão associadas aos efeitos nefastos do peroxinitrito e dos seus derivados. As principais doenças associadas ao peroxinitrito foram descritas por Szabó, Ischiropoulos e Radi et al., (2007), no qual reportaram os estudos realizados por eles e por outros autores. Doenças como diabetes, doenças cardíacas, doenças neurodegenerativas, artrites, doenças no sistema nervoso central e rejeição de órgãos estão associadas especialmente à nitração de tirosinas. A quantificação deste resíduo é sugerida, por estes autores, como

sendo um bom método para detecção de doenças provocadas pela elevada exposição da ROS/RNS

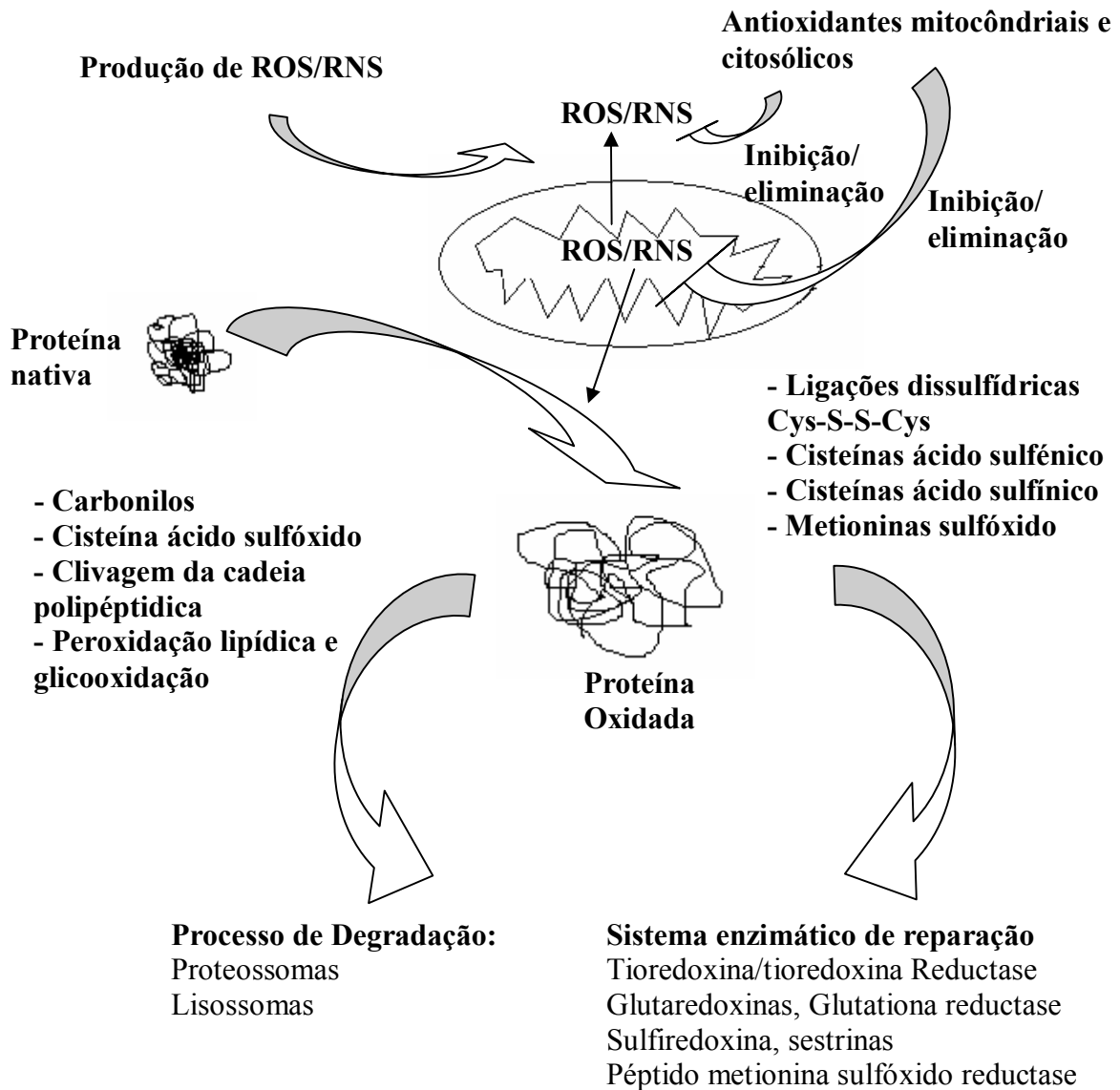


Figura 1.13: Esquema do mecanismo de eliminação ou recuperação de proteínas oxidadas. Os ROS/RNS oxidam as proteínas de forma reversível ou irreversível. Dependendo da natureza da modificação, a proteína pode seguir a via de degradação ou de recuperação por sistemas enzimáticos (adaptado de Petropoulos e Friguet et al 2006).

I.3 Stresse oxidativo e nitrosativo na actina

A abundância de actina nas células faz dela um alvo extremamente acessível à oxidação por espécies reactivas de oxigénio e nitrogénio. Vários autores têm estudado o efeito das diferentes espécies oxidantes na actina. Milzani et al., (1997) verificou que a actina exposta ao peróxido de hidrogénio sofre diferentes modificações promovendo a inibição da polimerização e em contraste a diamida, oxidante específico dos grupos tiol, apenas diminui a extensão da polimerização (tamanho dos polímeros). Ao relacionar os dois resultados concluiu que a oxidação da actina e os danos oxidativos são específicos e dependem do agente oxidante. Foram também detectadas alterações na estrutura do citoesqueleto devido à degradação dos microfilamentos (F-actina) na presença de peróxido de hidrogénio (Hinshaw et al., 1988). Recentemente, em estudos realizados *in vitro* verificou-se que o peroxinitrito induz a despolimerização dos filamentos de actina e inibe a sua polimerização (Tiago et al., 2006), sendo os principais alvos de oxidação na actina são as cisteínas, em especial a 374, e as metioninas (Dalle-Donne et al., 1999 e 2002).

Assim, estando a actina envolvida em diferentes mecanismos celulares, a alteração da sua estrutura e/ou função, através de oxidação, irá provocar alterações ou inibições nos diversos mecanismos/processos biológicos.

I.4 Objectivo

Este trabalho teve por objectivo estudar a possibilidade de reversão das alterações funcionais da actina, induzidas por uma exposição crónica a peroxinitrito, através do restabelecimento do estado reduzido das cisteínas pelos agentes redutores DTT e β -mercaptoetanol.

II Materiais e Métodos

II.1 Reagentes

Para a elaboração do trabalho foram utilizados reagentes aos quais se procede à listagem. Entre parênteses estão indicadas as empresas responsáveis pela sua comercialização.

Acetato de sódio (Riedel), Acetona (Labsolve), Ácido acético glacial (Merck), Acrilamida (Fluka), Azul Bromofenol (Sigma) Bradford (reagente de) (Sigma), BSA (Merck), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck), DTNB (Sigma), DTT (UBS), EDTA dipotássio (BDH), Etanol (Panreac), Glicerol (Sigma), Glicina (Sigma), HCl (Panreac), KCl (Sigma-Aldrich), KOH (Pronalab), K_2HPO_4 (Merck), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Riedel), Marcador de alta e baixa massa molecular (Sigma), β -mercaptoetanol (Merck), Na_2ATP (Sigma), $\text{NaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck), Na_2CO_3 (José Manuel Gomes dos Santos), NADH disódio (Sigma), NaHCO_3 (Pronalab), NaOH (Pronalab), NaN_3 (Riedel), N,N-metil-bis-acrilamida (Riedel), PMSF (Sigma), PSA (Merck) α -quimotripsina (Sigma), SDS (Sigma), SIN-1 (Sigma), Subtilisina A (Sigma), TEMED (Sigma), Tris (UBS)

II.2 Isolamento de proteínas

A actina é uma das proteínas mais abundantes do organismos dos animais, e tal como outras o seu isolamento pode ser efectuado através de varias técnicas bioquímicas e/ou químicas e/ou físicas (Wilson e Walker, 2005). Assim, a técnica utilizada para o isolamento foi, essencialmente, a densitometria diferencial. De modo a separar as diferentes proteínas existente em solução, utilizou-se uma propriedade das proteínas que consiste na variação da solubilidade destas conforme a força iónica do solvente (Fig. 2.1)

Para forças concentrações salinas baixas, a solubilidade da proteína aumenta com um ligeiro aumento da concentração de sal (fenómeno de “salting in”). Para forças iónicas muito elevadas (muito elevada concentração de sais) ocorre competição entre as moléculas da solução salina e a proteína pelas moléculas do solvente, provocando precipitação da proteína, (fenómeno de “salting out”).

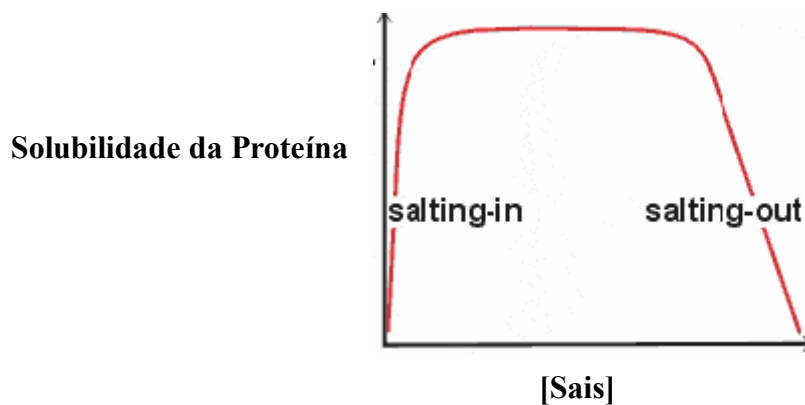


Figura 2.1: Solubilidade da proteína em solução em função da concentração de sal (força iónica). Para concentrações de sal baixas a solubilidade da proteína, em solução, aumenta com um ligeiro aumento da força iónica (fenómeno de “salting in”) (Zona crescente). Apesar de um aumento da concentração de sais, esta continua solúvel na solução (zona constante). Quando a solubilidade diminui, por um grande aumento concentração de sal, a proteína “sai” da solução e precipita (fenómeno de “salting out”) (zona decrescente).

Através deste procedimento pode-se eliminar as proteínas com outras solubilidades, bastando adicionar uma concentração de sal abaixo da concentração de “salting out” da proteína de interesse, precipitando as outras proteínas presentes. Posteriormente, após a remoção do precipitado e aumentando a concentração de sal na

solução pode-se precipitar a proteína de interesse para a isolar (Wilson e Walker, 2005, 2005, Stryer, 2002 e Voet, 1995).

II.2.1 Isolamento e purificação da actina

Todas as soluções utilizadas nestes processos foram feitas em H₂O MilliQ (água deionizada – carga eléctrica neutra,) para impedir a alteração da força iónica, fundamental para o isolamento, e previamente arrefecidas a 4° C, tendo-se realizado a maior parte da parte experimental à mesma temperatura.

Para o isolamento da actina foram utilizados coelhos domésticos com aproximadamente 2 kg, tendo-lhes sido retirado apenas os músculos dorsais e dos membros posteriores. A actina foi isolada e purificada baseando-se no escrito por Pardee e Spudich (1982). Este processo pode ser dividido em dois: a) obtenção de um resíduo seco denominado de “Pó de acetona” e b) extracção da G-actina, que após polimerização origina a F-actina.

II.2.1.1 Obtenção do “Pó de acetona”

Sacrificou-se o animal com uma pancada forte atrás da cabeça e fez-se um golpe no pescoço, na artéria jugular, de modo a sangrar o animal até à morte. Seguidamente, esfolou-se e colocou-se num recipiente com gelo. Com o auxílio do material apropriado, retirou-se os tecidos acumulados entre a pele e os músculos de forma a eliminar as contaminações com tecido adiposo.

De seguida, recolheu-se todo o músculo esquelético da zona dorsal e dos membros posteriores, passou-se por água destilada para retirar algum sangue, pesou-se e triturou-se, um pouco, com o auxílio de uma trituradora. Extraiu-se com 3 volumes da solução A (0,1 M KCl, 0,1 M K₂HPO₄, pH 6,5) em agitação suave durante 10 minutos e

posteriormente centrifugou-se a $4000 \times G$ durante 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 6 volumes de solução B (0,05 M NaHCO_3 , pH 8,2-8,5) verificou-se se o pH se encontrava entre 8,2 e 8,5 e voltou-se a agitar e a centrifugar nas condições anteriores. Novamente desprezou-se o sobrenadante (retirando-se uma amostra – Amostra 1) e ressuspendeu-se o sedimento em 3 volumes de solução C (1 mM EDTA, pH 7,0) com agitação suave durante 10 minutos e centrifugou-se a $4000 \times G$ durante 10 minutos. Retirou-se uma amostra do sobrenadante (Amostra 2) e desprezou-se o mesmo, ressuspendendo-se o sedimento em 6 volumes de solução B e verificou-se se o pH se encontrava a 8 (este passo pode ser efectuado apenas com água MilliQ desde que esteja basificada) e agitou-se durante 5 minutos, centrifugando-se a $4000 \times G$ durante 10 minutos. Repetiu-se este processo mais uma vez e a quando da eliminação do sobrenadante retirou-se uma amostra (Amostra 3).

Por fim, ressuspendeu-se o sedimento em 3 volumes de acetona pura e agitou-se durante 10 minutos à temperatura ambiente. Filtrou-se o resíduo resultante com a ajuda de uma gaze esterilizada, repetindo-se este processo mais 4 vezes. No final colocou-se o resíduo seco dentro de uma tina com o fundo revestido com papel de filtro e deixou-se a secar durante a noite.

No dia seguinte como a ajuda da trituradora, triturou-se o resíduo e deixou-se sacar mais algumas horas. Este resíduo, vulgarmente designado por “pó acetona” foi armazenado num frasco, bem isolado, a -20°C .

II.2.1.2 Obtenção de G-actina e F-actina

Após a obtenção do “pó acetona” pesou-se 3,5 g do mesmo e extraiu-se com 70 ml de solução G (0,2 mM CaCl_2 , 0,2 mM Na_2ATP , 0,5 mM β -mercaptoetanol, 0,005%

NaN₃ e 2 mM Tris-HCl a pH 8) durante 30 minutos. Filtrou-se a suspensão (processo realizado em gelo) com uma gaze em 4 camadas e esterilizada, tendo cuidado para não espremer o resíduo. Aproveitou-se o extracto, mantendo-a a 4° C, e extraiu-se novamente o resíduo em 70 ml de solução G. No final voltou-se a filtrar com a ajuda de uma gaze, desprezou-se o resíduo e centrifugou-se a junção dos dois extractos a 16 000 × G durante 30 minutos a 4° C, sem antes retirar uma amostra (Amostra 4). Mediu-se o volume de sobrenadante com uma proveta, que no topo tinha uma gaze dobrada em 4 para fazer mais uma filtração e o sedimento resultante da centrifugação juntamente com o da filtração foi descartado.

De seguida, adicionou-se KCl até uma concentração de 50 mM, Na₂ATP até 1 mM e MgCl₂ até 2 mM, de modo a induzir a polimerização dos monómeros de actina, e deixou-se a polimerizar durante 2 horas com agitação mínima à temperatura ambiente. O aparecimento de pequenas bolhas de ar e um aumento da viscosidade são indicativos da ocorrência da polimerização.

Após as 2 horas, arrefeceu-se 15 minutos no gelo, retirou-se uma amostra (Amostra 5) e adicionou-se KCl, em pó, até uma concentração de 0,6 M. Agitou-se manualmente até haver total solubilização do mesmo, promovendo-se a remoção da tropomiosina. Posteriormente centrifugou-se a 110000 × G durante 1 hora e desprezou-se o sobrenadante recolhendo-se previamente uma amostra (Amostra 6). Retirou-se o sedimento com ajuda de uma espátula para dentro do “potter” e ressuspendeu-se em solução G. Os tubos foram todos lavados com solução G, aproximadamente 1 ml por cada 3 tubos para aproveitar os restos de actina que aderiram à parede do tubo. O resultante desta lavagem foi adicionado ao “potter” de modo a promover a ressuspensão. Deixou-se a amostra a dializar durante a noite contra 2 litros de solução G em agitação constante e no dia seguinte voltou-se a centrifugar a 110000 × G durante

1 hora desprezando-se o sedimento (Amostra 7). Quantificou-se a G-actina presente no sobrenadante (Amostra 8) através da medição da absorvência a 290 nm (λ de absorvência do Trp) em que o $\epsilon = 0,62 \text{ mg/ml.cm}$ ou $\epsilon = 26000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Pardee e Spudich, 1982).

De modo a armazenar a G-actina adicionou-se 2 mg sacarose/ 1 mg G-actina, 0,005% NaN_3 e 0,5 mM β -mercaptoetanol. Fizeram-se aliquotas de 0,5 ml e promoveu-se uma rápida congelação em azoto líquido. Por fim as aliquotas foram armazenadas a -80°C .

Para obtenção de F-actina a partir da G-actina adicionou-se KCl até uma concentração final de 50 mM, MgCl_2 até 1 mM e Na_2ATP até 1 mM e deixou-se polimerizar durante 4 horas a 4°C . Esta é bastante estável a 4°C , podendo ficar nestas condições até um mês.

II. 3 Caracterização da actina

II.3.1 Quantificação da actina

Com o objectivo de confirmar a concentração obtida para a G-actina através de absorção directa a 290 nm, procedeu-se à quantificação da mesma através do método de Bradford. Neste método utiliza-se o reagente de Bradford, um reagente que possui carga negativa e que absorve entre 470 e 650 nm, mas apresenta uma absorvência máxima a 595 quando se liga a proteínas. As vantagens deste método relativamente ao método de Lowry são a rapidez com que muda de cor quando se liga à proteína e a estabilidade do complexo. O método apresenta um limite de detecção abaixo de $20 \mu\text{g/ml}$ de proteína. Uma das suas limitações é o facto de apenas se ligar aos aminoácidos denominados de básicos (pH fisiológico) a lisina e a arginina (Wilson e Walker, 2005).

Para a quantificação da G-actina fez-se primeiro uma recta de calibração obtida através da preparação de amostras de albumina de soro bovino (BSA) com concentração conhecida. Para tal utilizou-se $[BSA]_{stock} = 1 \text{ mg/ml}$. Após a adição da BSA à H₂O MilliQ agitou-se as amostras no vortex e adicionou-se reagente de Bradford, homogeneizou-se novamente e deixou-se em repouso 5 minutos.

Num espectrofotómetro SHIMADZU UV-2410 PC, leram-se os valores de Abs_{595nm} das amostras e elaborou-se um gráfico $Abs_{595 \text{ nm}}$ *versus* quantidade BSA. Para a determinação da concentração G-actina adicionou-se 5 μl de G-actina e 595 μl H₂O MilliQ homogeneizando-se, aos quais se adicionou 600 μl de reagente de Bradford (3 ensaios). Verificou-se a absorvência e interpolou-se através do gráfico a quantidade de G-actina, tendo em conta as diluições efectuadas anteriormente. O mesmo processo de quantificação foi efectuado para a F-actina, sempre que esta era obtida após a diálise da G-actina ou após ser sujeita a uma diálise.

II.3.2 Electroforese em condições desnaturantes

A preparação de actina foi ainda caracterizada por electroforese em condições desnaturantes, também conhecida por SDS-PAGE. Realizou-se esta análise para as amostras recolhidas durante o isolamento de G-actina.

O nome SDS-PAGE vem do inglês “SDS- polyacrylamine gel electrophoresis” em que SDS é dodecilo sulfato de sódio. É uma técnica muito utilizada para monitorizar o processo de purificação de uma proteína, porque tem como base a separação das proteínas de acordo com o seu tamanho, sendo este normalmente proporcional à massa molecular.

Antes de se aplicar as amostras no gel elas têm de ser aquecidas até ao ponto de ebulição durante 5 minutos em tampão de amostra, para quebrar as ligações

dissulfídricas (S-S) envolvidas na estrutura quaternária da proteína. A presença de β -mercaptoetanol no tampão de amostra impede a formação de novas ligações dissulfeto e o SDS liga-se fortemente à proteína desnaturada. A razão de ligação SDS/aminoácido é de 1:2 anulando todas as cargas positivas e permanecendo as cargas negativas do SDS. Assim quando se aplica um campo eléctrico ao gel as proteínas migram em direcção ao pólo positivo, denominado de ânodo (local migração das cargas negativas).

A velocidade de migração (v) é directamente proporcional à diferença de potencial aplicada a uma carga (Eq) e inversamente proporcional à resistência provocada pela fricção das proteínas ao longo do gel. A força de fricção é medida através do tamanho hidrodinâmico da proteína, a forma da proteína, pelo tamanho do poro e pela viscosidade do tampão. $v = \frac{Eq}{f}$, onde f é o coeficiente de fricção.

Normalmente a mobilidade electroforética (μ) é a razão entre a velocidade e a diferença de potencial (E), $\mu = \frac{v}{E}$, substituindo o v , temos $\mu = \frac{q}{f}$, em que q é a carga da molécula (constante). Assim quando se aplica um campo eléctrico a moléculas com a mesma carga, elas vão ser separadas em função do seu tamanho devido às diferentes (Wilson e Walker, 2005).

Assim quanto maior for a migração menor é a massa molecular da proteína porque esta tem de passar por uma rede formada pela poliacrilamida, passando mais facilmente as moléculas mais pequenas (Wilson e Walker, 2005, Stryer 2002 e Voet 1995).

Preparou-se o gel resolvente com uma percentagem de poliacrilamida de 12%, adicionando-se, num Erlenmeyer, pela seguinte ordem 2 ml de solução concentrada de acrilamida (29,2% (m/v) e 0,8% (m/v) N,N'-metil-bis-acrilamida), 1,25 ml de tampão de resolução (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 4 vezes concentrado), 1,67 ml de H₂O e 50 μ l de

SDS 10%. Por fim para promover a polimerização adicionou-se 25 µl de PSA 10% e 6,6 µl de TEMED e agitou-se e colocou-se na cassette, previamente montado, aproximadamente 3,5 ml tendo-se preenchido o resto da cassette com H₂O de modo a impedir a desidratação do gel.

Após a polimerização, entre 45 minutos a 1 hora, retirou-se a H₂O e preparou-se o gel de concentração, 4% acrilamida. Para tal adicionou-se num Erlenmeyer 400 µl solução stock de acrilamida, 750 µl de tampão concentração (0,5 M Tris, pH 6,8; 4 vezes concentrado), 1,83 ml H₂O, 30 µl de SDS a 10% e por fim 15 µl de PSA e 5 µl de TEMED. Colocou-se na cassette a qual se juntou o pente para fazer os poços e deixou-se polimerizar aproximadamente 1 hora. Após a polimerização transferiu-se a cassette para a tina de electroforese, na qual foi adicionado o tampão de electroforese do ânodo [25 mM de Tris, 192 mM glicina; 0,1% (m/v) SDS e 0,1 M acetato de sódio, pH 8,3] e o tampão de electroforese do cátodo (25 mM de Tris, 192 mM glicina e 0,1% (m/v) SDS, pH 8,3).

As amostras foram preparadas para um volume final de 100 µl dos quais apenas 25 µl correspondem ao tampão de amostra (320 mM Tris-HCl, pH 6,8; 0,4 M de β-mercaptoetanol (reduz as pontes S-S), 8% de SDS, 15% (v/v) de glicerol (confere densidade à amostra) e 0,024% de azul bromofenol (marcador da frente de migração) 4 vezes concentrado). Colocou-se as amostras em água a ferver durante 5 minutos e carregou-se os poços com 20 µl de cada amostra retirada do isolamento da proteína. Reservou-se uma pista para adicionar 5 µl do tampão de baixa massa molecular e outra para o marcador de alta massa molecular. Aplicou-se um campo eléctrico de 90 V ao gel durante aproximadamente 2,5 – 3 horas.

No final da migração retirou-se o gel e colocou-se numa tina com solução corante (“Coomassie Brilliant Blue” com 45% (v/v) metanol e 10% ácido acético

glacial) aproximadamente 1 hora. Após coloração deixou-se o gel em solução descorante (10% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético glacial) até ser possível clarificar as bandas presentes, para tal trocou-se a solução várias vezes no dia seguinte.

Através dos resultados obtidos pode-se determinar a mobilidade relativa das bandas do marcador e traçar-se uma recta do logaritmo da massa molecular em função do logaritmo da mobilidade relativa. Através desta e por interpolação da mobilidade das bandas presentes nas amostras é possível concluir a cerca do grau de pureza das proteínas (Wilson e Walker, 2005).

II.4 Preparação de SIN-1

O SIN-1 foi o composto utilizado para originar o peroxinitrito através da sua decomposição em radical anião superóxido e radical óxido nítrico (Singh et al., 1999). Para tal preparou-se, em H₂O MilliQ, uma solução de 250 mM SIN-1 (massa molecular de 206,6 g/mol). Para impedir a sua fotodecomposição a solução foi revestida com folha de alumínio e armazenou-se a – 80° C evitando ao máximo a exposição à temperatura ambiente e à luz.

II.4.1 Decomposição de SIN-1

Com o objectivo de determinar a taxa de decomposição do SIN-1 e respectiva formação de peroxinitrito nas condições de incubação da proteína verificou-se a oxidação do NADH a um comprimento de onda de 340 nm (Martin-Romero et al., 2004).

Adicionou-se 1 ml de solução G e 375 µM de NADH (preparado em 50 mM Tês/tris, pH 7,0; [NADH]_{stock}=25 mM) e por fim adicionou-se 50 µM SIN-1 e verificou-

se a cinética durante 4 horas a 25 °C. A eficiência da reacção foi determinada sabendo que $\Delta\text{Abs}_{340\text{ nm}} = 6,2 \text{ mD.O./nmol NADH}$.

II.5 Tratamento da actina com SIN-1

O tratamento de G-actina e de F-actina bem como todos os outros ensaios foram sempre precedido por uma diálise durante a noite a 4° C contra 1 litro de solução G ou F, respectivamente, sem β -mercaptoetanol, de modo a eliminar o agente redutor presente na solução de armazenamento da actina. Após a diálise a actina foi sempre quantificada. Seguidamente incubava-se a proteína durante 5 horas a 25° C com diferentes concentrações de SIN-1. Em alguns ensaios incubou-se a F-actina em solução tampão 10 mM Tris, 25mM KCl, pH 8,5 durante 2 horas (segundo estudos realizados anteriormente) (Tiago et al., 2006)

II.5.1 Medição da polimerização e despolimerização de actina por dispersão de luz (“light scattering”)

A dispersão de luz, vulgarmente designada de “light scattering”, ocorre quando o campo eléctrico da radiação incide com um átomo, provocando oscilações periódicas na sua nuvem electrónica, passando este a emitir radiação (Tsang et al., 2000). Trata-se de uma técnica muito útil para o estudo da estrutura de macromoléculas e de agregados moleculares em solução e é de elevada resolução. Esta técnica pode ser seguida através de um fluorímetro, sendo que a dispersão da luz é maior quanto maior forem o tamanho das partículas em solução.

Os estudos efectuados neste trabalho foram efectuados no espectrofluorímetro Jobin Yvon Horiba, Fluoromax-3, tendo-se utilizado um programa, previamente

elaborado para estudos anteriores, em que o comprimento de onda de excitação e emissão é de 546 nm.

Para verificar a despolimerização de F-actina colocou-se 2 ml de solução de polimerização (0,2 mM CaCl₂; 1,0 mM Na₂ATP; 0,005% NaN₃; 1,0 mM MgCl₂; 50 mM KCl e 2,0 mM Tris-HCl a pH 8) numa *cuvette* de quartzo e deixou-se estabilizar, servindo esta medição de linha de base. De seguida adicionou-se 8 µM de F-actina e deixou-se estabilizar e verificou-se ao longo 5 horas. Procedeu-se igual modo para verificar o efeito de SIN-1, mas neste caso após a estabilização de F-actina adicionou-se a concentração pretendida de SIN-1 (0-1,5 mM SIN-1) sendo todo o processo realizado a 25° C. Efectuou-se o mesmo ensaio numa solução 10 mM Tris, 25 mM KCl a pH 8,5, para comparar com a experiência anterior (Tiago et al., 2006).

Determinou-se a percentagem de despolimerização fazendo a razão entre a intensidade após despolimerização e a intensidade da F-actina antes da despolimerização.

Para verificar a polimerização da G-actina a 25° C, adicionou-se numa *cuvette* 2 ml de solução G e fez-se a linha de base, posteriormente juntou-se 8 µM de G-actina e deixou-se estabilizar. De seguida adicionou-se solução de polimerização (1,0 mM MgCl₂; 50 mM KCl) e monitorizou-se a polimerização. O mesmo procedimento foi efectuado para amostras tratadas com SIN-1.

II.5.2 Quantificação de cisteínas reduzidas

O grupo tiol presente nas cisteínas é o principal alvo de oxidação nas proteínas quando sujeitas a agentes oxidantes podendo, a oxidação, afectar a actividade da proteína (Dalle-Donne et al., 1999). O estudo da oxidação deste grupo pode servir de referência para o estudo do efeito do stress oxidativo e nitrosativo. O método foi

desenvolvido por Gutiérrez-Merino et al., (1987) e baseia-se na reacção entre os grupos sulfidrilo (-S-H) e o reagente de Ellman (DTNB; 5-5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzóico)) formando-se uma ligação dissulfeto entre a proteína e o anião 3-carboxilato-4-nitrotiofelonato (CNT), o qual apresenta uma absorvência máxima a 412 nm (Robyt, 1990). Contudo, para que ocorra reacção os grupos têm de se encontrar reduzidos e expostos a um solvente. Assim após a incubação com agente oxidante, determina-se o numero de cisteínas reduzidas através da medição da absorvência do anião CNT que se liga aos grupos SH, numa razão de 1:1.

Preparou-se uma solução concentrada de DTNB, 50 mM, em tampão 250 mM fosfato de sódio a pH 7,2 e protegeu-se da luz com folha de alumínio e manteve-se no frio. Adicionou-se 780 µl de solução G e 220 µl de tampão 250 mM fosfato de sódio a pH 7,2, numa *cuvette* e fez-se branco a 412 nm. Adicionou-se de seguida 200 µM de DTNB e voltou-se a agitar, medindo-se de seguida a absorvência. O valor obtido foi descontado ao obtido pela proteína após reacção com DTNB. De seguida procedeu-se à determinação das cys reduzidas na G-actina, começando pela cys rápida. Para tal adicionou-se 780 µl de solução G com G-actina (8 µM), 220 µl de tampão 250 mM fosfato de sódio a pH 7,2 e 200 µM DTNB, agitou-se e mediu-se a absorvência. Após estabilização adicionou-se 1% (m/v) SDS e agitou-se vigorosamente de modo a desnaturar a actina, deixando todos os grupos tiol expostos ao DTNB, para quantificação das cys totais. Voltou-se a medir a absorvência até estabilizar. Determinou-se o número de grupos tiol presentes nas cys por molécula de G-actina através dos valores de absorvência a 412 nm registados aquando adição do DTNB (cys rápida) e do SDS (cys totais) utilizando o coeficiente de extinção molar (ϵ) determinado anteriormente, de $13,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e a concentração de actina no ensaio. O mesmo

processo foi utilizado para as amostras tratadas com SIN-1 e para amostras F-actina tratada e não tratada com SIN-1.

II.5.3 Quantificação da oxidação de metioninas na actina

Preparou-se a α -quimotripsina 0,05% em H₂O MilliQ e adicionou-se numa razão enzima:proteína (8 μ M) de 1:25, 1:50, 1:100 e 1:200. Após a incubação de 90 minutos a 25° C adicionou-se 2 mM de PMSF (preparado em 70% etanol absoluto e 30% H₂O MilliQ) para parar a reacção. Adicionou-se tampão de amostra 6 vezes concentrado numa razão de 1:5 tampão:amostra e ferveu-se durante 5 minutos.

No caso da subtilisina, preparou-se uma solução de 0,005% em H₂O MilliQ e adicionou-se numa razão enzima:proteína (8 μ M) de 1:1000, 1:1500, 1:2000 e 1:300 e deixou-se incubar durante 10 minutos a 25° C. No final da incubação juntou-se 2 mM PMSF, tampão de amostra nas proporções referidas anteriormente e ferveu-se durante 5 minutos. Por fim aplicou-se num gel de poliacrilamida 15% juntamente com uma amostra de G-actina sem tratamento e com um marcador de baixa massa molecular. O mesmo processo foi repetido para F-actina (8 μ M).

Fizeram-se também ensaios para verificar se a diminuição de corte se deve à oxidação das metioninas. Assim tratou-se a G-actina com 50 e 100 μ M SIN-1 para o tratamento com subtilisina e 200 e 400 μ M SIN-1 para a α -quimotripsina, de seguida adicionou-se 0,1% (m/v) SDS para a desnaturar a proteína. O tratamento com α -quimotripsina decorreu durante 15 minutos e o da subtilisina durante 2 minutos. No final procedeu-se de igual modo, com a realização de SDS-PAGE.

II.5.4 Determinação da formação dímeros

O aparecimento de dímeros de G-actina (90 kDa) foi demonstrado por Tang et al., (1999) e ocorre quando há oxidação do grupo tiol (-S-H) e se forma uma ligação dissulfídrica (-S-S-) entre dois monómeros de G-actina.

Para verificar a formação de dímeros através da oxidação pelo SIN-1, incubou-se 8 μ M G-actina com 50 μ M de SIN-1 em solução G, durante 5 horas a 25° C. Após incubação adicionou-se tampão de amostra sem β -mercaptoetanol, de modo a impedir a redução da ligação dissulfídrica (quebra da ligação responsável pela formação de dímeros) e com 1% SDS, numa razão de 1:5 tampão:proteína. Ferveu-se a amostra durante 5 minutos e aplicou-se num gel de poliacrilamida 15% no qual se reservou 2 pistas para marcador de alta e baixa massa molecular e outra para um controlo, sem SIN-1, mas que passou por todos os passos sujeitos pela amostra tratada com SIN-1.

II.6 Estudos de reversibilidade

Como já fora referido, neste trabalho procedeu-se à verificação da possibilidade de reversão das alterações funcionais na actina, após oxidação pelo peroxinitrito, através de agentes redutores. Para tal, efectuaram-se ensaios para quantificação de cisteínas reduzidas, para a quantificação da oxidação das metioninas 44 e 47 e para a determinação da cinética e da extensão de polimerização. Os estudos anteriormente referidos estão descritos nas secções II.5.2, II.5.3 e II.5.1.2, respectivamente. Começou-se por incubar a actina (8 μ M) com SIN-1 durante 5 horas a 25° C e de seguida adicionou-se 2mM β -mercaptoetanol ou 1 mM DTT durante 2 horas a 4° C.

No estudo da quantificação de cisteínas reduzidas utilizaram-se duas concentrações de SIN-1, 100 μ M e 500 μ M, sendo a actina posteriormente tratada com 1 mM de DTT. No estudo da quantificação da oxidação das metioninas 44 e 47 utilizou-

se a concentração de SIN-1 descrita no ensaio e depois tratou-se com 2 mM β -mercaptoetanol. Para o estudo da cinética e extensão de polimerização utilizou-se uma concentração de SIN-1 de 100 μ M e tratou-se com 1 mM DTT ou 2 mM β -mercaptoetanol.

De referir que para a quantificação das cisteínas reduzidas foi necessário utilizar a técnica de cromatografia de filtração em gel para poder eliminar o agente redutor, pois uma diálise durante a noite não era uma opção muito válida porque podia não eliminar a totalidade de agente redutor, o que iria interferir no método de determinação das cys reduzidas, ou poderia remover todo o agente e promover a oxidação das cys.

A técnica de cromatografia de filtração em gel baseia-se na exclusão de moléculas segundo o seu tamanho. A fase móvel, constituída por uma amostra que contém vários tipos de moléculas e cada uma delas um respectivo tamanho, ao passar pela fase estacionária, constituída por pequenas esferas de vidro com microporos, vai levar à retenção das moléculas de pequenas dimensões pois ficam retidas nos microporos, enquanto as grandes passam através dos espaços existentes entre as esferas. Assim quando se elui a amostra sai primeiro a proteína que queremos purificar e por fim os contaminantes (Wilson e Walker, 2005).

III Resultados e Discussão

III.1 Isolamento e caracterização da actina

III.1.1 Isolamento

Para desenvolver este trabalho experimental foi necessário a obtenção de “pó acetona” apenas uma vez. As condições de obtenção do “pó acetona” sofreram uma alteração, que consistiu na extracção com solução B (0,05 M NaHCO₃, pH 8,2 – 8,5) em vez H₂O MilliQ (pH 5,6 – 5,8). Assim foi possível obter um rendimento, “pó acetona”/massa músculo, na ordem dos 11%, 23 g “pó acetona” por 210 g músculo.

III.1.2 Caracterização

Realizou-se a extracção e purificação da actina a partir do “pó acetona” 6 vezes ao longo do trabalho experimental e determinou-se a concentração de G-actina através da absorvência a 290 nm e através do método de Bradford, tendo-se obtido uma concentração média de $194,7 \pm 34,1 \mu\text{M}$ ($7,3 \pm 1,1 \text{ mg/ml}$) e um rendimento de $15,5 \pm 4,4 \%$. Em comparação com os trabalhos anteriores, Susana et al., (2005) e Dorinda et al., (2006) os resultados obtidos para a concentração de G-actina são 2 e 4 vezes superiores, respectivamente. Este resultado é consequência da alteração feita ao protocolo de obtenção do “pó acetona”, pelo que se pode dizer que na obtenção do “pó acetona” é necessário manter o pH na ordem dos 8 – 8,5 aquando da extracção com solução B.

Através da obtenção do gel SDS-PAGE (Fig.3.1) e da sua respectiva análise é possível verificar a eliminação de proteínas contaminantes ao longo do processo de extracção da actina a partir do “pó acetona”

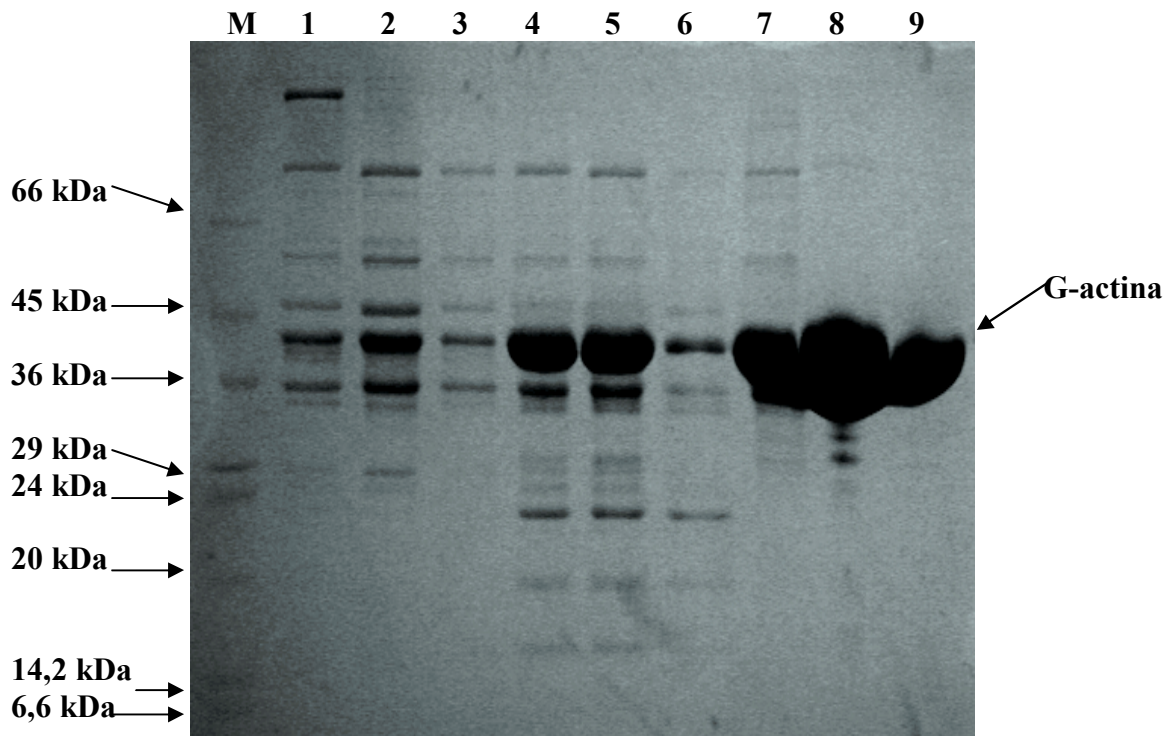


Figura 3.1: Gel SDS-PAGE 12% acrilamida relativo às 8 amostras recolhidas ao longo do processo isolamento e purificação actina (secção II.2.1.1 e II.2.1.2, material e métodos) após aplicação de uma voltagem de 90 V aproximadamente durante 2,5 horas. .Pista (M): 5 µl de marcador baixa massa molecular (6,6 – 66 kDa) da Sigma; pista (1 – 7): 5 µl amostras 1-7; pista (8): 52,5 µg G-actina purificada (5 µl amostra 8); pista (9): 20 µg G-actina purificada (1,9 µl amostra 8).

Ao longo do gel é possível identificar uma banda, situada abaixo da referência dos 45 kDa, que se mantém ao longo de todo o processo. Esta banda é característica da G-actina (42 kDa) e o aumento do seu tamanho está associado à pureza da amostra, assim como o desaparecimento de outras bandas características da troponinas C (18 kDa) e I (21 kDa) e tropomiosina (33 kDa). Nas pistas 8 e 9 é possível verificar a existência de apenas uma banda muito intensa, correspondente a actina, indicando que esta se encontra num elevado grau de pureza.

III.2 Estudo da decomposição de SIN-1

Kirsh e Groot et al., (1999) verificaram que a oxidação do NADH pelo peroxinitrito em solução aquosa dá origem a NAD^+ e $\cdot\text{O}_2^-$ e que apenas o peroxinitrito estava envolvido na oxidação do NADH e não as espécies intermediárias $\cdot\text{O}_2$ e o $\cdot\text{NO}$. Por seu lado, Martin-Romero et al., (2004) constatou que o NADH pode ser utilizado para seguir a decomposição do SIN-1 em soluções tampão, com um limite de detecção inferior a $0,1 \mu\text{M}$ SIN-1, a pH 7,4. Assim é possível verificar a decomposição do SIN-1 através da diminuição da absorvência a 340 nm ao longo do tempo.

Com o objectivo de determinar o tempo ideal de tratamento das amostras com SIN-1 nas seguintes condições: G-actina – Solução G, pH 8,0 e F-actina – solução de polimerização, pH 8,0, estudou-se a decomposição do SIN-1 através da oxidação do NADH, seguindo a diminuição da absorvência 340 nm. Na figura 3.2 está representada a cinética de decomposição do SIN-1, $50 \mu\text{M}$, em solução G.

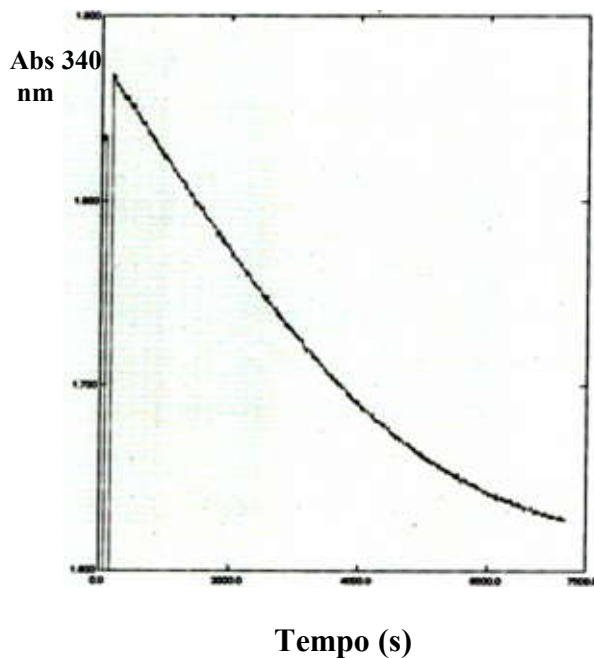


Figura 3.2: Cinética de decomposição de SIN-1 ($50 \mu\text{M}$) em função do tempo (4 horas) em solução G, pH 8,0 a 25°C , determinada através da oxidação de NADH, seguindo a diminuição da absorvência a 340 nm.

Pela cinética, retirou-se os valores de absorvência inicial e final, 1,868 e 1,627, respectivamente. Sabendo que o coeficiente de extinção molar do NADH a 340 nm é

$6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e que $\Delta\text{Abs}_{340 \text{ nm}} = 6,2 \text{ mD.O./nmol NADH}$, determinou-se a eficiência de decomposição de SIN-1 que foi de 78% para quatro horas. Tendo em conta que as amostras eram incubadas pelo menos 5 horas, este valor de eficiência foi sempre alcançado. De igual modo se procedeu para a solução de polimerização e obteve-se um valor de 60 %.

III.3 Estabilidade do filamento de actina e do acesso aos resíduos na F-actina

III.3.1 Estabilidade do polímero de actina em solução de polimerização

Como foi referido na secção II.5.1.1 de Materiais e Métodos é possível analisar, através de um fluorímetro, a dispersão de luz de macromoléculas e de polímeros em solução aquosa. Assim analisou-se o efeito do anião peroxinitrito na estrutura da F-actina.

Foi previamente estudado, que a exposição de F-actina ($2 \mu\text{M}$) a $4,5 \mu\text{M}$ SIN-1, em solução 10 mM Tris (pH 8,5) e 25 mM KCl, durante duas horas é suficiente para promover a despolimerização de 50 % dos filamentos (Tiago et al., 2006). A alteração da força iónica provocada pela presença de catiões divalentes, como Mg^{2+} e Ca^{2+} , e de K^{+} e a presença de ATP, são de extrema importância para a estabilização do filamento de actina (Shu et al., 1992 e Wang et al., 1989), bem como a concentração de actina, porque quanto maior a sua concentração mais estável é o filamento.

De forma a verificar a estabilidade do filamento de actina em solução de polimerização ($0,2 \text{ mM}$ CaCl_2 , 50 mM KCl, $1,0 \text{ mM}$ Na_2ATP , 2 mM MgCl_2 e 2 mM Tris-HCl a pH 8) fizeram-se vários ensaios. Começou-se por fazer um controlo em que a F-actina ($8 \mu\text{M}$) não foi tratada com SIN-1. Fez-se uma linha de base com solução de polimerização, depois adicionou-se F-actina, e como se pode observar pela figura 3.3,

há um aumento da intensidade de luz dispersa devido à presença dos filamentos em solução.

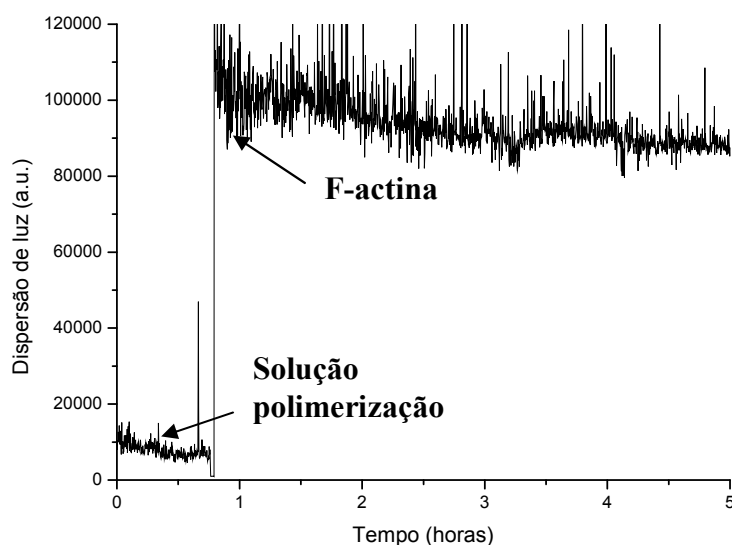


Figura 3.3: Variação da intensidade de luz dispersa em função do tempo, de F-actina (8 μM) em solução polimerização (0,2 mM CaCl_2 , 50 mM KCl , 1,0 mM Na_2ATP , 2 mM MgCl_2 e 2 mM Tris-HCl a pH 8) a 25° C, obtido num fluorímetro Horiba Jobi Yvon, FluoroMax-3 ($\lambda_{\text{excitação}} = \lambda_{\text{emissão}} = 546 \text{ nm}$)

Observa-se uma diminuição da intensidade, de 100000 – 850000, provocada pela estabilização da solução após adição da F-actina ou por uma ligeira despolimerização do filamento. Contudo, verifica-se que a F-actina é bastante estável em solução de polimerização.

Realizaram-se vários ensaios com diferentes concentrações de SIN-1 (0,01 – 1,5 mM) para tentar determinar a percentagem de despolimerização da F-actina e tentar o respectivo IC_{50} (neste caso, concentração de peroxinitrito que induz a despolimerização de metade dos filamentos). De igual modo determinou-se a linha de base, adicionou-se

F-actina e deixou-se estabilizar, e após adição de SIN-1, seguiu-se a despolimerização durante 5 horas (Fig. 3.4).

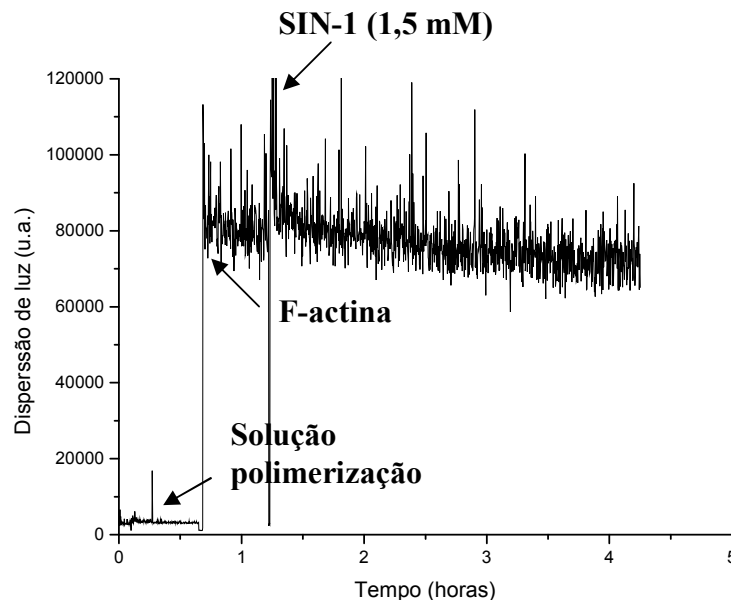


Figura 3.4: Variação da intensidade de luz dispersa em função do tempo, de F-actina (8 μM) em solução polimerização (0,2 mM CaCl_2 , 50 mM KCl , 1,0 mM Na_2ATP , 2 mM MgCl_2 e 2 mM Tris-HCl a pH 8) contendo 1,5 mM SIN-1, obtido num fluorímetro Horiba Jobi Yvon, FluoroMax-3 ($\lambda_{\text{excitação}} = \lambda_{\text{emissão}} = 546 \text{ nm}$).

Apesar do aumento da concentração de até 1,5 mM SIN-1 (Fig.3.4) não se observou despolimerização em qualquer dos ensaios realizados, obtendo-se valores de intensidade de luz dispersa semelhantes. De forma a confirmar os resultados obtidos anteriormente e como controlo (para verificar se a técnica era a correcta para a realização deste estudo) realizou-se um ensaio nas condições utilizadas em estudos anteriores (Tiago et al., 2006) (Fig.3.5).

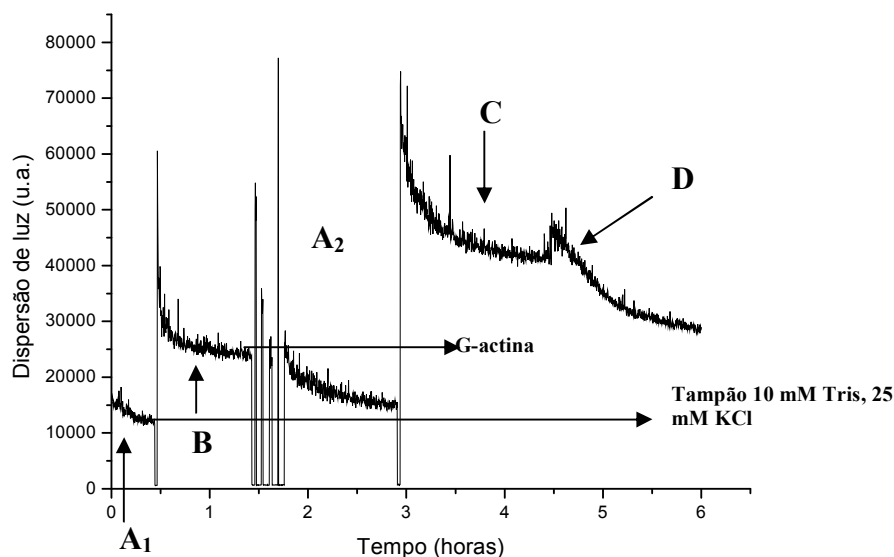


Figura 3.5: Gráfico característico da despolimerização da F-actina (2 μ M) em solução tampão 10 mM Tris, 25 mM KCl a pH 8,5, na presença de 50 μ M SIN-1, obtido por dispersão da luz ao longo do tempo num fluorímetro Horiba Jobi Yvon, FluoroMax-3 ($\lambda_{\text{excitação}} = \lambda_{\text{emissão}} = 546$ nm). (**A₁** e **A₂**) Solução tampão 10 mM Tris, 25 mM KCl a pH 8,5; (**B**) Solução tampão 10 mM Tris, 25 mM KCl a pH 8,5 + 2 μ M G-actina; (**C**) Solução tampão 10 mM Tris, 25 mM KCl a pH 8,5 + 2 μ M F-actina e (**D**) Solução tampão 10 mM Tris, 25 mM KCl a pH 8,5 + 2 μ M G-actina + 50 μ M SIN-1.

Começou-se por determinar a linha de base do tampão, figura 3.5 (A₁), aproximadamente 12000 u.a., depois determinou-se a intensidade de dispersão de luz provocada pela G-actina, figura 3.5 (B), 24000 u.a. Voltou-se a fazer uma linha de base, figura 3.5 (A₂), 15000 u.a. e adicionou-se a F-actina. Deixou-se estabilizar, figura 3.5 (D), obtendo-se uma intensidade de dispersão de 41500 u.a. Por fim adicionou-se 50 μ M SIN-1, figura 3.5 (E) e seguiu-se durante aproximadamente 2 horas, obtendo-se no final um valor de 28000.

Tendo em conta o valor inicial de F-actina e o valor de G-actina determinou-se a percentagem de despolimerização, tendo-se obtido 73 % de despolimerização, valor ligeiramente inferior ao obtido anteriormente (85%) por Tiago et al, (2006).

III.3.2 Acessibilidade às metioninas 44 e 47 na actina

A G-actina apresenta na sua constituição 16 metioninas (Met), estando umas mais no interior e outras mais expostas, mais facilmente oxidáveis, como as Met 44, 47 e 335 (Dalle-Donne et al., 2002). A grande susceptibilidade da actina a várias enzimas proteolíticas, caso da α -quimotripsina e subtilisina (Mornet et al., 1984) pode possibilitar a verificação da acessibilidade às metioninas 44 e 47, porque quando se encontram inacessíveis não ocorre clivagem da proteína por parte destas enzimas.

O tratamento com α -quimotripsina cliva a ligação entre a metionina 44 e valia 45 dando origem a um fragmento de 35 kDa que se degrada dando origem a um de 33 kDa. No caso da subtilisina, há clivagem da ligação entre a metionina 47 e glicina 48, obtendo-se um fragmento de 35 kDa (Mornet et al., 1984).

Com o intuito de fazer uma comparação entre acessibilidade às metioninas na estrutura globular e filamentosa da actina verificou-se a acessibilidade às Met 44 e 47 da actina através da monitorização dos péptidos resultantes da clivagem. Para tal, procedeu-se à realização de um ensaio em que foram utilizadas diferentes razões enzima/actina, estando os obtidos apresentados na figura 3.6. Pela análise da figura 3.6 é possível verificar que a amostra controlo (pista C), apenas G-actina, apresenta a sua banda característica de 42 kDa. No entanto com tratamento com as seguintes razões subtilisina/G-actina, 1/3000, 1/200, 1/1500 e 1/1000 (pista s1-s4), há uma diminuição da banda de 42 kDa e um aumento da de 33 kDa. O mesmo é possível identificar para o

tratamento com uma razão α -quimotripsina/G-actina de 1/200, 1/100, 1/50 e 1/25 (pistas α 1- α 2).

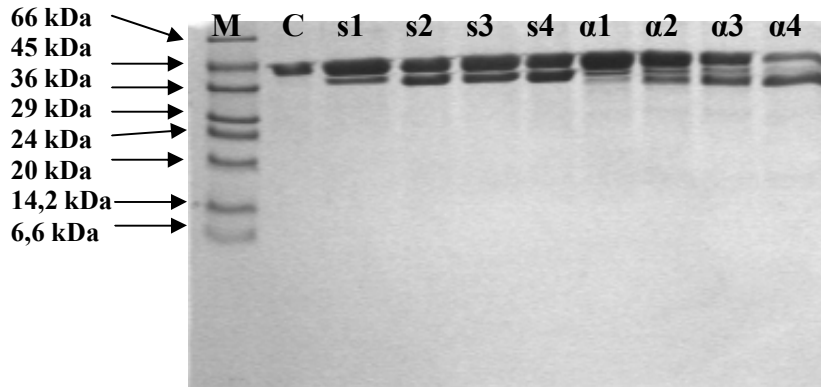


Figura 3.6: Gel de SDS-PAGE 15% obtido após aplicação de uma voltagem de 90 V durante 2,5 horas, a 5 μ g (20 μ l) G-actina (8 μ M) incubadas durante 90 min com diferentes razões α -quimotripsina/G-actina e de 10 min com diferentes razões subtilisina/G-actina. Pista (M): 10 μ l de marcador baixa massa molecular (6,6 – 66 kDa) da Sigma; (C) 8 μ M G-actina, (s1-s4) 8 μ M G-actina tratada com subtilisina numa razão, subtilisina/F-actina, de 1/3000, 1/200, 1/1500 e 1/1000, respectivamente. (α 1- α 4) 8 μ M G-actina tratada com α -quimotripsina numa razão, α -quimotripsina/G-actina, de 1/200, 1/100, 1/50 e 1/25, respectivamente.

Estes resultados indicam que as metioninas da G-actina se encontram acessíveis, porque há clivagem da actina por parte das duas enzimas proteolíticas.

Para o estudo da acessibilidade às metioninas 44 e 47 na F-actina, foram efectuados ensaios com várias razões enzima/actina, apresentados na figura 3.7. É possível verificar que para as razões enzima/actina iguais às utilizadas para a G-actina, (pistas s-1 - s-4 e α -1 - α -4), não é evidente a existência de clivagem na F-actina. As ligeiras bandas que aparece por debaixo das amostras tratadas com subtilisina (pistas s1-s4) e com α -quimotripsina (pistas α -1 - α -2) podem estar relacionadas com a clivagem

de G-actina presente no equilíbrio G-actina/F-actina existente na solução da F-actina, tal como sugerem Wegner et al, (1976) e Liu et al, (1990) ou com um ligeira clivagem da F-actina.

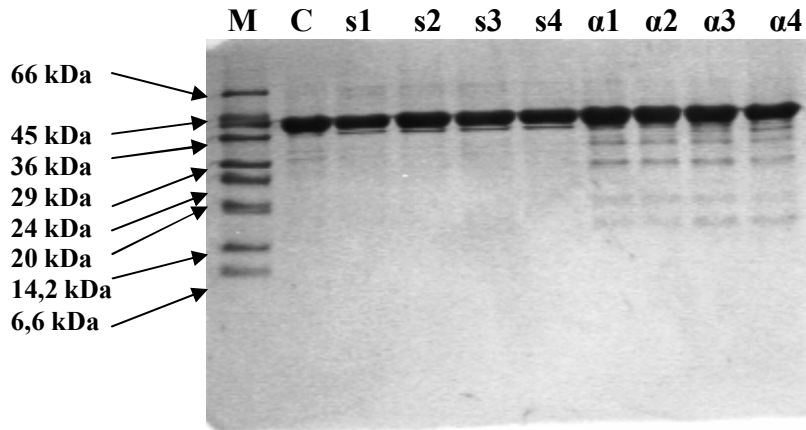


Figura 3.7: Gel de SDS-PAGE 15% obtido após aplicação de uma voltagem de 90 V durante 2,5 horas, a 5 µg (20 µl) de F-actina (8 µM) incubadas durante 90 min com diferentes razões α-quimotripsina/F-actina e de 10 min com diferentes razões subtilisina/F-actina. (M): 10 µl de marcador baixa massa molecular (6,6 – 66 kDa) da Sigma; (C) 8 µM F-actina, (s1-s4) 8 µM F-actina tratada com subtilisina numa razão, subtilisina/F-actina, de 1/3000, 1/200, 1/1500 e 1/1000, respectivamente; (α1-α4) 8 µM F-actina tratada com α-quimotripsina numa razão, α-quimotripsina/F-actina, de 1/200, 1/100, 1/50 e 1/25, respectivamente.

Uma justificação possível para a ausência de clivagem é a menor acessibilidade às metioninas 44 e 47 do filamento de actina quando comparado com o monómero de actina, facto anteriormente comprovado por Dalle-Donne et al., (2002) onde verificou que a oxidação das metioninas induz alterações na estrutura proteica, associadas a alterações na hidrofobicidade, pela exposição dos resíduos hidrofóbicos e que o processo de polimerização é mais lento e mais lento. O facto de a Met 44, situada no subdomínio 2 da actina, “loop” 38-52, ser fundamental para polimerização dos

monómeros, interagindo com o C-terminal da F-actina (Kim et al., 1996) sugere que estas metioninas são fundamentais para a manutenção da estrutura filamentosa da actina e que não se encontra acessível na mesma. Pelo facto de não ser possível aceder às metioninas na F-actina, não se desenvolveu os estudos de oxidação com o peroxinitrito, porque a utilização da técnica de clivagem por enzimas proteolíticas é fundamental para o estudo da oxidação das metioninas.

III.3.2.1 Acessibilidade às metioninas 44 e 47 após desnaturação proteica

Estudos anteriormente realizados por Dalle-Donne et al., (2002) e por Dorinda et al., (2006) mostram uma diminuição da clivagem da G-actina, por parte da α -quimotripsina e da subtilisina, após a oxidação das metioninas da actina por exposição a diferentes espécies oxidantes. Esta diminuição da clivagem é inversamente proporcional ao número de metioninas oxidadas, isto é, quanto maior for o número de metioninas oxidadas menor é a clivagem. De modo a verificar se a diminuição da clivagem da G-actina pela α -quimotripsina e subtilisina é provocada pela oxidação das metioninas 44 e 47, respectivamente, e não por alterações estruturais que impliquem uma diminuição da acessibilidade das enzimas de corte, procedeu-se à desnaturação da G-actina com SDS para que todos os resíduos fiquem expostos ao solvente e acessíveis à clivagem pelas enzimas. Os resultados obtidos estão expostos na figura 3.8.

Pela observação da figura verifica-se que nas amostras controlo, G-actina (pista 1), G-actina tratada com 200 μ M SIN-1 (pista 4) e G-actina tratada com 400 μ M SIN-1 (pista 5) não houve clivagem, como era de esperar devido à ausência de tratamento com α -quimotripsina. Para as amostras tratadas com esta enzima, G-actina tratada com α -quimotripsina (pista 2), G-actina tratada com 200 μ M SIN-1 e α -quimotripsina (pista 6) e G-actina tratada com 400 μ M SIN-1 e α -quimotripsina (pista 7) há uma diminuição da

intensidade da banda de 33 kDa resultante da clivagem. No que diz respeito, às amostras que sofreram desnaturação, por SDS, antes do tratamento com a α -quimotripsina, G-actina desnaturada com SDS e tratada com α -quimotripsina (pista 3), G-actina tratada com 200 μ M SIN-1, desnaturada com SDS e tratada com α -quimotripsina (pista 8) e G-actina e tratada com 400 μ M SIN-1, desnaturada com SDS e tratada com α -quimotripsina (pista 9) não se verifica o aparecimento das bandas originadas pela clivagem, como nos seus controlos, pistas 2, 6 e 7, respectivamente.

Este resultado sugere que a G-actina após ficar desnaturada é mais acessível à enzima proteolítica sendo clivada em mais locais, degradando-se os fragmentos resultantes. Através de tratamento informático com o programa Quantity One da BIO-RAD e como não foi possível quantificar a banda de 33 kDa, procedeu-se à quantificação a densidade da banda de 42 kDa da pista 3, 8 e 9. A diminuição da intensidade desta banda está directamente relacionada com o aparecimento da banda de 33 kDa, porque quanto menor a densidade da banda de 42 kDa maior seria a da banda de 33 kDa resultante de clivagem, daí ter-se realizado o estudo através da análise da banda de 42 kDa. Verificou-se um aumento na intensidade desta banda de aproximadamente 1,3 vezes e de aproximadamente 2,5 vezes para as amostras tratadas com 200 μ M SIN-1 e com 400 μ M SIN-1, respectivamente, em relação à sua amostra controlo (G-actina desnaturada com SDS e tratada com α -quimotripsina).

Apesar de não ter sido possível obter resultados no tratamento com subtilisina, estes resultados indicam que a diminuição da clivagem está directamente relacionada com a oxidação das metioninas e não com alterações conformacionais provocadas pela oxidação dos diferentes resíduos de aminoácidos presentes na G-actina.

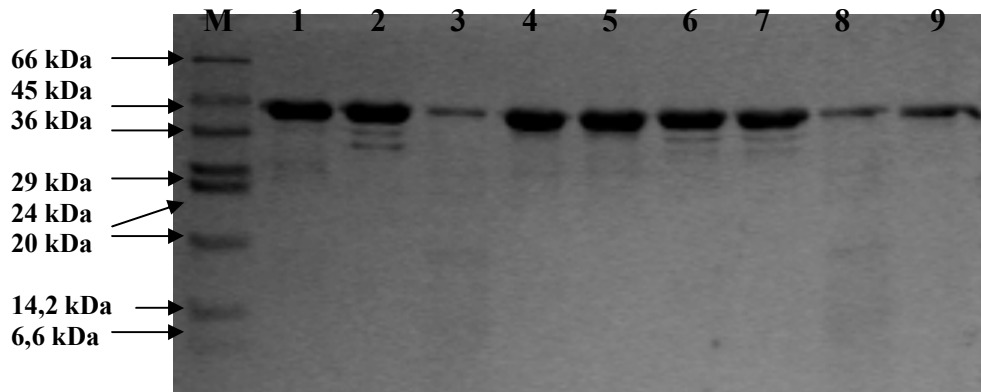


Figura 3.8: Gel de SDS-PAGE 15% obtido após aplicação de uma voltagem de 90 V durante 2,5 horas, a 5 μ g (20 μ l) de G-actina (8 μ M) incubadas durante 15 min com uma razão α -quimotripsina/G-actina 1:40 após tratamento com SIN-1 e SDS. (M): 10 μ l de marcador baixa massa molecular (6,6 – 66 kDa) da Sigma; (1) G-actina (8 μ M), (2) G-actina tratada com α -quimotripsina, (3) G-actina tratada com 0,1% SDS (m/v) e α -quimotripsina, (4) G-actina tratada 200 μ M SIN-1, (5) G-actina tratada 400 μ M SIN-1, (6) G-actina tratada 200 μ M SIN-1 e α -quimotripsina, (7) G-actina tratada 400 μ M SIN-1 e α -quimotripsina, (8) G-actina tratada 200 μ M SIN-1, 0,1% SDS (m/v) e α -quimotripsina e (9) G-actina tratada 400 μ M SIN-1, 0,1% SDS (m/v) e α -quimotripsina.

III.3.3 Quantificação das cisteínas reduzidas na F-actina

A actina apresenta na sua estrutura 5 cisteínas (cys) nas posições 10, 217, 257, 285, e 374 (Elzinga et al. 19773), estando a cys 374 localizada na zona mais periférica (a azul na figura 3.9) enquanto que as restantes se encontram mais no interior (impossível de verificar na figura 3.9). Devido à sua localização e facilidade de reacção com DTNB a cys 374 é denominada de cisteína “rápida”. Por outro lado para ser possível quantificar as restantes cys é necessário desnaturar a proteína. Os resultados obtidos após a exposição de F-actina ao SIN-1 durante 5 horas estão representados na tabela 3.1.

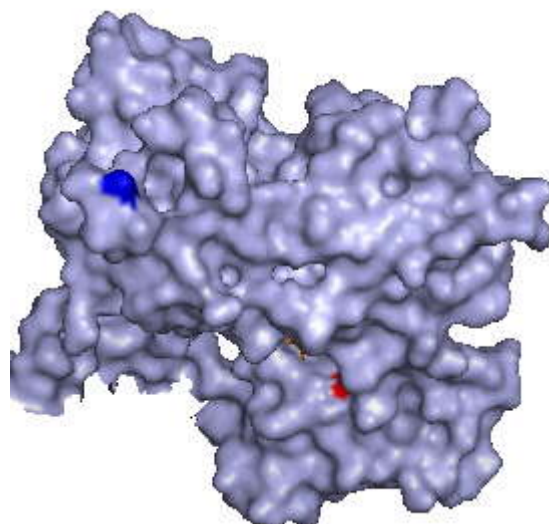


Figura 3.9: Estrutura tridimensional de G-actina (PDB ID: 1ATN) obtida por pymol. A cys 374 está representada a azul e a vermelho cys 217.

Verifica-se que para a actina controlo não se obteve a cisteínas “rápida” completamente reduzida (valor esperado: 1), tendo-se obtido um valor de $0,6 \pm 0,1$. O mesmo aconteceu para as cisteínas totais, onde em vez de cinco resíduos reduzidos apenas se quantificou $3,6 \pm 0,1$ resíduos (Tabela 3.1). Apesar de não se ter obtidos os valores esperados, é possível verifica a diminuição, de 60 % para a “rápida” e de 58% para as totais, no número de cisteínas reduzidas com o aumento da concentração de SIN-1. Através destes resultados, construiu-se um gráfico da variação das cys reduzidas (grupos S-H) em função da concentração de SIN-1 (Fig. 3.10). Aos resultados obtidos

ajustou-se uma equação hiperbólica do tipo Michaelis-Menten, $y = y_0 - \frac{P_1 x}{P_2 + x}$, onde P_2

é o equivalente ao K_M , o P_1 é o equivalente à variação entre os resíduos reduzidos e os oxidados (valor máximo de oxidação) e x a concentração de SIN-1. O IC_{50} (para este caso, concentração de SIN-1 que oxida metade dos resíduos de cisteínas) corresponde, neste caso, ao valor de P_2 sendo este $74,9 \pm 37,4 \mu M$ para cisteína “rápida” e de $73,9 \pm 16,9 \mu M$ para as cys totais. Assim a estequiometria da reacção é de $9,4 \mu M$ SIN-1/mol

F-actina oxidam 50 % da cys rápida e 9,2 μM SIN-1/mol F-actina oxidam 50 % das cisteínas totais.

Tabela 1: Número de cisteínas totais e “rápidas” da F-actina (8 μM) após tratamento com SIN-1 (0, 25, 100, 250, 500 μM) em solução de polimerização durante 5 horas a 25° C. Determinação efectuada através de $\text{Abs}_{412 \text{ nm}}$ na presença de DTNB ($\epsilon_{412 \text{ nm}} = 13,2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (n=3)

| Amostra | Cys “rápida” | Cys totais |
|--|---------------------|-------------------|
| F-actina (controlo) | 0,6 \pm 0,1 | 3,6 \pm 0,1 |
| F-actina + 25 μM SIN-1 | 0,5 \pm 0,1 | 3,2 \pm 0,3 |
| F-actina + 100 μM SIN-1 | 0,1 \pm 0,1 | 2,6 \pm 0,1 |
| F-actina + 250 μM SIN-1 | 0 | 2,4 \pm 0,2 |
| F-actina + 500 μM SIN-1 | 0 | 2,1 \pm 0,2 |

O facto de não se ter conseguido a determinação correcta de cys reduzidas pode, eventualmente, estar associado à acessibilidade aos diferentes resíduos devido às condições em que se realizaram os estudos e à própria estrutura da F-actina. Nos resultados obtidos por Tiago et al., (2006) a F-actina encontrava-se numa solução tampão 10 mM Tris (pH 8,5) + 25 mM KCl, enquanto que nos resultados obtidos neste trabalho estava na presença de solução de polimerização, que deixa o polímero de actina mais estável, limitando a acessibilidade às cisteínas. Por outro lado a F-actina utilizada poderia estar parcialmente oxidada impedindo a correcta quantificação das cisteínas reduzidas.

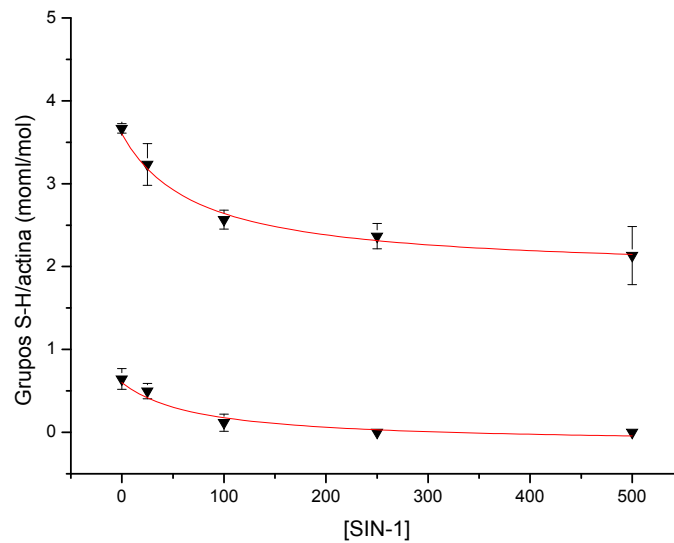


Figura 3.10: Número de cisteínas reduzidas na F-actina (6,24 μM), em mol cys/mol F-actina, após tratamento com 0, 25, 100, 250 e 500 μM SIN-1 durante 5 horas a 25° C em solução de polimerização. Abs a 412 nm ($\epsilon_{412} = 13,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). (■) Número de cisteínas totais reduzidas; (▼) número de cisteína “rápida” reduzidas; (n=3).

Estudos desenvolvidos por Liu e seus colaboradores et al., (1990), demonstram que a reactividade dos grupos tiol é menor na F-actina do que na G-actina e que algumas das cys estão localizadas nas regiões de contacto entre monómeros. Existem indícios de inacessibilidade a todos os grupos tiol provocados por alterações das condições como força iónica e concentração da F-actina. Neste estudo, também se verificou que a cys mais reactiva foi a 257 contrariamente à 374 descrita por outros autores. Em suma pode-se sugerir que as cisteínas se encontram parcialmente inacessíveis na F-actina quando exposta a solução de polimerização, mas tal facto só pode ser comprovado após estudos em que a F-actina se encontra totalmente reduzida.

III.4 Efeito da concentração de G-actina na acessibilidade aos grupos tiol

Os grupos tiol apesar de serem os grupos que mais facilmente são oxidados na actina (Dalle-Donne et al., 1999), o meio envolvente, a força iónica, o pH, a temperatura (Wang et al., 1989, Shu et al., 1992 e Liu et al., 1990) são os principais factores que alteram a acessibilidade aos grupos tiol. Foi verificado por Liu et al., (1990) e por Shu et al., (1992) que a variação da concentração de actina e/ou a concentração de catiões como por exemplo K^+ altera a acessibilidade aos grupos tiol. Com base nestes resultados determinou-se a variação do IC_{50} (para oxidação das cisteínas) com a concentração de G-actina, de modo a averiguar a alteração da acessibilidade aos grupos tiol em função da concentração de actina.

Os estudos foram realizados utilizando concentrações de 2, 4, 8 e 16 μM de G-actina, incubadas com 0; 6,25, 15, 25, 50 e 100 μM SIN-1. No caso do estudo com 8 e 16 μM G-actina aumentou-se a concentração de SIN-1 até 500 μM , com um ponto intermédio a 250 μM . Verificou-se que as cys estão todas reduzidas em todos os ensaios controlo (0 μM SIN-1) para as diferentes concentrações de G-actina.

No ensaio de 2 μM e 4 μM de G-actina ocorreu oxidação total da cys “rápida”, enquanto nas cys totais verificou-se a oxidação de aproximadamente duas para concentrações máximas de SIN-1, estando os resultados para 2 μM SIN-1 expostos na figura 3.11. Também neste caso procedeu-se ao ajuste dos resultados com uma equação hiperbólica do tipo Michaelis-Menten e os IC_{50} obtidos para as diferentes concentrações de actina estão representados na tabela 3.2.

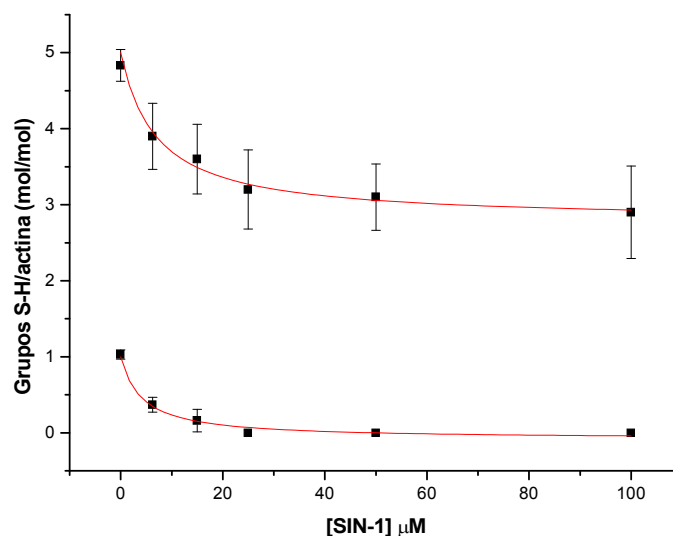


Figura 3.11: Número de cisteínas reduzidas na G-actina (1,56 µM), em mol cys/mol G-actina, após tratamento com 0; 6,25, 15, 25, 50 e 100 µM SIN-1 durante 5 horas a 25° C em solução G. Abs a 412 nm ($\epsilon_{412} = 13,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). (■) Número cisteínas totais reduzidas; (▼) número cisteína “rápida” reduzidas; (n=3).

No estudo com 8 e 16 µM G-actina foi necessário o aumento das concentrações de SIN-1 para ocorrer oxidação das 2 cys. Para 16 µM G-actina ocorreu oxidação de 1-1,5 cys com concentrações até 100 µM e apenas com o aumento da concentração de SIN-1 até 500 µM verifica-se a oxidação de 2-2,5 cys (fig. 3.12) No que diz respeito à cys “rápida” não se verifica a oxidação total para ambos os casos. É possível verificar que nos ensaios de 50 e 100 µM SIN-1, para cisteínas totais, os pontos não se ajustam perfeitamente à equação utilizada, o mesmo aconteceu no ensaio com 8 µM G-actina.

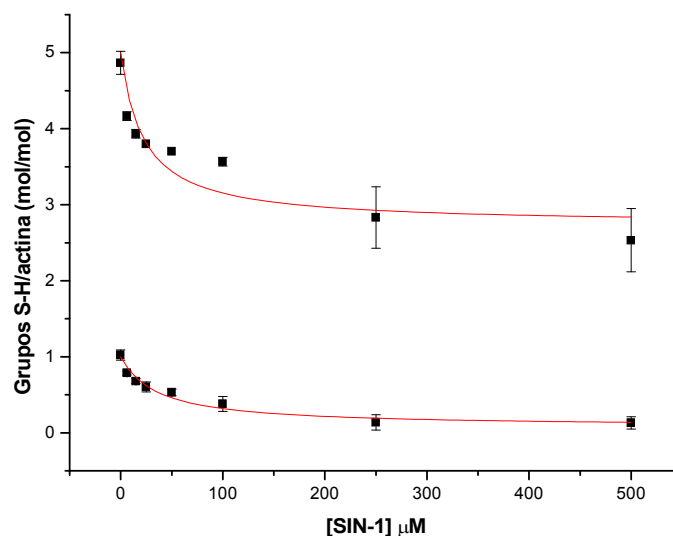


Figura 3.12: Número de cisteínas reduzidas na G-actina (12,48 μM), em mol cys/mol G-actina, após tratamento com 0; 6,25, 15, 25, 50, 100, 250 e 500 μM SIN-1 durante 5 horas a 25° C em solução G. Abs a 412 nm ($\epsilon_{412} = 13,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). (■) Número cisteínas totais reduzidas; (▼) número cisteína “rápida” reduzidas; (n=3).

Tabela 3.2: Resultados dos diferentes IC_{50} e razão G-actina/SIN-1 obtidos para as diferentes concentrações de G-actina.

| [G-actina] (μM) | IC_{50} (μM) | | Razão G-actina:SIN-1 (μM : μM) | |
|---------------------------------|---------------------------------------|--------------------|---|-----------------|
| | Cisteína “rápida” | Cisteína totais | Cisteína “rápida” | Cisteína totais |
| 2 | 4,1 \pm 0,9 | 7,0 \pm 1,6 | 1:2,1 | 1:3,5 |
| 4 | 8,0 \pm 1,1 | 9,3 \pm 3,7 | 1:2,0 | 1:2,3 |
| 8 | 8,8 \pm 5,5 | 18,4 \pm 5,6 | 1:1,1 | 1:2,3 |
| 16 | 35,0 \pm 4,0 | 22,0 \pm 9,0 | 1:2,2 | 1:1,4 |

Resultados e Discussão

A partir destes resultados construiu-se um gráfico da variação do IC_{50} em função da concentração de G-actina, para cys rápida (Fig. 3.13) e para a cisteínas totais (Fig. 3.14).

Para ambos os casos, cisteína “rápida” ou cisteínas totais, figura 3.13 e 3.14 respectivamente, verifica-se uma linearidade para o aumento do IC_{50} com o aumento da concentração de G-actina, apesar de o ponto relativo ao ensaio com 8 μM actina estar ligeiramente fora da linearidade (para a cisteína “rápida”), talvez devido a algum erro experimental. De referir que o R obtido para esta regressão foi de 0,98 para a cisteína “rápida” e de 0,96 para as cisteínas totais, indicando a fiabilidade dos resultados, porque se encontra muito próximo de 1. A linearidade obtida para a variação do IC_{50} com a concentração de actina indica que a acessibilidade às cisteínas é igual independentemente da concentração de actina utilizada, estando de acordo com os resultados obtidos por Lui et al., (1990)

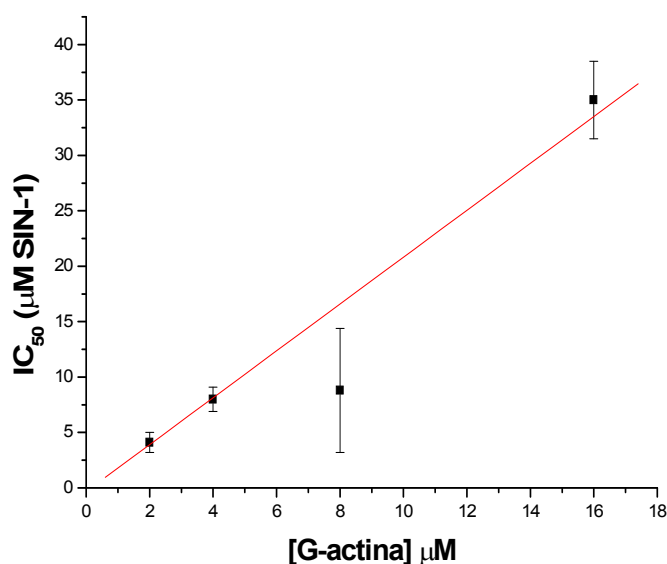


Figura 3.13: Variação do IC_{50} com a concentração de G-actina para cisteína “rápida”.

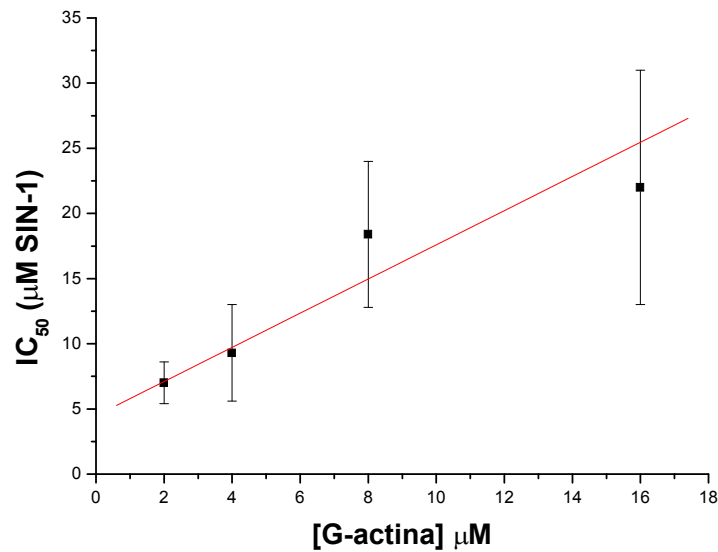


Figura 3.14: Variação do IC_{50} com a concentração de G-actina para cisteína totais.

III.5 Formação de dímeros de G-actina

A formação de dímeros de G-actina é um fenómeno normal quando a actina se encontra no estado oxidado, quer por indução (presença de um agente oxidante) quer por oxidação ao longo do tempo. Estudos efectuados por Dalle-Donne et al., (1999) e por Tang et al., (1999) demonstram o aparecimento de dímeros, sendo estes responsáveis pelo fenómeno denominado de “cross-linking” dos filamentos, que consiste no cruzamento entre filamentos actina de forma a formar uma rede. Durante a formação do filamento de actina há a possibilidade de incorporação de um monómero do dímero no filamento, ficando o outro disponível para formar outro filamento (fig. 3.15).

O aparecimento dos dímeros deve-se à formação de ligações entre os monómeros (Millonig et al., 1988), contudo Dalle-Donne et al., (1999) reporta os estudos de Millonig e outros indicando a formação de diferentes tipos de dímeros, tais como “dímeros pequenos” (86 kDa), “dímeros intermédios” (130 kDa) e os “dímeros

grandes” (>200 kDa). A ligação entre monómeros formada por duas cys 374 corresponde à formação de “dímeros pequenos” e entre a cys 374 e a lys-191 de diferentes monómeros dá origem a “dímeros intermédios”.

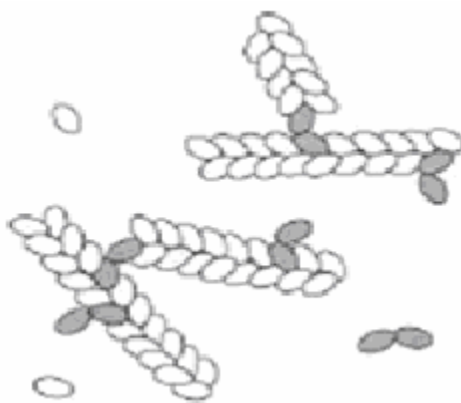




Figura 3.15: Esquema de formação do “cross-linking” entre filamentos de actina.

 Monómeros de G-actina e  os dímeros de G-actina (Tang et al 1999).

Deste modo analisou-se a presença de dímeros nas seguintes amostras: 8 μ M G-actina, 8 μ M G-actina + 1 mM DTT, 8 μ M G-actina + 50 μ M SIN-1 e 8 μ M G-actina + 50 μ M SIN-1 + 1 mM DTT de forma a verificar a formação dos mesmo através da oxidação pelo peroxinitrito e verificar a sua reversão através da utilização de um agente redutor. Os resultados obtidos estão representados na figura 3.16.

É evidente a presença de bandas superiores (aproximadamente 84 kDa) a 42 kDa nas amostras 8 μ M G-actina (pista 1) e 8 μ M G-actina + 50 μ M SIN-1 (pista 4). O mesmo não ocorre nas amostras tratadas com 1 mM DTT, 8 μ M G-actina + 1 mM DTT (pistas 2) e 8 μ M G-actina + 50 μ M SIN-1 + 1 mM DTT (pista 3). O aparecimento da banda indicadora da presença de dímeros na amostra controlo, 8 μ M G-actina (pista 1), pode indicar que a G-actina stock se encontra parcialmente oxidada ou que sofreu oxidação durante as 5 horas de incubação a 25° C e as 2 horas a 4° C.

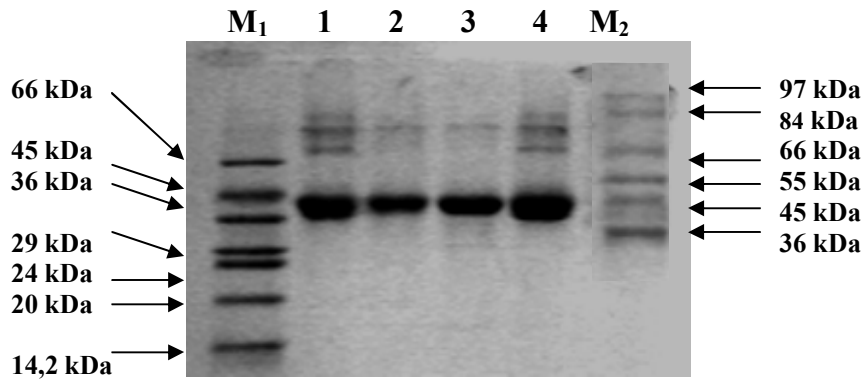


Figura 3.16: Gel SDS-PAGE 15 % obtido após aplicação de uma voltagem de 90 V durante 2,5 horas, a quatro amostras (5 μ g G-actina) e dois marcadores de massa molecular. (**M₁**) Marcador de baixa massa molecular (sigma); (**1**) 8 μ M G-actina; (**2**) 8 μ M G-actina + 1 mM DTT; (**3**) 8 μ M G-actina + 50 μ M SIN-1 + 1 mM DTT e (**4**) 8 μ M G-actina + 50 μ M SIN-1, todas em solução G, pH 8; (**M₂**) marcador de alta massa molecular.

Verifica-se também que o DTT reduziu os grupos tiol e consequente dissociação dos dímeros, 8 μ M G-actina + 1 mM DTT (pista 2), pois não é evidente a banda característica dos mesmos. Mesmo após oxidação induzida por SIN-1, o tratamento com DTT (pista 3) elimina os dímeros, podendo-se comprovar pela análise da pista 4 onde a oxidação pelo SIN-1 induz o aparecimento destes.

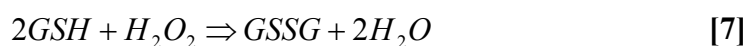
Estes resultados sugerem que o tratamento com um agente redutor impede a formação de dímeros e consequente formação de “cross-linking” dos filamentos de actina. Este fenómeno é muito importante no estudo da dinâmica dos filamentos por dispersão de luz, porque faz aumentar a dispersão da mesma, influenciando assim os resultados obtidos. Desta forma a adição de um agente redutor antes de se iniciar qualquer experiência é aconselhável, porque não só reduz todas as ligações dissulfídicas intramoleculares como intermoleculares. Contudo é preciso ter em conta o

efeito do agente na estrutura da proteína e na reactividade com os outros compostos presentes na solução, bem como com reagentes utilizados no estudo.

III.6 Estudo da reversibilidade da oxidação, por peroxinitrito, através de agentes redutores

O sistema biológico humano possui enzimas que evitam a formação do anião peroxinitrito como a superóxido dismutase (SOD) que reduz o radical anião superóxido ($\cdot\text{O}^{2-}$) a oxigénio (O_2) e peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e que por sua vez é transformado em H_2O e O_2 pela catalase (CAT), evitando assim a reacção entre o $\cdot\text{O}^{2-}$ e o óxido nítrico (NO). Contudo existem enzimas especializadas na redução de resíduos de aminoácidos oxidados pelo anião peroxinitrito e outras espécies oxidantes, são o caso da metionina sulfóxido reductase (reduz a metionina com grupo sulfóxido a metionina), a sulfiredoxina (reduz a uma cisteína com um ácido sulfinico a uma cisteína) (Jacob et al., 2004 e Jeong et al., 2006) e a glutathione (GSH). Esta é um importante agente antioxidante presente nas células, podendo reagir com espécies oxidantes, como o peróxido de hidrogénio (Eq. 7) entre outros (Eq. 8). Após ser oxidada, sofre redução pelo NADPH (Eq. 9) ficando novamente disponível para reagir.

Por outro lado, sabe-se que existem agentes redutores, como o ditionitrito (DTT) e β -mercaptoetanol (Fig. 3.17 A), revertem as ligações dissulfeto (-S-S-) *in vitro*.



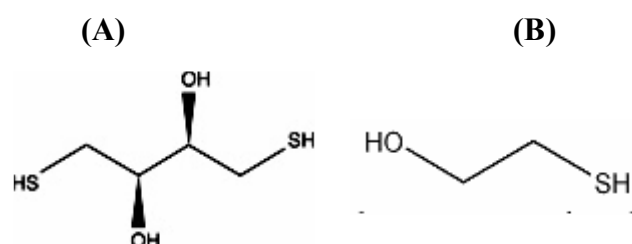


Figura 3.17: Estrutura (A) ditiotritol (DTT), (B) β -mercaptoetanol.

O mecanismo de redução dos grupos tiol por estes agentes é bastante semelhante. No caso do DTT (fig. 3.18), aquando da reacção com uma ligação dissulfeto, há fecho do anel devido à instabilidade do composto intermediário. Enquanto no β -mercaptoetanol (fig.3.19) há a formação de uma ligação dissulfídrica entre as duas moléculas após a sua oxidação.



Figura 3.18: Mecanismo de redução das ligações dissulfídicas pelo ditiotritol (DTT).

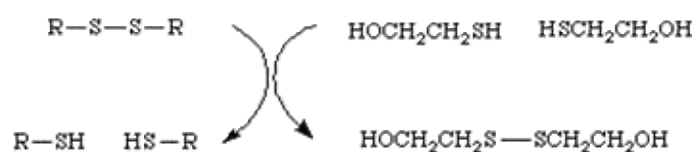


Figura 3.19: Reacção de redução das ligações dissulfídicas pelo β -mercaptoetanol.

Sabendo que existem diferentes mecanismos de reversão da oxidação e que o DTT e o β -mercaptoetanol revertem as ligações dissulfeto, procedeu-se ao estudo da reversão da oxidação das cisteínas e das metioninas, por parte destes agentes redutores, após exposição da actina ao peroxinitrito. Verificou-se ainda se a reversão ou não destes

resíduos pode estar envolvida na reversão ou não da dinâmica de polimerização da actina. O facto do DTT apresentar dois grupos tiol, enquanto o β -mercaptoetanol apresenta apenas um, as amostras foram incubadas com 1 mM de DTT e 2 mM de β -mercaptoetanol de modo a existir uma estequiometria igual para os dois ensaios.

III.6.1 Reversibilidade da oxidação nas cisteínas

Estudos efectuados anteriormente, mostram que a adição de DTT reduz a ligação dissulfídrica responsável pela formação de dímeros no antigénio HLA-G (Boyson et al., 2002), reverte a oxidação de uma cisteína nos receptores de rionidina presentes no musculo esquelético de porco (Haarmann et al., 1999), reverte, *in vitro*, a oxidação das cisteínas da “Flavin-containing monooxygenases” mas não a S-nitrosilação (Ryu et al., 2004), reduz a ligação dissulfídrica do dímeros formado pelo “receptor proteína-fosfatase tirosina α ” quando há alteração do estado redox da célula (van der Wijk et al., 2004), que a actividade da creatina cinase de músculo de rato pode ser regulada “*in vitro*” através do uso de DTT, porque a sua actividade depende da formação de uma ponte dissulfídrica no seu interior (Hurne et al., 2000) e que ocorre reversibilidade da actividade do complexo I da cadeia respiratória com DTT após oxidação com peroxinitrito como fonte de NO (Borutaite et al., 2000).

Na figura 3.20 estão representados os resultados obtidos para a reversão da cisteína “rápida”, sendo evidente que para uma concentração 100 μ M SIN-1 (preto) e de 500 μ M SIN-1 (branco) os valores obtidos para o controlo (8 μ M G-actina) são semelhantes e aproximadamente 1, indicando a redução da cisteína “rápida”. Após ter sido exposta durante 5 horas a 25 °C e 2 horas a 4 °C (8 μ M G-actina, 7 horas) verifica-se uma ligeira oxidação, mais pronunciada no ensaio com 100 μ M SIN-1. Para a amostra que esteve 5 horas a 25 °C e foi tratada 1 mM DTT durante 2 horas a 4° C (8

μM G-actina + DTT, 7 horas) verifica-se que para 100 μM SIN-1 há uma ligeira recuperação da oxidação, não sendo total, mas o erro obtido indica que poderia ser total. No que diz respeito à amostra tratada com SIN-1 durante 5 horas a 25 °C e depois colocada a 4 °C durante 2 horas (8 μM G-actina + SIN-1, 7 horas) é evidente uma oxidação da cisteína “rápida”.

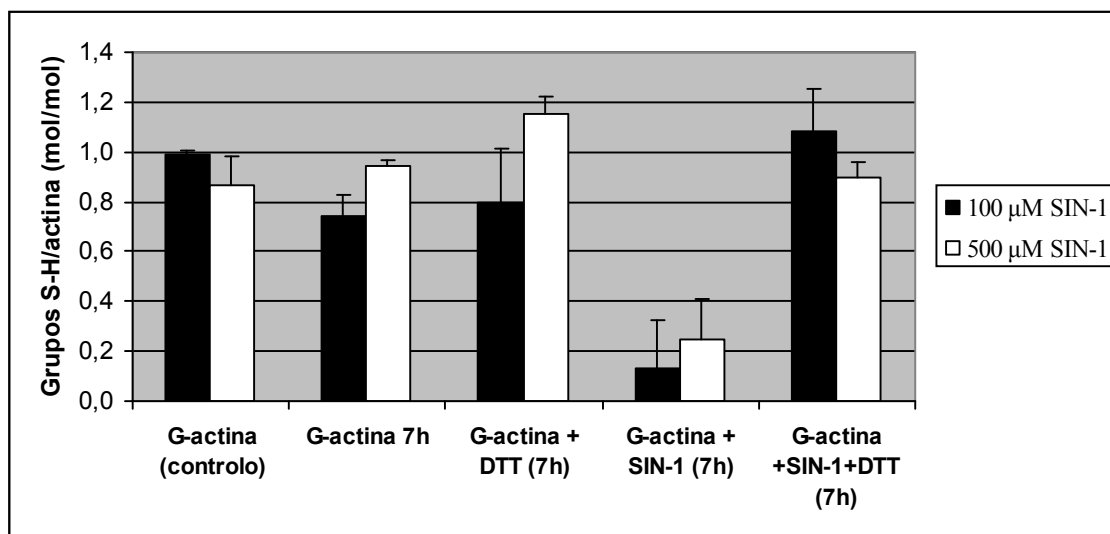


Figura 3.20: Variação da oxidação do grupo tiol da cisteína “rápida” de 8 μM G-actina incubada em solução G, pH 8, na presença e na ausência de SIN-1 e de 1 mM DTT, (■) 100 μM SIN-1, (□) 500 μM SIN-1. (G-actina (controlo)) – G-actina sem tratamento; (G-actina 7 h) – G-actina exposta 5 horas a 25 °C + 2 horas a 4 °C; (G-actina + DTT 7 h) – G-actina expostas a 25 °C durante 5 horas + 2 horas a 4 °C na presença de DTT; (G-actina + SIN-1) – G-actina tratada com SIN-1 durante 5 horas a 25 °C + 2 horas a 4 °C; (G-actina + SIN-1 + DTT) - G-actina tratada com SIN-1 durante 5 horas a 25 °C + 2 horas a 4 °C na presença de DTT. Abs 412 nm ($\epsilon_{\text{DTNB}} = 13,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Tal como se esperava para a amostra tratada 5 horas com SIN-1 a 25° C e depois com 1 mM DTT durante 2 horas a 4 °C, verifica-se novamente a redução do grupo tiol, indicando a reversibilidade do mesmo. Este resultado indica que a cys 374, denominada

de cys “rápida”, sofre reversão *in vitro* na presença de 1 mM DTT, quer após oxidação com 100 μ M quer por 500 μ M SIN-1.

Os resultados para a reversão das cisteínas totais (fig. 3.21), indicam que as cinco cisteínas estão praticamente todas reduzidas na amostra controlo. No ensaio G-actina 7 horas, 5 horas a 25 °C e 2 horas a 4 °C, não se verificam oxidação das cisteínas relativamente à amostra controlo. Após tratamento com 1 mM DTT (G-actina + DTT, 7 horas) os cinco grupos tiol ligeiramente oxidados são completamente reduzidos. Na amostra tratada com SIN-1, 5 horas a 25 °C e 2 horas a 4° C (G-actina + SIN-1, 7 horas) há oxidação de 1,5 cisteínas e de aproximadamente 2,5 cisteínas, para 100 e 500 μ M SIN-1, respectivamente. As amostras oxidadas com SIN-1 e depois tratadas com 1 mM DTT (G-actina + SIN-1 + DTT, 7 horas) apresentam os cinco grupos tiol quase totalmente reduzidos, indiciando a reversibilidade da oxidação nas cinco cisteínas presentes na actina. A ligeira diferença existente entre o tratamento com 500 e 100 μ M DTT, na amostra tratada com SIN-1, pode estar associada à oxidação de uma cisteína localizada na parte mais interior da actina quando é exposta a 500 μ M SIN-1. Assim sendo, a acessibilidade a este resíduo por parte do DTT pode ser dificultada e não haver reversibilidade completa do mesmo.

Contudo um estudo realizado por Radi et al., (1991 B) indica que o DTT reduz as ligações dissulfídricas, numa proporção de 1 mol de DTT reverte 2 moles de ligação dissulfídricas, mas não a forma sulfénica, sulfínica ou sulfónica. Na figura 3.22 está representado o esquema proposto por Radi et al., (1991 B) para a reversão das diferentes formas de oxidação do grupo tiol das cisteínas. A conjugação dos resultados obtidos e os de Radi et al 1991 (B) indicam que as cisteínas da actina estão oxidadas sob a forma de ligação dissulfídrica.

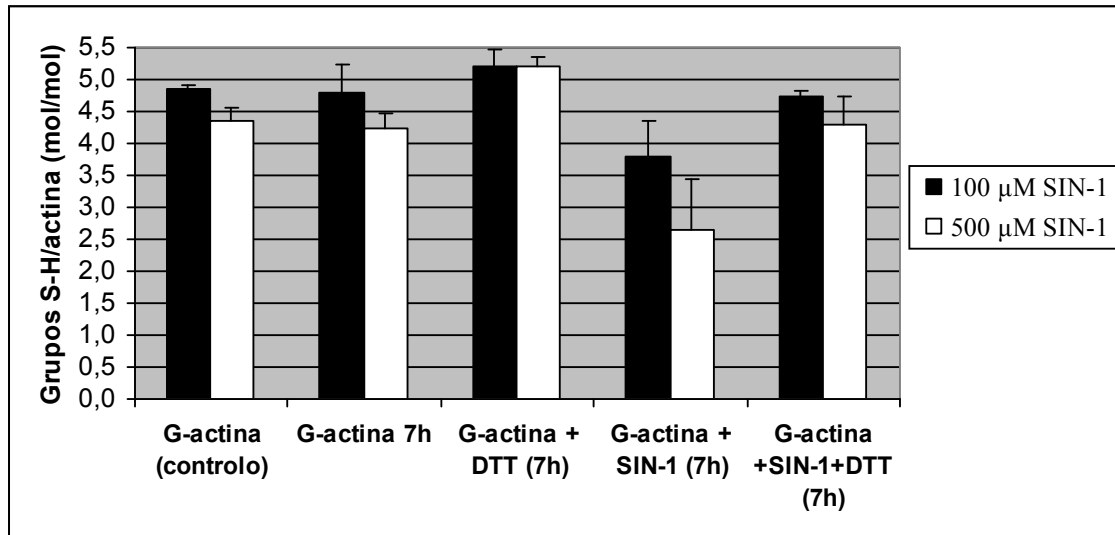


Figura 3.21: Variação da oxidação dos grupos tiol da G-actina (8 μM) incubada em solução G, pH 8, na presença e na ausência de SIN-1 e de 1 mM DTT, (■) 100 μM SIN-1, (□) 500 μM SIN-1. (**G-actina (controlo)**) – G-actina sem tratamento; (**G-actina 7 h**) – G-actina exposta 5 horas a 25 °C + 2 horas a 4 °C; (**G-actina + DTT 7 h**) – G-actina expostas a 25 °C durante 5 horas + 2 horas a 4 °C na presença de DTT; (**G-actina + SIN-1**) – G-actina tratada com SIN-1 durante 5 horas a 25 °C + 2 horas a 4° C; (**G-actina + SIN-1 + DTT**) - G-actina tratada com SIN-1 durante 5 horas a 25 °C + 2 horas a 4° C na presença de DTT. Abs 412 nm ($\epsilon_{\text{DTNB}} = 13,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

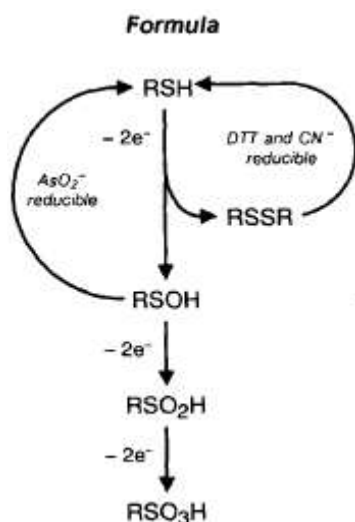


Figura 3.22: Diagrama dos produtos de oxidação dos grupos tiol das cisteínas. A reversão de alguns produtos de oxidação dos grupos tiol é possível, *in vitro*, através da reacção com DTT, cianeto (CN⁻) e arsenato (AsO₂⁻) (Adaptado de Radi et al., 1991 B)

III.6.2 Reversibilidade da oxidação nas metioninas 44 e 47

Como já foi referido anteriormente, a redução das metioninas *in vivo* ocorre através da metionina sulfóxido reductase. Contudo *in vitro* ainda não se verificou nenhuma indicação da existência de reversibilidade para as metioninas por agentes redutores como o DTT e o β -mercaptoetanol. Estudos desenvolvidos por Song et al., 2006, demonstram a não reversibilidade da oxidação da metionina da fósfolipase A2 pelo DTT. Foi com esse objectivo que se tentou verificar se as metioninas 44 e 47 da G-actina eram reduzidas pelo β -mercaptoetanol após oxidação.

III.6.2.1 Reversibilidade da oxidação nas metioninas 44

Pela análise da figura 3.23 verifica-se que as amostras controlo, 8 μ M G-actina (pista 1), 8 μ M G-actina tratada com 200 μ M de SIN-1 (pista 2), 8 μ M G-actina tratada com 2 mM β -mercaptoetanol (pista 5) e 8 μ M G-actina tratada com 200 μ M de SIN-1 + 2 mM β -mercaptoetanol (pista 7) não apresentam clivagem porque não foram tratada com α -quimotripsina. As amostras 8 μ M G-actina + α -quimotripsina (pista 3), 8 μ M G-actina tratada com 200 μ M de SIN-1 + α -quimotripsina (pista 4), 8 μ M G-actina tratada com 2 mM β -mercaptoetanol + α -quimotripsina (pista 6) e 8 μ M G-actina tratada com 200 μ M de SIN-1 + 2 mM β -mercaptoetanol + α -quimotripsina (pista 8) apresentam a banda de 33 kDa referentes à clivagem.

Por análise informática, determinou-se a razão entre a banda de 33 kDa/42 kDa, para as amostras tratadas com α -quimotripsina, pistas 3, 4, 6 e 8. Os resultados obtidos estão representados na tabela 3.3. Verifica-se que para as amostras sem tratamento com SIN-1, pistas 3 e 6, apresentam a mesma razão como era de esperar, respectivamente

0,99. A amostra tratada com SIN-1 sem tratamento com β -mercaptoetanol apresenta uma razão inferior às anteriores, 0,92, devido à oxidação. No que diz respeito à amostra tratada com SIN-1 e β -mercaptoetanol apresenta uma razão de 0,90 indicando que não ocorre reversão da metionina 44 por parte do β -mercaptoetanol.

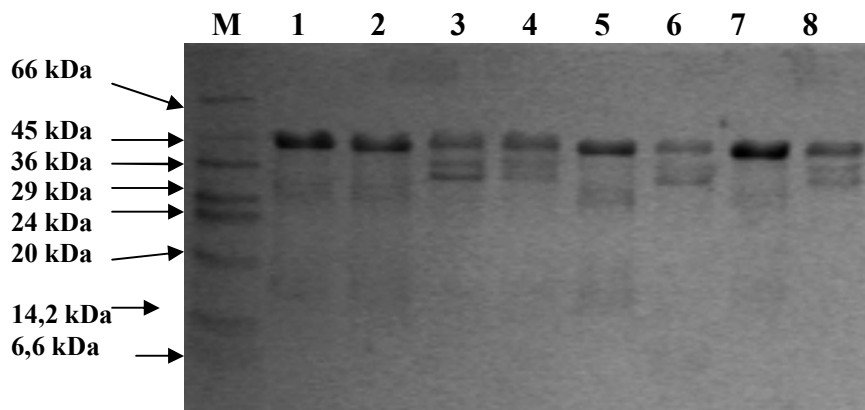


Figura 3.23: Gel SDS-PAGE 15 % obtido após aplicação de uma voltagem de 90 V durante 2,5 horas a diferentes amostras de 8 μ M G-actina (5 μ g no gel) incubadas 7 horas com e sem 200 μ M SIN-1/2 mM β -mercaptoetanol/ α -quimotripsina (razão α -quimotripsina/G-actina = 1:40) em solução G, pH 8 a 25° C. (M) Marcador de baixa massa molecular, (1) G-actina, (2) G-actina tratada com SIN-1, (3) G-actina tratada com α -quimotripsina, (4) G-actina tratada com SIN-1 e α -quimotripsina, (5) G-actina tratada com β -mercaptoetanol, (6) G-actina tratada com β -mercaptoetanol e α -quimotripsina, (7) G-actina tratada com SIN-1 e β -mercaptoetanol e (8) G-actina tratada com SIN-1, β -mercaptoetanol e α -quimotripsina.

Tabela 3.3: Valores da razão entre a banda de 33 kDa e de 42 kDa obtidas depois da digestão de 1,5 horas com α -quimotripsina. Para a medição da densidade das bandas foi utilizando o software Quantity One da BIO-RAD.

| Amostras | Razão banda 33 kDa/42 kDa |
|---|----------------------------------|
| G-actina (pista 3) | 0,99 |
| G-actina + SIN-1 (pista 4) | 0,92 |
| G-actina + β-mercaptoetanol (pista 6) | 0,99 |
| G-actina + SIN-1 + β-mercaptoetanol (pista 8) | 0,90 |

III.6.2.2 Reversibilidade da oxidação nas metioninas 47

Para o caso da metionina 47, verifica-se análise da figura 3.24 que as amostras controlo, 8 μ M G-actina (pista 1), 8 μ M G-actina tratada com 200 μ M de SIN-1 (pista 2), 8 μ M G-actina tratada com 2 mM β -mercaptoetanol (pista 5) e 8 μ M G-actina tratada com 200 μ M de SIN-1 + 2 mM β -mercaptoetanol (pista 7) não apresentam clivagem devido ao não tratamento com subtilisina.. As amostras 8 μ M G-actina + subtilisina (pista 3), 8 μ M G-actina tratada com 200 μ M de SIN-1 + subtilisina (pista 4), 8 μ M G-actina tratada com 2 mM β -mercaptoetanol + subtilisina (pista 6) e 8 μ M G-actina tratada com 200 μ M de SIN-1 + 2 mM β -mercaptoetanol + subtilisina (pista 8) apresentam a banda de 35 kDa referentes à clivagem pela enzima proteolítica.

Também para este caso se procedeu ao tratamento informática para a determinação da razão ente a banda de 35 kDa/42 kDa (resultados tabelados na tabela 3.4), verificando-se que apesar das amostras sem tratamento com SIN-1, pista 3 e 6,

Resultados e Discussão

apresentam razões diferentes, 0,98 e 0,90, respectivamente, as amostras com tratadas com SIN-1 apresentam razões mais baixas, sendo de 0,83 para amostra apenas tratada com SIN-1 e de 0,80 para amostra tratada com SIN-1, β -mercaptoetanol e subtilisina. Os 0,80 obtidos para a razão na amostra da pista 8, indica que não existe reversibilidade da oxidação da metionina 47. Assim, tanto a metionina 44 como a 47 da G-actina não sofrem redução por parte do β -mercaptoetanol.

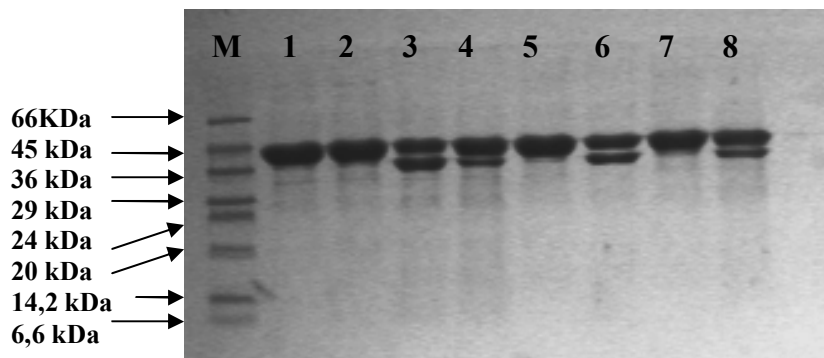


Figura 3.24: Gel SDS-PAGE 15 % obtido após aplicação de uma voltagem de 90 V durante 2,5 horas a diferentes amostras de 8 μ M G-actina (5 μ g no gel) incubadas 7 horas com e sem 50 μ M SIN-1/2 mM β -mercaptoetanol/subtilisina (razão subtilisina/G-actina = 1:1500) em solução G, pH 8 a 25° C. (M) Marcador de baixa massa molecular, (1) G-actina, (2) G-actina tratada com SIN-1, (3) G-actina tratada com subtilisina, (4) G-actina tratada com SIN-1 e subtilisina, (5) G-actina tratada com β -mercaptoetanol, (6) G-actina tratada com β -mercaptoetanol e subtilisina, (7) G-actina tratada com SIN-1 e β -mercaptoetanol e (8) G-actina tratada com SIN-1, β -mercaptoetanol e subtilisina.

Tabela 3.4: Valores da razão entre a banda de 35 kDa e de 42 kDa obtidas depois da digestão de 10 min com subtilisina. Para a medição da densidade das bandas foi utilizando o software Quantity One da BIO-RAD.

| Amostras | Razão banda 35 kDa/42 kDa |
|---|----------------------------------|
| G-actina (pista 3) | 0,98 |
| G-actina + SIN-1 (pista 4) | 0,83 |
| G-actina + β-mercaptoetanol (pista 6) | 0,90 |
| G-actina + SIN-1 + β-mercaptoetanol (pista 8) | 0,80 |

III.6.3 Estudo da reversibilidade do índice de polimerização da actina

O facto de as metioninas 44 e 47 não sofrerem reversão da oxidação, com peroxinitrito, por parte dos agentes redutores e as cisteínas sofrerem reversão da oxidação, levou a estudar a possível reversão das alterações funcionais através do estudo da reversão do índice de polimerização.

O estudo da inibição da polimerização foi efectuado, previamente, por Tiago et al., (2006) e por Dorinda et al., (2006), os quais demonstraram inibição da polimerização na presença de peroxinitrito. Tiago et al., (2006) obteve um IC₅₀ para a inibição da polimerização de $10 \pm 1 \mu\text{M}$ SIN-1 ($5 \mu\text{M}$ SIN-1 : $1 \mu\text{M}$ actina) para uma concentração de actina de $2 \mu\text{M}$, enquanto que Dorinda et al., (2006) obteve $58,5 \pm 10,4 \mu\text{M}$ ($7,3 \mu\text{M}$ SIN-1 : $1 \mu\text{M}$ actina) para uma concentração de $8 \mu\text{M}$ actina. Seguindo estes resultados, incubou-se a G-actina ($8 \mu\text{M}$) com $50 \mu\text{M}$ e $100 \mu\text{M}$ de SIN-1 para promover inibição da polimerização. Para verificar a possibilidade de reversão do índice

de polimerização por parte dos agentes redutores as amostras foram tratadas com 1 mM DTT ou com 2 mM β -mercaptoetanol após a oxidação com peroxinitrito.

No caso do tratamento com β -mercaptoetanol os resultados da cinética de polimerização estão expostos na figura 3.25. A estes, ajustou-se uma equação do tipo

sigmoidal boltziana $y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{x-x_0}{dx}}} + A_2$, onde A_1 é o valor inicial do eixo das ordenadas

(intensidade de luz dispersa pela G-actina), A_2 representa o valor final (extensão polimerização) e dx é o tempo de meia vida ($t_{1/2}$). O tempo de meia vida (tempo necessário para polimerizar metade da extensão máxima do filamento) é inversamente proporcional à velocidade de polimerização, isto é, quanto maior o tempo de meia vida menor é a velocidade. Os resultados do tempo de meia vida obtidos através do ajuste estão representados na tabela 3.5.

Pela análise dos dados da figura 3.20 e da tabela 3.3 verifica-se que a extensão da polimerização, 58361 ± 101 u.a., é superior na amostra tratada com o agente redutor (Fig. 3.25 (○)) do que na amostra controlo (Fig. 3.25 (■)), 53853 ± 147 u.a., indiciando a formação de filamentos maiores na presença de agente redutor, pelo que a velocidade de polimerização ser ligeiramente inferior para este caso, $t_{1/2} = 11,4 \pm 0,2$ min enquanto que para o controlo obteve-se $9,2 \pm 0,6$ min.

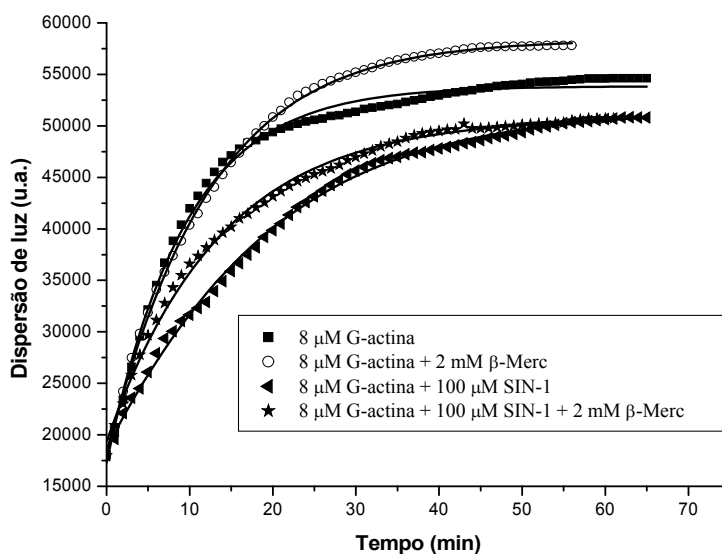


Figura 3.25: Cinética de polimerização da G-actina em solução G, pH 8 após adição 1,0 mM MgCl₂; 50 mM KCl a 25 °C, obtida através da variação da intensidade da dispersão de luz num fluorímetro Horiba Jobin Yvon, Fluoromax ($\lambda_{\text{excitação}} = \lambda_{\text{emissão}} = 546$ nm). (■) 8 μ M G-actina; (○) 8 μ M G-actina tratada com 2 mM β -mercaptoetanol; (◄) 8 μ M G-actina tratada com 100 μ M SIN-1 e (★) 8 μ M G-actina tratada com 100 μ M SIN-1 e 2 mM β -mercaptoetanol,(n=2).

Tabela 3.5: Valores de extensão de polimerização (u.a.) e de tempos de meia vida (min) para os diferentes ensaios, obtidos após ajuste de uma equação do tipo sigmoidal boltziana aos resultados obtidos para a reversibilidade da polimerização por β -mercaptoetanol.

| Ensaio | Extensão polimerização (u.a.) | Tempo meia vida ($t_{1/2}$) (min) |
|--|--|---|
| G-actina | 53853 \pm 147 | 9,2 \pm 0,6 |
| G-actina + β-mer. | 58361 \pm 101 | 11,4 \pm 0,2 |
| G-actina + SIN-1 | 51614 \pm 219 | 16,4 \pm 0,9 |
| G-actina + SIN-1 + β-mer | 50854 \pm 189 | 13,5 \pm 0,9 |

Após tratamento com 100 μM (Fig. 3.25 (\blacktriangleleft)) verifica-se um aumento do tempo de meia vida de aproximadamente 78%, de $9,2 \pm 0,6$ para $16,4 \pm 0,9$ minutos, indicando que a velocidade de polimerização aumenta na mesma percentagem. Observa-se também a diminuição da extensão de polimerização de 53853 ± 147 para 51614 ± 219 u.a., aproximadamente de 6%. Após adição de β -mercaptoetanol (Fig.3.25 (\star)) verifica-se uma redução de 31% do tempo de meia vida de $16,4 \pm 0,9$ para $13,5 \pm 0,9$, em relação à amostra controlo, continuando a existir uma diferença do tempo de meia vida de 47%. A extensão de polimerização para amostra tratada com SIN-1 + β -mercaptoetanol, 50854 ± 189 u.a., é inferior à amostra controlo, mas semelhante à da amostra tratada com SIN-1. Assim verifica-se que não existe reversão completa do índice da polimerização, *in vitro*, pelo β -mercaptoetanol.

De igual modo, para DTT, procedeu-se à representação gráfica dos resultados obtidos por dispersão de luz (Fig. 3.26) aos quais se ajustou a mesma equação de Boltzman estando os valores obtidos tabelados (Tabela 3.6). Os valores obtidos para o tempo de meia vida e extensão de polimerização são iguais aos do ensaio com β -mercaptoetanol para as amostras G-actina (Fig. 3.26 (\blacksquare)) e para a amostra G-actina tratada com SIN-1 (Fig. 3.26 (\blacktriangleleft)), $9,2 \pm 0,6$ e 53853 ± 147 , $16,4 \pm 0,9$ e 51614 ± 219 , respectivamente

Verificou-se que na amostra em que houve tratamento da G-actina com 1 mM DTT (Fig. 3.26 (\circ)) o tempo de meia vida é praticamente igual ao controlo, $9,6 \pm 0,2$ e $9,2 \pm 0,6$ minutos respectivamente. Verificou-se ainda uma diminuição de 3% na extensão de polimerização, passando de 53853 ± 147 para 52689 ± 67 . Tal como foi obtido para o β -mercaptoetanol após o tratamento com SIN-1 verifica-se um aumento

de 78% no tempo de meia vida e uma diminuição de 6% na extensão da polimerização. Com o tratamento da amostra com DTT depois oxidação (Fig. 3.26 (★)) verifica-se uma ligeira diminuição do tempo de meia vida, $14,3 \pm 1,0$ minutos, relativamente à amostra tratada com SIN-1, cifrando-se nos 23 %, indicando que existe um ligeiro aumento da velocidade de polimerização. Ainda assim fica distante da amostra controlo, 55 % mais lenta. No que diz respeito à extensão de polimerização verifica-se que é bastante semelhante à amostra tratada com SIN-1, apesar de ser mais baixa, 50794 ± 191 e 51614 ± 219 , respectivamente. Verificou-se que também não existe reversibilidade da polimerização da actina induzida por DTT. Do mesmo, verifica-se a não reversão completa do índice de polimerização, *in vitro*, pelo DTT.

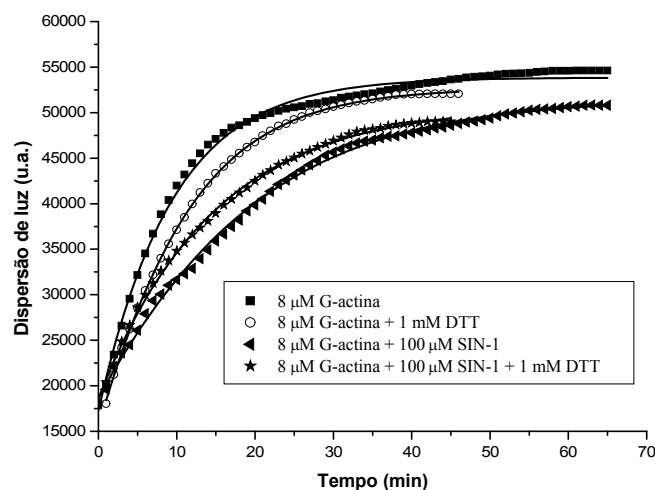


Figura 3.26: Cinética de polimerização da G-actina em solução G, pH 8 após adição 1,0 mM MgCl₂; 50 mM KCl a 25 °C, obtida através da variação da intensidade da dispersão de luz num fluorímetro Horiba Jobin Yvon, Fluoromax ($\lambda_{\text{excitação}} = \lambda_{\text{emissão}} = 546$ nm). (■) 8 μM G-actina; (○) 8 μM G-actina tratada com 1 mM DTT; (◄) 8 μM G-actina tratada com 100 μM SIN-1 e (★) 8 μM G-actina tratada com 100 μM SIN-1 e 1 mM DTT; (n=2).

Tabela 3.6: Valores de extensão de polimerização (u.a.) e de tempos de meia vida (min) para os diferentes ensaios, obtidos após ajuste de uma equação do tipo sigmoideal Boltziana aos resultados obtidos para a reversibilidade da polimerização por DTT.

| Ensaio | Extensão polimerização (u.a.) | Tempo meia vida ($t_{1/2}$) (min) |
|-------------------------------|--|---|
| G-actina | 53853 ± 147 | 9,2 ± 0,6 |
| G-actina + DTT | 52689 ± 67 | 9,6 ± 0,2 |
| G-actina + SIN-1 | 51614 ± 219 | 16,4 ± 0,9 |
| G-actina + SIN-1 + DTT | 50794 ± 191 | 14,3 ± 1,0 |

Pelo tratamento e análise dos resultados, concluiu-se que não se verifica reversão completa da inibição da polimerização da actina, *in vitro*, através do 1 mM DTT e de 2 mM β -mercaptoetanol. O facto de as metioninas 44 e 47 não se encontrarem acessíveis na F-actina, não sofrerem reversão da oxidação (na G-actina) e de se saber que a 44 está directamente ligada ao fenómeno de polimerização, sugere-se que este resíduo seja responsável pela não reversão do índice de polimerização. Por outro lado, o facto de as cisteínas poderem estar parcialmente inacessíveis na F-actina e de sofrerem reversão da oxidação (quando estão no estado dissulfeto, na G-actina) pode indicar a ligeira recuperação do índice de polimerização após o tratamento com os agentes redutores.

IV. Conclusão

No final deste trabalho é possível dizer que a actina quando se encontra sob a forma de filamento é bastante estável se se encontrar numa solução com elevada força iónica e na presença de ATP (solução de polimerização). Verifica-se também, que na F-actina as Met 44 e 47 se encontram inacessíveis às enzimas proteolíticas, α -quimotripsina e subtilisina, respectivamente. Tal facto, combinado com resultados obtidos por outros autores, sugere que estes resíduos apresentam um papel fundamental na estrutura da F-actina. No que diz respeito às cisteínas, também podem não estar totalmente acessíveis, visto que apenas foi possível quantificar $0,6 \pm 0,1$ resíduos reduzidos para Cys374 (cisteína “rápida”) e $3,6 \pm 0,1$ grupos tiol reduzidos para as 5 cisteínas presentes.

Para os estudos realizados com G-actina, conclui-se que a acessibilidade aos grupos tiol não depende da concentração de actina, visto que existe uma linearidade entre o IC_{50} para a oxidação das cisteínas e a concentração de G-actina. Verificou-se ainda, que o peroxinitrito pode induzir o aparecimento de dímeros e que estes podem ser eliminados através do tratamento com um agente redutor.

Por fim, observou-se a irreversibilidade das alterações funcionais da actina por parte do DTT e do β -mercaptoetanol, após oxidação da G-actina com peroxinitrito. Para ambos os tratamentos verifica-se um aumento da velocidade de polimerização na ordem 78% após tratamento com SIN-1, percentagem que diminui para os 50%, quando a G-actina sofre um tratamento com os agentes redutores após a oxidação. Verificou-se e sugere-se que a não reversão do índice de polimerização possa estar associada à irreversibilidade da oxidação das metioninas 44 e 47 pelos agentes redutores e que a ligeira recuperação após o tratamento com os mesmos, se deva ao facto de ocorrer reversão total dos grupos tiol das cisteínas da actina.

V. Estudos futuros

De forma a esclarecer alguns resultados deste trabalho e o mecanismo de reversão e inibição da oxidação da actina, sugere-se os seguintes estudos:

- 1) Estudo da acessibilidade aos grupos tiol das cisteínas na F-actina, tendo em conta a total redução dos grupos tiol;
- 2) Estudo da oxidação, na presença de agentes antioxidantes como a CAT, SOD, ascorbato, glutathione;
- 3) Estudo da reversão da oxidação através da tioredoxina/tioredoxina reductase, glutaredoxina, glutathione reductase, sulfiredoxinas e sestrinas;
- 4) Estudos bioinformáticos para determinar alterações estruturais devido a oxidação dos diferentes resíduos de aminoácidos e suas implicações na estrutura e função da actina;
- 5) Estudo da possibilidade de reversão das alterações estruturais através de DSC;

VI. Referências

- Alvarez, B., Ferrer-Sueta, G., Freeman, B.A., Radi, R., “*Kinetics of peroxynitrite reaction with amino acids and human serum albumin*” J Biol Chem, **274**:842-848, 1999;
- Alvarez, B., Radi, R., “*Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins*” Amino Acids,” **25**:295-311, 2003,
- Azevedo, C., “*Biologia Celular e Molécula*”, 3ª edição, LIDEL, 1999;
- Baker, P.R., Schopfer, F.J., Sweeney, S., Freeman, B.A., “*Red cell membrane and plasma linoleic acid nitration products: synthesis, clinical identification, and quantitation*”, Proc Natl Acad Sci U S A, **101**:11577-11582, 2004;
- Bartlett, D., Church, D.F., Bounds, P.L., Koppenol, W.H., “*The kinetics of the oxidation of L-ascorbic acid by peroxynitrite*”, Free Radic Biol Med, **18**:85-92, 1995;
- Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., Freeman, B.A., “*Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide*”, Proc. Nati. Acad. Sci. USA, **87**:1620-1624, 1990;
- Brener, E., Rubinstein, S., Cohen, G., Shternall, K., Rivlin, J., e Breitbart, H., “*Remodeling of actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction*” Biol Reprod, **68**:837-845, 2003;
- Borutaite, V., Budriunaite, A., 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;

Referências

- Boyson, J.E., Erskine, R., Whitman, M.C., Chiu, M., Lau, J.M., Koopman, L.A., Valter, M.M., Angelisova, P., Horejsi, V., Strominger, J.L., “*Disulfide bond-mediated dimerization of HLA-G on the cell surface*”, Proc Natl Acad Sci U S A., **99**:16180-16185, 2002;
- Brot, N., Weissbach, H., “*Peptide Methionine Sulfoxide Reductase: Biochemistry and Physiological Role*”, Biopolymers (Peptide Science), **55**:288–296, 2000;
- Bryk, R., Griffin, P., Nathan, C., “*Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins*”, Nature, **407**: 211–215, 2000;
- Carlier, M. F., “*Control of actin dynamics*”, Current Opinion in Cell Biology, **10**:45-51, 1998;
- Castro, L., Freeman, B.A., “*Reactive oxygen species in human health and disease*”, Nutrition, **17**:161-165, 2001;
- Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Gagliano N, Di Simplicio P, Colombo R, Milzani A, “*Methionine oxidation as a major cause of the functional impairment of oxidized actin*”, Free Radic Biol Med., **32**:927-937, 2002;
- Dalle-Donne I, Milzani A, Colombo R, “*The tert-butyl hydroperoxide-induced oxidation of actin Cys-374 is coupled with structural changes in distant regions of the protein*”, Biochemistry, **38**:12471-12480, 2002;
- Denicola, A., Radi, R., “*Peroxynitrite and drug-dependent toxicity*”, Toxicology, **208**:273–288, 2005;
- Dorinda Silva, “*Relatório de estágio: Efeito do peroxinitrito nos resíduos de actina e na sua polimerização*”, 2006;

Referências

- Elzinga, M., Collins, J. H. W., Kuehl, M. e Adelstein, R., “*Complete Amino-Acid Sequence of Actin of Rabbit Skeletal Muscle*”, Proc. Nat. Acad. Sci., **70**: 2687-2691, 1973;
- Farrell, A.J., Blake, D. R., “*Nitric oxide*”, Annals of the Rheumatic Diseases, **55**: 7-20, 1996;
- Furchgott, R., Zawadzki, J., “*The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*” Nature, **288**:373-376, 1980;
- Ghezzi, P., “*Regulation of protein function by glutathionylation*”, Free Radical Research, **39**:573–580, 2005;
- Goldstein, S., Czapski, G., “*The reaction of NO with O₂^{•-} and HO₂^{•-}: A pulse radiolysis study*”, Free Radical Biology and Medicine, **19**:505-510, 1995;
- Haarmann, C.S., Fink, R.H., Dulhunty, A.F., “*Oxidation and reduction of pig skeletal muscle ryanodine receptors*”, Biophys J., **77**:3010-3022, 1999;
- Hinshaw DB, Burger JM, Beals TF, Armstrong BC, Hyslop PA, “*Actin polymerization in cellular oxidant injury*”, Arch Biochem Biophys, **6**: 288-311, 1991;
- Hogg, N., Kalyanaraman, B., “*Nitric oxide and lipid peroxidation*”, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, **1411**:378-384, 1999;
- Huie, R.E., Padmaja, S., “*The reaction of no with superoxide*”, Free Radic. Res. Commun., **18**:195-199, 1993;
- Ischiropoulos, H., Beckman, J.S., “*Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association?*”, J Clin Invest., **111**:163-169, 2003;
- Jacob, C., Holme, A.L., Fry, F.H., “*The sulfinic acid switch in proteins*”, Org. Biomol. Chem., **14**:1953-1956, 2004;

Referências

- Jeong, W., Park, S.J., Chang, T.S., Lee, D.Y., Rhee, S.G., “*Molecular mechanism of the reduction of cysteine sulfinic acid of peroxiredoxin to cysteine by mammalian sulfiredoxin*”, J Biol Chem., **281**:14400-14407, 2006;
- Kirsch, M., Groot, H., “*Reaction of peroxynitrite with reduced nicotinamide nucleotides, the formation of hydrogen peroxide*”, J. Biol. Chem., **274**:24664–24670, 1999;
- Kim, E., Reisler, E., “*Intermolecular coupling between loop 38-52 and the C-terminus in actin filaments*”, Biophys J., **71**:1914-1919, 1996;
- Kissner, R., 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;
- Koppenol, W.H., Moreno, J.J., Pryor, W.A., Ischiropoulos, H., Beckman, J.S. “*Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide*”, Chem Res Toxicol., **5**:834-42, 1992;
- Leeuwenburgh, C., Hardy, M.M., Hazen, S.L., Wagner, P., Oh-ishi, S., Steinbrecher U.P., Heinecke, J.W., “*Reactive nitrogen intermediates promote low density lipoprotein oxidation in human atherosclerotic intima*”, J Biol Chem., **272**:1433-1436; 1997;
- Levine, R.L., Mosoni, L., Berlett, B.S., Stadtman, E.R., “*Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins*” Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**:15036–15040, 1996;
- Liu, F., Wang, D., Stracher, A., “*The accessibility of thiol groups on G-and F-actin of rabbit muscle*”, Biochemistry Journal, **266**:453-459, 1990;

Referências

- Makioka, A., Kumagai, M., Ohtomo, H., Kobayashi, S., Takeuchi, T., "Effect of cytochalasin D on the growth, encystation, and multinucleation of *Entamoeba invadens*" Parasitol Res., **86**: 599-602, 2000;
- Martin-Romero, F.J., Gutiérrez-Martin, Y., Henao, F., Gutiérrez-Merino, C., "Fluorescence Measurements of Steady State Peroxynitrite Production Upon SIN-1 Decomposition: NADH Versus Dihydrodichlorofluorescein and Dihydrorhodamine 123", Journal of Fluorescence, **14**:17-23, 2004;
- Millonig, R., Salvo, H., Aebi, U., "Probing actin polymerization by intermolecular cross-linking", J Cell Biol., **106**:785-796, 1998;
- Milzani, A., Dalle-Donne, I., Colombo, R., "Prolonged oxidative stress on actin", Arch Biochem Biophys., **339**:267-274, 1997;
- Mornet, D., Ue, K., "Proteolysis and structure of skeletal muscle actin", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **81**:3680-3684, 1984
- Orlova, A., Egelman, E.H., "Structural dynamics of F-actin: I. Changes in the C terminus", J Mol Biol., **245**:582-597, 1995;
- Pardee, J.D., Spudich, J.A., "Purification of muscle actin", Methods Enzymol., **85**:164-181, 1982;
- Pacher, P., Beckman, J.S., Liaudet, L., "Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease", Physiol Rev., **87**:315-424, 2007;
- Petropoulos, I., Friguet, B., "Maintenance of proteins and aging: the role of oxidized protein repair", Free Radic Res., **40**:1269-1276, 2006;
- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., Freeman, B.A., "Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide", Arch Biochem Biophys., **288**:481-487, 1991;

Referências

- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., Freeman. B.A., “Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide”, J Biol Chem., **266**:4244-4250, 1991;
- Robyt, J. F. e White, B. J.; “*Biochemical thecniques 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., Park, C.S., “*Flavin-containing monooxygenase activity can be inhibited by nitric oxide-mediated S-nitrosylation*”, Life Sci., **75**:2559-7252, 2004;
- Santos, C.X., Anjos, E.I., Augusto, O., “*Uric acid oxidation by peroxynitrite: multiple reactions, free radical formation, and amplification of lipid oxidation*”, Arch Biochem Biophys., **372**:285-294, 1999;
- Scandalios, J.G., “Oxidative stress responses – what have genome-scale studies taught us?”, Genome Biology. **3**:10191–10196, 2002;(A)
- Scandalios, J.G., “*The rise of ROS*”, Trends in Biochemical Sciences, 27:483-486, 2002; (B)
- Scandalios, J.G., “*Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses*”, Brazilian Journal of Medical and Biological Research. **38**: 995-1014, 2005;
- Schöpfer, F., Riobó, N., Carreras, M.C., Alvarez, B., Radi, R., Boveris, A., Cadenas, E., Poderoso, J.J., “*Oxidation of ubiquinol by peroxynitrite: implications for protection of mitochondria against nitrosative damage*”, Biochem J., **349**:35-42, 2000;
- Sheterline, P., Clayton, J. e Sparrow, J. C.,”*Protein Profile Actin*”, 4th ediction, Oxford university press, 1998;
- Shu, W. P.; Wang, D., Stracher, A., “*Chemical evidence of tha existence of activated G-actin*”, Biochemistry Journal, **283**:567-573, 1992;

Referências

- Sies, H., Sharov, V.S., Klotz, L.O., Briviba, K., “Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase”, J Biol Chem, **272**: 27812–27817, 1997;
- Singh, R.J., Hogg, N., Joseph, J., Konorev, E., Kalyanaraman, B.; “*The Peroxynitrite Generator, SIN-1, Becomes a Nitric Oxide Donor in the Presence of Electron Acceptors*”, Biochemistry and Biophysics, **361**:331–339, 1999;
- Smith, K.J., Kapoor, R., Felts, P.A. “*Demyelination: the role of reactive oxygen and nitrogen species*”, Brain Pathol., **9**:69-92, 1999;
- Song, H., Bao, S., Ramanadham, S., Turk, J., “*Effects of biological oxidants on the catalytic activity and structure of group VIA phospholipase A2*”, Biochemistry, **45**:6392-6406, 2006;
- Stryer, L., Berg, J. e Tymoczko, J., “*Biochemistry*”, 5th edition, W. H. Freeman and Company, 2002;
- Susana Ramos, “Relatório de estágio: Efeito do anião peroxinitrito na função e na estrutura da actina de músculo esquelético de coelho”, 2005;
- Szabó, C., Ischiropoulos, H., Radi, R., “*Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics*”, Nat. Rev. Drug. Discov., **6**:662-80, 2007;
- Tang, J.X., Janmey, P.A., Stossel, T.P., Ito, T., “*Thiol Oxidation of Actin Produces Dimers That Enhance the Elasticity of the F-Actin Network*”, Biophysical Journal, **76**:2208–2215, 1999;
- Tsang, L., Kong, J.A., Ding, K.H, “*Scattering of Electromagnetic Waves: Theories and Applications*”, John Wiley & Sons, 2000;

Referências

- Tiago T, Ramos S, Aureliano M, Gutiérrez-Merino C., “*Peroxynitrite induces F-actin depolymerization and blockade of myosin ATPase stimulation*”, BBRC, **342**: 44-49, 2006;
- van der Wijk, T., Overvoorde, J., den Hertog, J., “*H₂O₂-induced intermolecular disulfide bond formation between receptor protein-tyrosine phosphatases*”, J Biol Chem., **279**:44355-44361, 2004;
- Voet, D. e Voet, J. G., “*Biochemistry*”, 2nd edition, John Wiley and Sons, Inc. 2005
- Vogt, W., “*Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal*”, Free Radical Biology & Medicine, **18**:93-105, 1995;
- Wang, F.; Sampogna, R. V.; Ware, B. R.; “*pH dependence of actin self-assembly*”, Biophysical Journal, **55**:293-298, 1989;
- Wegner, A., “*Head to tail polymerization of actin*”, J Mol Biol, **108**:139-150, 1976;
- Weissbach, H., Etienne, F., Hoshi, T., Heinemann, S.H., Lowther, W.T., Matthews, B., John, G.S., Nathan, C., Brot, N., “*Peptide Methionine Sulfoxide Reductase: Structure, Mechanism of Action, and Biological Function*”, Archives of Biochemistry and Biophysics, **397**:172–178, 2002;
- Wilson, K. e Walker, J., “*Principles and techniques of biochemistry and molecular biology*”, 6th edition, Cambridge university press, 2005;
- Wringger, W. e Schulten, K., “*Stability and dynamics of G-actin: back-door water diffusion and behaviour of subdomain ¾ loop*”, Biophysical Journal, **73**:624-639, 1997;
- Ying, J., Clavreul, N., Sethuraman, M., Adachi, T., Cohen, R.A., “*Thiol oxidation in signaling and response to stress: Detection and quantification of*

Referências

physiological and pathophysiological thiol modifications Free”, Radical Biology & Medicine, **43**:1099–1108, 2007;

- www.dqb.fc.ul.pt/docentes/fantunes/stress1.gif.