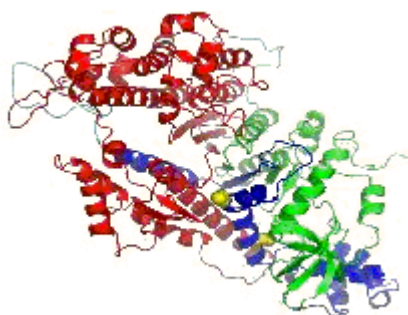


Universidade do Algarve  
Faculdade de Ciências e Tecnologia



# **Susceptibilidade do Subfragmento-1 de Miosina de Músculo Esquelético de Coelho ao Peroxinitrito**



**Sónia Daniel Glória Simão**

Relatório de estágio de Licenciatura em Bioquímica

Orientador:  
Prof. Doutor Manuel Aureliano Alves

Dezembro 2004

“Não é um notável talento o que se exige para assegurar o êxito em qualquer empreendimento, mas sim um firme propósito.”

(Thomas W. Atkinson, 1799 – 1861)

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Doutor Manuel Aureliano Alves, pela oportunidade que me concedeu em realizar o estágio sob a sua orientação, pela sua sempre disponibilidade, conhecimentos e conselhos transmitidos.

Um agradecimento muito especial à Dr.<sup>a</sup> Teresa Tiago, pela sua disponibilidade para me co-orientar, pela amizade e por todos os conhecimentos e conselhos que me transmitiu. Um sincero Obrigado!

Ao Prof. Doutor Carlos Gutiérrez-Merino e ao Prof. Doutor Francisco Javier Martín-Romero, da Universidade da Extremadura (Badajoz) por todo o contributo prestado para a realização deste trabalho.

À Doutora Denise Martins, da Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais, pela sua disponibilidade e ajuda na utilização da Ultracentrifuga.

Aos meus colegas de laboratório, Andrea, Sara e Ricardo, pela companhia, ajuda e bom ambiente de trabalho proporcionado.

Às minhas colegas e amigas, Catarina e Cláudia, pela amizade, paciência e pelos bons momentos que passámos juntas.

Ao Tiago, por todo o seu amor, paciência, compreensão e importante incentivo que me deu nos dias menos bons.

Aos meus pais, pelo esforço que despenderam para tornar possível a realização deste meu curso. Obrigado também pelo apoio, incentivo e conselhos que sempre me transmitiram.

À minha irmã Carolina, pelo seu apoio, paciência e sempre disponibilidade para ouvir as minhas “histórias fantásticas”.

À minha avó Clarinda, pela preocupação, carinho e amor que teve sempre para comigo. Obrigada também por esperar sempre por mim.

À minha avó Rosa, pela preocupação, amizade e orações.

Àqueles que já cá não estão mas que olham por mim. A realização deste curso é lhes dedicada.

## Resumo

Foi já demonstrado que, em disfunções cardíacas, o compartimento miofibrilar é um local de formação de peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) e consequente nitrosilação das proteínas miofibrilares. Existe muito pouca informação, *in vitro*, acerca dos mecanismos pelos quais as proteínas miofibrilares são afectadas por esta espécie. Por este motivo, neste trabalho determinou-se a susceptibilidade do subfragmento-1 (S1) de miosina de músculo esquelético de coelho a uma exposição aguda e crónica, *in vitro*, à espécie  $\text{ONOO}^-$ , produzida sinteticamente ou por decomposição de SIN-1, um composto que liberta simultaneamente as espécies  $\cdot\text{O}_2^-$  e  $\text{NO}\cdot$ , que ao reagirem entre si formam o  $\text{ONOO}^-$ . Os efeitos no S1 foram determinados medindo a actividade  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase estimulada por F-actina, as actividades não-fisiológicas,  $\text{Ca}^{2+}$ - e  $\text{K}^+$ /EDTA-ATPase bem como a oxidação de cisteínas e nitrosilação de tirosinas. Testou-se ainda o ascorbato, GSH e NADH na protecção contra o  $\text{ONOO}^-$ . Observou-se que a exposição crónica é mais eficiente que a exposição aguda e origina uma inibição da  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase estimulada por F-actina na ordem dos 50% com  $31,0 \pm 5,0 \mu\text{M}$  SIN-1 para  $8,7 \mu\text{M}$  de S1. A  $\text{Ca}^{2+}$ - e  $\text{K}^+$ /EDTA-ATPase foram também inibidas com valores de  $\text{IC}_{50}$  semelhantes indicando que a oxidação dos grupos  $-\text{SH}$  reactivos de S1 contribui para o mecanismo de inibição da proteína. A nitrosilação de S1 ocorre no domínio de 25 kDa embora seja improvável que contribua para o mecanismo de inibição, uma vez que há menos de 0,1 resíduos de tirosina nitrosilados por mol de S1 para concentrações de SIN-1 que inibem 70% da actividade fisiológica da proteína. Os antioxidantes foram eficientes elevando a actividade da  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase estimulada por F-actina em 70-100%. Os estudos permitiram concluir que o S1 de miosina de músculo esquelético de coelho é sensível a concentrações fisiologicamente relevantes de  $\text{ONOO}^-$ , mas os efeitos desta espécie apenas se manifestarão em condições pato-fisiológicas nas quais exista deficiência de antioxidantes intracelulares.

## Abstract

It has been shown that the myofibrillar compartment is a predominant site of peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) formation and attendant myofibrillar protein nitration in cardiac dysfunction. *In vitro* little is known about the basic mechanisms by which myofibrillar proteins are damaged by this species. For this reason in this study it was quantified the susceptibility of myosin-subfragment-1 (S1) from rabbit skeletal muscle to *in vitro* acute and chronic exposure to  $\text{ONOO}^-$ , chemically synthesized or generated through SIN-1, a compound that simultaneously releases the species  $\cdot\text{O}_2^-$  and  $\text{NO}\cdot$  which react each other to produce  $\text{ONOO}^-$ . The effects on S1 were analysed by measuring the F-actin-stimulated  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity,  $\text{Ca}^{2+}$ - and  $\text{K}^+$ /EDTA-ATPase activities as well as cystein oxidation and the extent of tyrosine nitration. It was also tested ascorbate, GSH and NADH against  $\text{ONOO}^-$  effects. It was observed that chronic exposure is more efficient than acute exposure and inhibits 50% of F-actin-stimulated  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity with  $31,0 \pm 5,0 \mu\text{M}$  SIN-1 for  $8,7 \mu\text{M}$  de S1. Both  $\text{Ca}^{2+}$ - and  $\text{K}^+$ /EDTA-ATPase were also inhibited with close  $\text{IC}_{50}$  indicating that S1 -SH groups oxidation contribute to the mechanism of protein inhibition. S1 nitration occurs at the 25 kDa domain although it seems do not contribute to inhibition mechanism since there is less than 0,1 tyrosine residues nitrate per mol of S1 for SIN-1 concentrations that inhibit 70% of the S1 physiological activity. The antioxidants were efficient enhancing F-actin-stimulated  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase up to 70-100%. It was concluded that rabbit skeletal muscle myosin-S1 is sensitive to physiologically relevant concentrations of peroxynitrite, but  $\text{ONOO}^-$  effects will only efficiently take place under pathophysiological conditions in which exists depletion of intracellular  $\text{ONOO}^-$ -scavengers.

## Comunicações em congressos

Parte dos resultados descritos neste trabalho foram apresentados em congressos nacionais e internacionais sob a forma de painel e comunicação oral:

### Comunicações orais

- ◆ Tiago, T., Simão, S., Aureliano, M., Martín-Romero, F. J., Gutiérrez-Merino, C. **Inhibition of Skeletal Muscle S1-Myosin ATPase Activity by the Peroxynitrite-Releasing Agent SIN-1**, 2<sup>nd</sup> Spanish and Portuguese Congress on Free Radicals, 25 Novembro 2004, Leioa-Bizkaia, Spain (Anexo I).

### Comunicações em painel

- ◆ Simão, S., Tiago, T., Aureliano, M., Gutiérrez-Merino, C. **Free-Radical Mediated Effects on Myosin and Actin from Skeletal Muscle**, 1<sup>st</sup> Luso-Spanish Congress on Free Radicals, 6<sup>th</sup> Portuguese Congress on Free Radicals in Chemistry, Biology and Medicine, 4 Dezembro 2003, Coimbra, Portugal (Anexo II).
- ◆ Simão, S., Tiago, T., Gutiérrez-Merino, C.; Martín-Romero, F. J., Aureliano, M. **Skeletal Muscle Myosin-S1 Susceptibility to Peroxynitrite**, XIV Congresso Nacional de Bioquímica, 2 Dezembro 2004, Vilamoura, Portugal (Anexo III).

## Abreviaturas

|                              |  |
|------------------------------|--|
| ADP                          | Adenosina 5'-difosfato                                     |
| ATP                          | Adenosina 5'-trifosfato                                    |
| BSA                          | Albumina de soro bovino                                    |
| CAT                          | Catalase   |
| DTNB                         | 5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzóico)                       |
| EDTA                         | Ácido etilenodiaminotetracético                            |
| ELC                          | Cadeia leve essencial de miosina                           |
| GSH                          | Glutaciona reduzida  |
| HC                           | Cadeia pesada de miosina                                   |
| Hepes                        | Ácido(N-2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etano sulfónico      |
| HMM                          | Meromiosina pesada   |
| HO·                          | Radical hidroxilo  |
| IC <sub>50</sub>             | Concentração de inibidor que inibe 50%                     |
| LDH                          | Lactato desidrogenase                                      |
| LMM                          | Meromiosina leve   |
| kDa                          | kiloDalton   |
| MM                           | Marcador molecular   |
| NAD <sup>+</sup>             | Nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada)          |
| NADH                         | Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reduzida)         |
| NADP <sup>+</sup>            | Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)  |
| NADPH                        | Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reduzida) |
| NO·                          | Radical óxido nítrico                                      |
| NOS                          | Óxido nítrico sintetase                                    |
| ·O <sub>2</sub> <sup>-</sup> | Radical anião superóxido                                   |

|                   |  |
|-------------------|--|
| ONOO <sup>-</sup> | Peroxinitrito                                  |
| PBS               | Tampão fosfato salino                          |
| PBS-T             | Tampão fosfato salino com Tween                |
| PEP               | Fosfoenolpiruvato                              |
| Pi                | Fosfato inorgânico                             |
| PK                | Piruvato cinase                                |
| PMSF              | Fluoreto de fenil metil sulfonil               |
| RLC               | Cadeia leve regulatória de miosina             |
| ROS               | Espécies reactivas de oxigénio                 |
| RNS               | Espécies reactivas de nitrogénio               |
| S1                | Subfragmento -1 de miosina                     |
| S2                | Subfragmento -2 de miosina                     |
| SDS               | Dodecilo sulfato de sódio                      |
| SDS-PAGE          | Electroforese em gel de poliacrilamida com SDS |
| SIN-1             | “3-Morpholinosydnonimine”                      |
| SOD               | Dismutase de superóxido                        |
| TCA               | Ácido tricloro acético                         |
| TEMED             | N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina             |
| Tris              | 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol         |

## Índice

|  |      |
|--|------|
| Agradecimentos                                 | III  |
| Resumo   | V    |
| Abstract                                       | VI   |
| Comunicações em congressos                     | VII  |
| Abreviaturas                                   | VIII |
| 1. Introdução                                  | 1    |
| 1.1. Stresse oxidativo                         | 1    |
| 1.1.1. Espécies reactivas de oxigénio (ROS)    | 1    |
| 1.1.1.1. Produção de ROS                       | 2    |
| 1.1.1.2. Fontes de ROS                         | 3    |
| 1.1.2. Espécies reactivas de nitrogénio (RNS)  | 4    |
| 1.1.2.1. Peroxinitrito                         | 5    |
| 1.1.3. Alvo das espécies reactivas             | 7    |
| 1.1.4. Doenças associadas ao stresse oxidativo | 7    |
| 1.1.5. Agentes antioxidantes                   | 8    |
| 1.1.5.1. Antioxidantes enzimáticos             | 9    |
| 1.1.5.2. Antioxidantes não-enzimáticos         | 10   |
| 1.2. Músculo esquelético                       | 13   |
| 1.2.1. Estrutura do sistema contráctil         | 14   |
| 1.2.1.1. Miosina                               | 15   |
| 1.2.1.2. Actina                                | 17   |
| 1.2.2. Mecanismo da contracção muscular        | 18   |
| 1.3. Stresse oxidativo no músculo              | 20   |

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 1.4.     | Objectivo  | 22 |
| 2.       | Materiais e Métodos  | 23 |
| 2.1.     | Material biológico   | 23 |
| 2.2.     | Reagentes  | 23 |
| 2.3.     | Isolamento e caracterização das proteínas                      | 24 |
| 2.3.1.   | Isolamento de miosina  | 24 |
| 2.3.1.1. | Preparação do subfragmento-1 de miosina (S1)                   | 26 |
| 2.3.2.   | Determinação da concentração de S1                             | 27 |
| 2.3.3.   | Isolamento de actina   | 28 |
| 2.3.3.1. | Preparação de “pó de acetona”                                  | 28 |
| 2.3.3.2. | Obtenção de F-actina a partir de “pó de acetona”               | 30 |
| 2.3.4.   | Análise do estado de pureza das proteínas isoladas             | 31 |
| 2.3.5.   | Medição da actividade enzimática de S1                         | 33 |
| 2.4.     | Tratamento de S1 com espécies oxidantes                        | 37 |
| 2.4.1.   | Preparação de espécies oxidantes                               | 37 |
| 2.4.1.1. | Preparação de peroxinitrito sintético                          | 37 |
| 2.4.1.2. | Preparação e determinação da cinética de decomposição de SIN-1 | 38 |
| 2.4.1.3. | Preparação de peróxido de hidrogénio                           | 38 |
| 2.4.2.   | Tratamento de S1   | 38 |
| 2.4.2.1. | Tratamento de S1 com peroxinitrito sintético                   | 39 |
| 2.4.2.2. | Tratamento de S1 com o composto SIN-1                          | 39 |
| 2.4.2.3. | Tratamento de S1 com peróxido de hidrogénio                    | 40 |

|   |    |
|---|----|
| 2.4.3. Protecção com agentes antioxidantes                                | 40 |
| 2.5. Quantificação de 3-nitrotirosina                                     | 41 |
| 2.6. Tripsinização de S1  | 41 |
| 2.7. Imunodeteção de 3-nitrotirosina                                      | 42 |
| 2.8. Quantificação de cisteínas reduzidas                                 | 44 |
| 3. Resultados e Discussão   | 45 |
| 3.1. Isolamento e caracterização das proteínas                            | 45 |
| 3.1.1. Determinação da concentração das proteínas                         | 45 |
| 3.1.2. Análise do estado de pureza das proteínas isoladas                 | 45 |
| 3.1.3. Análise da actividade enzimática de S1                             | 47 |
| 3.2. Tratamento de S1 com espécies oxidantes                              | 50 |
| 3.2.1. Tratamento de S1 com peroxinitrito sintético                       | 50 |
| 3.2.1.1. Efeito de $\text{ONOO}^-$ nas actividades ATPásicas de S1        | 50 |
| 3.2.1.2. Efeito de $\text{ONOO}^-$ na nitrosilação                        | 52 |
| 3.2.1.3. Efeito do tampão fosfato no tratamento de S1 com $\text{ONOO}^-$ | 56 |
| 3.2.1.4. Efeito de bicarbonato no tratamento de S1 com $\text{ONOO}^-$    | 57 |
| 3.2.2. Tratamento de S1 com SIN-1   | 58 |
| 3.2.2.1. Cinética de decomposição do composto SIN-1                       | 58 |
| 3.2.2.2. Efeito de SIN-1 nas actividades ATPásicas de S1                  | 60 |
| 3.2.2.3. Efeito de SIN-1 na nitrosilação de S1                            | 63 |

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 3.2.2.4. | Efeito do NO <sup>-</sup> na actividade da Mg <sup>2+</sup> -ATPase<br>estimulada por F-actina | 64 |
| 3.2.2.5. | Efeito dos produtos de decomposição de SIN-1   | 64 |
| 3.2.2.6. | Tratamento de S1 com peróxido de hidrogénio  | 65 |
| 3.3.     | Protecção com agentes antioxidantes  | 69 |
| 4.       | Conclusões   | 72 |
| 5.       | Estudos futuros  | 74 |
| 6.       | Bibliografia   | 75 |
|          | Anexos   | 81 |

# **1. Introdução**

## **1.1. Stresse oxidativo**

O stresse oxidativo ocorre como consequência da alteração do equilíbrio entre a produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e/ou espécies reactivas de nitrogénio (RNS) e processos antioxidantes, favorecendo a produção das espécies reactivas (Dringen, 2000). Embora estas espécies oxidantes sejam tradicionalmente vistas como altamente reactivas e destrutivas, elas podem ser, surpreendentemente, selectivas e atacar preferencialmente locais específicos de macromoléculas (proteínas, lípidos e ácidos nucleicos) (Ischiropoulos e Beckman, 2003). Existe uma grande variedade de fontes intracelulares de espécies reactivas, por exemplo, os citocromos P450 e o sistema de transporte electrónico (Schulz et al., 2000). A produção de ROS em células normais está sob um firme controlo homeostático. Para ajudar a detoxificar as espécies reactivas, enzimas e compostos antioxidantes, são capazes de reagir com a maioria destas espécies.

### **1.1.1. Espécies reactivas de oxigénio (ROS)**

O facto das biomoléculas, constituídas primeiramente por carbono, hidrogénio, oxigénio, azoto e enxofre, poderem ser quebradas pela presença de oxigénio é um paradoxo evolucionário para a vida aeróbia. (Gutteridge e Halliwell, 2000). Esta forma de vida oferece grandes vantagens, mas está também repleta de alguns perigos. No processo de redução de uma molécula de oxigénio a água está envolvida a formação de vários intermediários: radical

anião superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e radical hidroxilo ( $\text{HO}\cdot$ ) (Fridovich, 1978). A estas espécies atribui-se o nome de espécies reactivas de oxigénio. Esta designação descreve uma variedade de moléculas e radicais livres derivados do oxigénio molecular. Na verdade estes são apenas alguns exemplos de ROS pois nos sistemas biológicos existe uma grande variedade destas espécies. Estas diferem entre si no que diz respeito ao seu local de origem, função fisiológica, reactividade e tempo de meia vida (Schulz et al., 2000).

#### 1.1.1.1. Produção de ROS

O oxigénio molecular no estado fundamental contém dois electrões desemparelhados (estado tripleto). Uma vez que estes dois electrões possuem o mesmo spin, o oxigénio apenas pode reagir com um electrão de cada vez, tornando-se assim uma molécula não muito reactiva. Por outro lado, se um dos dois electrões desemparelhados for excitado e mudar de spin, a espécie resultante torna-se num poderoso oxidante, visto os dois electrões de spins opostos puderem reagir rapidamente com outros pares de electrões (Turrens, 2003). O radical anião superóxido, o produto de redução de um electrão do oxigénio, é o precursor da maioria das ROS. A dismutação deste radical, quer espontaneamente ou através da reacção catalisada por dismutases de superóxido (SOD), produz a espécie  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Por sua vez, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode ser totalmente reduzido a água ou parcialmente reduzido a  $\text{HO}\cdot$ , um dos oxidantes mais poderosos na natureza. A formação deste radical é catalisada por metais de transição reduzidos, uma reacção conhecida como reacções de Fenton (Liochev e Fridovich, 1999).

### 1.1.1.2. Fontes de ROS

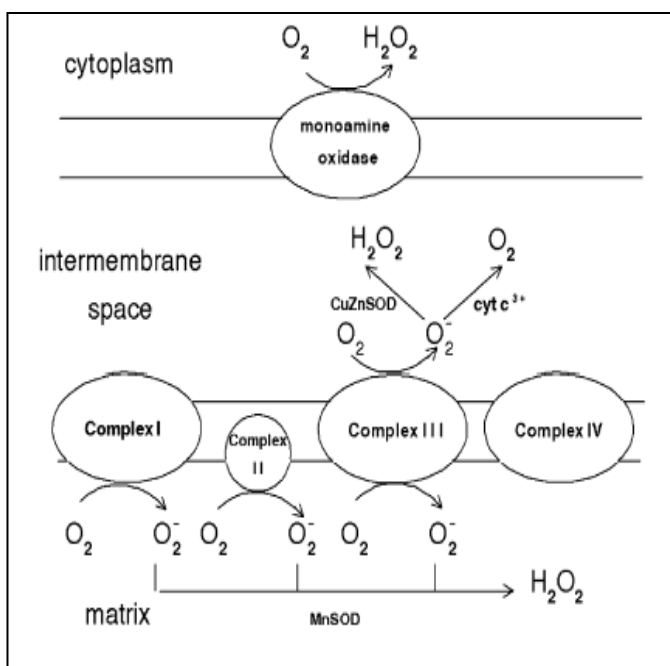
*In vivo*, o radical anião superóxido é produzido quer enzimaticamente quer não-enzimaticamente. As fontes enzimáticas incluem as NADPH oxidases, células endoteliais (Babior, 2000; Vignais, 2002) e citocromos P450 (Coon et al., 1992). A conversão da xantina desidrogenase em xantina oxidase constitui outra fonte enzimática de  $\cdot\text{O}_2^-$  bem como de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sendo assim também fonte de  $\text{HO}\cdot$  (Yokoyama et al., 1990). Outros exemplos de fontes de ROS encontram-se na tabela 1.1.

**Tabela 1.1.** Fontes celulares de ROS e sua localização celular (Kunsch, 1999).

| Fonte celular   | Localização celular     |
|---|-------------------------|
| Lipo-oxigenases   | Membrana plasmática     |
| Ciclo-oxigenases  | Membrana plasmática     |
| NADPH oxidases  | Membrana plasmática     |
| Sistema de transporte electrónico                                 | Mitocôndria             |
| Xantina oxidases  | Citosol                 |
| Hemoglobina   | Citosol                 |
| Catecolaminas   | Citosol                 |
| Riboflavina   | Citosol                 |
| Metais de transição ( $\text{Fe}^{2+/3+}$ , $\text{Cu}^{1+/2+}$ ) | Citosol                 |
| Oxidases  | Peroxisoma              |
| Flavoproteínas  | Peroxisoma              |
| Citocromos P450   | Retículo endoplasmático |

A produção não-enzimática de  $\cdot\text{O}_2^-$  ocorre quando um electrão é directamente transferido para o oxigénio através de coenzimas reduzidas ou grupos prostéticos. A cadeia transportadora mitocondrial contém vários centros redox que podem ceder electrões ao oxigénio (Fig. 1.1.), constituindo deste modo uma fonte primária de  $\cdot\text{O}_2^-$  na maioria dos tecidos (Turrens, 2003). De facto, embora a maioria dos electrões seja transferida com sucesso através da

cadeia transportadora, é estimado que mais de 10% dos equivalentes redutores do NADH se “percam” para formar  $\cdot\text{O}_2^-$  (Floyd et al., 2001).



**Figura 1.1.** Locais de formação do radical anião superóxido na cadeia transportadora mitocondrial (Turrens, 2003).

Outra fonte de espécies reactivas são as células fagocitárias. Este tipo de células ataca os agentes patogénicos com uma mistura de oxidantes, incluindo  $\cdot\text{O}_2^-$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Beckman e Ames, 1998).

Estudos mostram ainda que a exposição de animais ou células a radiações ultravioleta, fumo de tabaco, ozono, bem como deficiência em magnésio ou exercício forçado induzem um aumento do nível de proteínas oxidadas (Berlett e Stadtman, 1997).

### 1.1.2. Espécies reactivas de nitrogénio (RNS)

As espécies oxidantes que derivam do radical óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ) designam-se de espécies reactivas de nitrogénio. O óxido nítrico resulta da conversão da arginina em citrulina, numa reacção catalisada por uma família de enzimas dependentes de NADPH designadas de óxido nítrico sintetases

(NOS) (Turrens, 2003). O NO $\cdot$  tem sido descrito por um lado, como um “mensageiro” intracelular e por outro, como uma molécula tóxica. A produção de NO $\cdot$  ocorre numa variedade de células, incluindo, células endoteliais, macrófagos e células do músculo liso (Kunsch, 1999). Dependendo do ambiente envolvente, o NO $\cdot$  pode ser convertido em várias outras RNS como, anião nitroxilo (NO $^-$ ) ou peroxinitrito (ONOO $^-$ ) (Stamler et al., 1992).

#### 1.1.2.1. Peroxinitrito

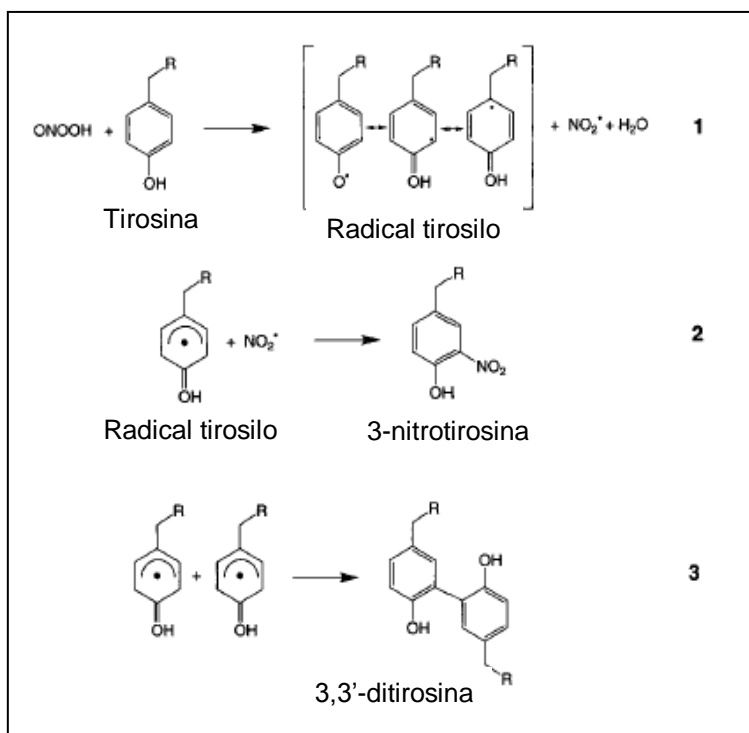
Com a descoberta de que o radical óxido nítrico é um produto do metabolismo da arginina e que reage rapidamente com o radical anião superóxido para formar a espécie peroxinitrito (eq. 1), os efeitos biológicos desta espécie oxidante têm sido extensivamente estudados (Hunter, 1995). Esta espécie extremamente tóxica decompõe-se rapidamente em HO $\cdot$  e NO $_2$  (Voet, 1995).



O peroxinitrito não é um radical livre pois os electrões desemparelhados do radical óxido nítrico e do radical anião superóxido estão combinados formando uma nova ligação no peroxinitrito (Beckman et al., 1994).

O peroxinitrito ou os seus derivados podem ser tóxicos ao reagirem com várias moléculas biológicas (Ischiropoulos e Beckman, 2003). No caso particular das proteínas, os resíduos de cisteína e metionina são particularmente vulneráveis a oxidação pela espécie ONOO $^-$ . Por outro lado, os resíduos de tirosina e triptofano são alvos selectivos de nitrosilação por parte

desta mesma espécie. A nitrosilação de resíduos de tirosina tem especial importância uma vez que impede a capacidade que estes resíduos possuem para se converterem ciclicamente em formas fosforiladas e não fosforiladas (Hunter, 1995). A nitrosilação de resíduos de tirosina é um processo irreversível levando a uma conformação da enzima relativamente inactiva. A capacidade desta espécie oxidante para nitrosilar resíduos de tirosina e oxidar resíduos de metionina de proteínas é dependente da disponibilidade de  $\text{CO}_2$ . Na ausência de  $\text{CO}_2$ , o  $\text{ONOO}^-$  está em equilíbrio com uma forma activada (de estrutura desconhecida) que reage rapidamente com os resíduos de metionina. Na presença de  $\text{CO}_2$ , o  $\text{ONOO}^-$  é praticamente convertido instantaneamente num derivado (possivelmente  $\text{O}=\text{NOOCO}_2^-$  ou  $\text{O}_2\text{NOCO}_2^-$ ) capaz de nitrosilar compostos aromáticos. Assim, a nitrosilação de resíduos de tirosina e a oxidação de resíduos de metionina de proteínas são processos exclusivos e regulados de modo diferente pela disponibilidade de  $\text{CO}_2$  (Berlett e Stadtman, 1997). O reconhecimento recente de que a nitrosilação de resíduos de tirosina ocorre *in vivo* e representa um marcador de RNS, levou um vasto número de investigadores a analisar a formação de 3-nitrotirosina em proteínas de vários tecidos (Vliet, 1999). A formação de 3-nitrotirosina ocorre aquando da reacção espontânea do  $\text{ONOO}^-$  com proteínas resultando na nitrosilação da posição *orto* do resíduo de tirosina (Fig.1.2.) (Ischiropoulos e Beckman, 2003).



**Figura 1.2.** Mecanismo de reacção de ONOO<sup>-</sup> com resíduos de tirosina. O ONOO<sup>-</sup> reage com os resíduos de tirosina através dum mecanismo de transferência de electrões formando-se os radicais tirosilo e dióxido de nitrogénio (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) (reacção 1). A consequente combinação destes radicais origina 3-nitrotirosina e 3,3'-ditirosina (reacção 2 e 3) (Vliet, 1999).

### 1.1.3. Alvos das espécies reactivas

As principais classes de macromoléculas biológicas, lípidos, ácidos nucleicos, proteínas e glícidos são susceptíveis de ataque por parte de espécies reactivas e existem evidências de que todas sofrem danos oxidativos *in vivo* (Halliwell e Gutteridge, 1989). A oxidação das proteínas não está tão bem caracterizada como está a oxidação das outras duas classes de macromoléculas biológicas, no entanto, vários danos foram já observados. Nomeadamente, verificaram-se alterações na função de proteínas, oxidação de grupos sulfidriilo, aumento da susceptibilidade ao ataque proteolítico, entre outros (Stadtman e Oliver, 1991).

### 1.1.4. Doenças associadas ao stresse oxidativo

A acumulação de proteínas oxidadas está associada com uma variedade de doenças, entre elas, distrofia muscular, artrite reumatóide, arteriosclerose e

diabetes (Berlett e Stadtman, 1997). Para além disso, numerosos estudos revelam a existência de um aumento de espécies reactivas de oxigénio em doenças neurodegenerativas, nomeadamente nas doença de Parkinson e Alzheimer, mas o mecanismo pelo qual os neurónios morrem sob condições de stresse oxidativo, permanece desconhecido. Através de exames *post mortem* a cérebros de pacientes com desordens neurodegenerativas, têm sido encontrados marcadores de stresse oxidativo. Contudo, ainda não está esclarecido se o stresse oxidativo está envolvido no desenvolvimento e/ou progressão destas doenças, ou se está meramente associado com o estado terminal da doença (Klein, 2003).

O envelhecimento está associado com a acumulação de enzimas pouco activas ou mesmo inactivas. A possibilidade de que estas alterações relacionadas com a idade são, em parte, devidas a modificações oxidativas é indicado pelos seguintes factos: a) exposição *in vitro* de enzimas a ROS leva a alterações na actividade, estabilidade térmica e susceptibilidade proteolítica, semelhantes àquelas que ocorrem durante o envelhecimento; b) proteínas de animais idosos são mais susceptíveis a danos durante condições de stresse oxidativo que as de animais jovens; c) existe um aumento na quantidade de carbonilos (marcador de stresse oxidativo) presentes nas proteínas de cérebro humano que está relacionado com a idade (Berlett e Stadtman, 1997).

#### 1.1.5. Agentes antioxidantes

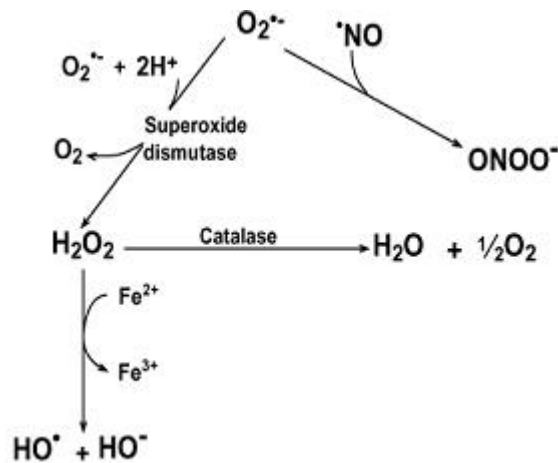
Um agente antioxidante pode ser definido como uma substância capaz de, em concentrações relativamente baixas, competir com substratos oxidáveis e assim, diminuir ou inibir significativamente a oxidação desses substratos

(Halliwell e Gutteridge, 1989). Esta definição apenas é válida para antioxidantes não-enzimáticos. Os antioxidantes controlam assim os níveis de ROS e RNS protegendo a célula em condições de stresse.

#### 1.1.5.1 Antioxidantes enzimáticos

Antioxidantes enzimáticos são, por exemplo, as dismutases de superóxido (SOD) e a catalase (CAT) (Fig. 1.3). A captura do radical anião superóxido é feita pelas enzimas SOD, a qual catalisa a dismutação do  $\cdot\text{O}_2^-$  em  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Esta reacção é 10 000 vezes mais rápida que a dismutação espontânea. Esta enzima está presente em todos os organismos aeróbios e em todos os compartimentos subcelulares susceptíveis de stresse oxidativo (Bowler et al., 1992). Existem três tipos de SOD, classificadas de acordo com o seu cofactor metálico. Assim, temos a FeSOD (cloroplastos, procariotas), MnSOD (procariotas e eucariotas) e Cu/ZnSOD (cloroplastos, procariotas). Recentemente foi descoberto um novo tipo de SOD com níquel no seu centro activo (Bannister et al., 1987).

Os níveis intracelulares de peróxido de hidrogénio são regulados por uma variedade de enzimas, sendo as mais importantes a catalase e as peroxidases. A catalase é um caso específico de peroxidase em que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  actua na reacção como oxidante e redutor. As peroxidases oxidam outros substratos orgânicos e inorgânicos. Estas enzimas estão vastamente distribuídas em bactérias, plantas e animais (Josephy, 1997).



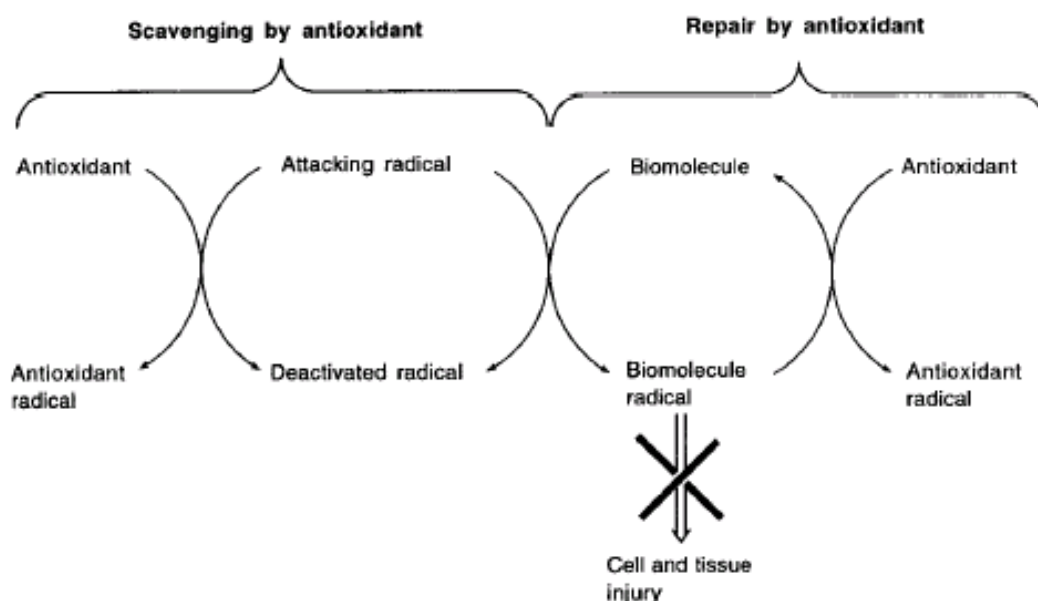
**Figura 1.3.** Reacções de formação de espécies reativas. Indicação das reacções catalisadas pela dismutase de superóxido e catalase.

#### 1.1.5.2. Antioxidantes não-enzimáticos

Os antioxidantes enzimáticos são complementados por pequenas moléculas antioxidantes (antioxidantes não-enzimáticos), alguns dos quais são adquiridos na dieta. Estes antioxidantes podem ser intra ou extracelulares e incluem, por exemplo, compostos como o ascorbato (vitamina C), os tocoferóis (vitamina E), a glutatona reduzida (GSH) e o NADH (Fig. 1.4) (Frei, 1999). As concentrações intracelulares destes compostos são substanciais, isto é, na ordem dos milimolar. Assim, para o ascorbato e GSH as suas concentrações intracelulares variam entre 0,5 – 10 mM e 5 – 10 mM, respectivamente (Kirsch et al., 2001), enquanto que para o NADH variam entre 0,1 – 1 mM (Sies, 1982).

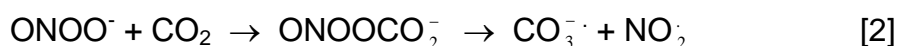


a molécula que resulta do ataque oxidativo (Fig. 1.5.) (Kirsch e De Groot, 2001).



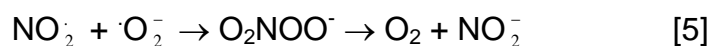
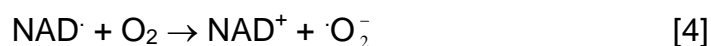
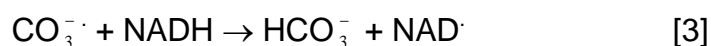
**Figura 1.5.** Acção de um “antioxidante que actua de modo directo” (Kirsch e De Groot, 2001).

O ascorbato e a GSH são capazes de reparar a molécula após ataque oxidativo mas apenas o ascorbato é capaz de capturar a espécie reactiva. O NADH está também descrito como “antioxidante que actua de modo directo”, nomeadamente na protecção contra o  $\text{ONOO}^-$ . Esta espécie, como já foi referido, é formada pela reacção do radical anião superóxido e do radical óxido nítrico. Em condições fisiológicas, o  $\text{ONOO}^-$  reage com  $\text{CO}_2$  (eq. 2) (Kirsch e De Groot, 2001).



Os dois radicais que se formam ( $\text{CO}_3^{\cdot-}$  e  $\text{NO}_2$ ) são responsáveis pelo poder destrutivo do  $\text{ONOO}^-$ . Estudos recentes *in vitro* mostram que quando o  $\text{ONOO}^-$

reage com NAD(P)H, este é capaz de inibir a reactividade de  $\text{CO}_3^{\cdot-}$  e  $\text{NO}_2^{\cdot}$ . Enquanto que o radical  $\text{CO}_3^{\cdot-}$  é directamente capturado pelo NADH (eq. 3), o  $\text{NO}_2^{\cdot}$  é, inesperadamente, desactivado pelo oxigénio, através da formação do radical anião superóxido e consequente formação de  $\text{O}_2\text{NOO}^-$ , que rapidamente se decompõe em  $\text{O}_2$  e  $\text{NO}_2^-$  (eq. 4 e 5) (Kirsch e De Groot, 2001):

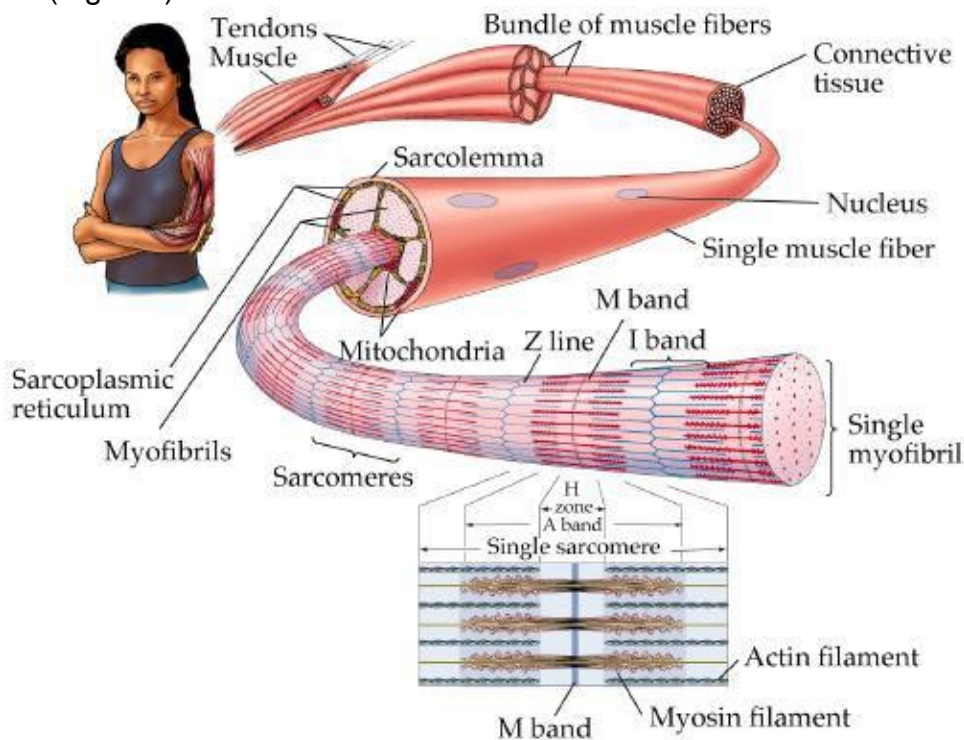


## 1.2. Músculo esquelético

Em termos morfo-fisiológicos os músculos caracterizam-se em estriados e lisos. Os músculos estriados podem ainda ser divididos em duas subclasses: músculo estriado esquelético (ou simplesmente músculo esquelético) e músculo estriado cardíaco (ou apenas músculo cardíaco). A designação pela qual são conhecidos os músculos esqueléticos advém da sua aparência microscópica, na qual se nota uma alternância de zonas claras e escuras, resultando numa aparência estriada. Os músculos esqueléticos, assim designados pela sua ligação aos ossos das pernas, braços e coluna vertebral, são constituídos por feixes de células longas e multinucleadas, que resultam da fusão de várias células precursoras, os mioblastos. Este tipo de músculo está relacionado com a contracção voluntária, envolvido em actividades coordenadas complexas, como o movimento e, a sua contracção é geralmente rápida (na ordem dos milisegundos) e forte (Azevedo, 1999).

### 1.2.1. Estrutura do sistema contrátil

Um músculo esquelético típico é constituído por feixes de células musculares esqueléticas, também designadas fibras musculares ou ainda miofibras (Azevedo, 1999). As células musculares são cilíndricas, com vários centímetros de comprimento e com diâmetros que variam entre os 10 e 50  $\mu\text{m}$ . Estas células são multinucleadas chegando mesmo a possuir até 100 núcleos localizados periféricamente. Cada fibra muscular é composta por miofibrilas ordenadas paralelamente no interior da fibra e encontra-se delimitada por uma membrana plasmática, o sarcolema. Por sua vez as miofibrilas são constituídas por unidades repetidas, os sarcómeros. O sarcómero é considerado a unidade funcional e estrutural do músculo esquelético (Lodish, 2000). Cada sarcómero é constituído maioritariamente por dois tipos de filamentos proteicos: os filamentos grossos, constituídos por miosina e os filamentos finos que contém actina (Fig. 1.6).



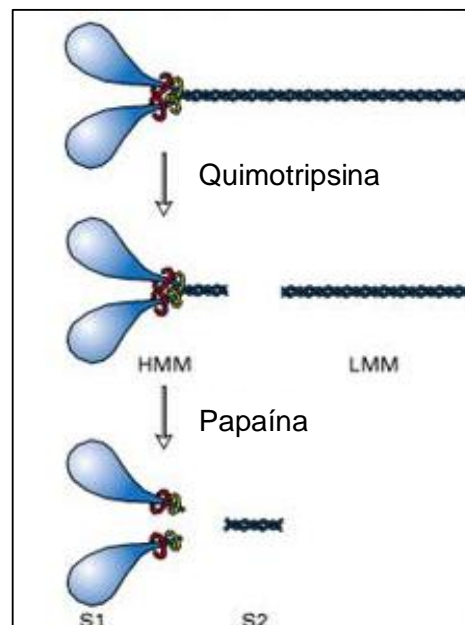
© 1998 Sinauer Associates, Inc.

**Figura 1.6.** Organização geral do músculo esquelético (Purves, 2003).

#### 1.2.1.1. Miosina

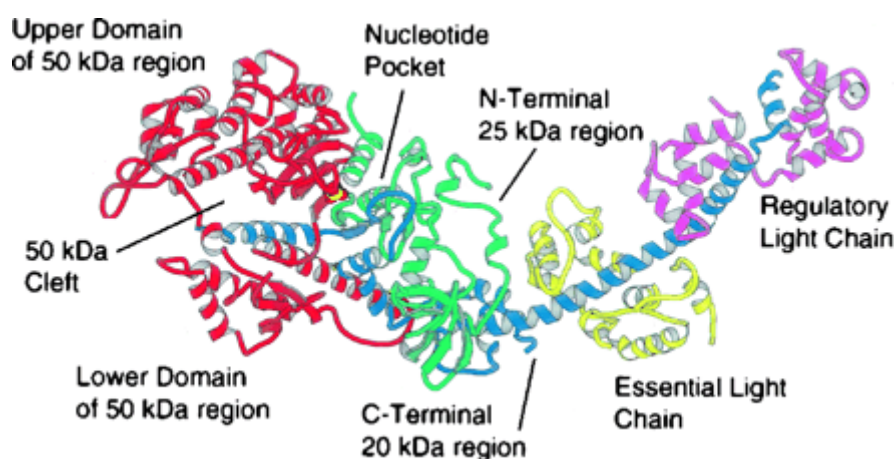
O termo miosina designa uma superfamília de motores moleculares capazes de translocar filamentos de actina, vesículas ou outras partículas fixas nos filamentos de actina. Para além disso, uma característica de todos os tipos de miosina é o facto de hidrolisarem ATP. Assim, este tipo de enzima é capaz de converter energia química em energia mecânica. Esta superfamília de proteínas é constituída por, pelo menos, 15 classes distintas (Sellers, 1999). A miosina de tipo II (ou apenas miosina II) é uma das classes mais bem estudada e existe tanto em células musculares como em células não musculares. Esta proteína constitui cerca de 60 a 70% das proteínas musculares. A miosina II é constituída por seis cadeias polipeptídicas altamente conservadas: duas cadeias pesadas (HC) enroladas entre si de aproximadamente 220 kDa e dois pares de cadeias leves diferentes, as cadeias leves essenciais (ELC) e regulatórias (RLC), com 15 a 22 kDa (Voet, 1995). As cadeias pesadas estão organizadas em três domínios estrutural e funcionalmente diferentes: cabeça, pescoço e cauda. O domínio globular da cabeça contém os locais de ligação para a actina e ATP e é o domínio responsável pela produção de força. Adjacente ao domínio da cabeça encontra-se a região em  $\alpha$ -hélice do pescoço que está associada às cadeias leves. Este domínio regula a actividade do domínio anterior. O último dos três domínios também em  $\alpha$ -hélice é a extensão do pescoço, domínio da cauda. As caudas de duas moléculas de miosina enrolam-se entre si formando os filamentos grossos. Estes possuem uma organização bipolar, ou seja, as cabeças da molécula de miosina estão localizadas nas extremidades do filamento separadas por uma zona central constituída pelas caudas da molécula. O N-terminal da cadeia pesada da

miosina II encontra-se no domínio da cabeça e o C-terminal no domínio da cauda. A miosina II pode ser clivada em diferentes fragmentos funcionais por proteólise controlada. Um local típico de clivagem situa-se a 130 kDa do N-terminal e produz dois fragmentos, meromiosina pesada (HMM) e meromiosina leve (LMM). O fragmento HMM pode ainda ser clivado e originar o subfragmento-1 (S1) e o subfragmento-2 (S2) (Fig. 1.7) (Lodish, 2000).



**Figura 1.7.** Clivagem proteolítica da molécula de miosina II. A quimotripsina cliva a molécula em dois fragmentos, HMM e LMM. A digestão com papaína origina os subfragmentos S1 e S2 (Lodish, 2000).

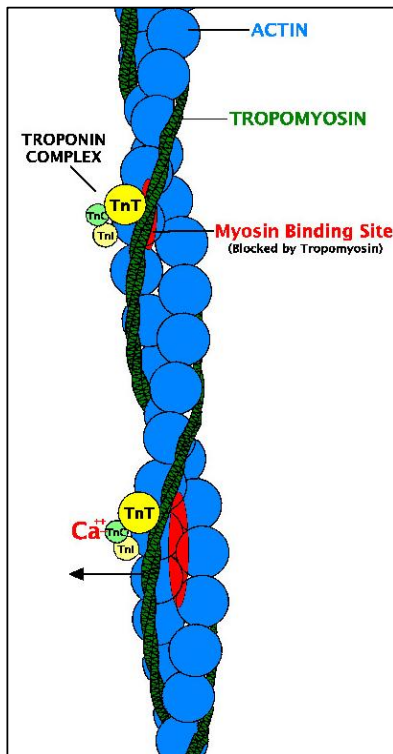
O subfragmento-1 (95 kDa) é constituído pelo domínio da cabeça e está associado a ambos os pares de cadeias leves ou apenas às cadeias leves essenciais, dependendo das condições de clivagem. O S1 é ainda formado por três domínios, um de 25 kDa (N-terminal), outro de 50 kDa e um último de 20 kDa (C-terminal) (Fig. 1.8.) (Lodish, 2000).



**Figura 1.8.** Estrutura do subfragmento-1 de miosina II de músculo esquelético. Evidência dos domínios de 25 (verde), 50 (vermelho) e 20 kDa (azul), do local de ligação de ATP e das cadeias leves essenciais (ELC) (amarelo) e regulatórias (RLC) (roxo) (Rayment, 1996).

#### 1.2.1.2. Actina

A actina é uma proteína bastante abundante em eucariotas e constitui cerca de 20 a 25% das proteínas musculares. Na presença de uma força iônica baixa a actina existe na forma de monómero globular com aproximadamente 42 kDa e designa-se G-actina. Em condições fisiológicas a G-actina polimeriza originando filamentos de F-actina. O processo é também reversível, ou seja, a F-actina despolimeriza em G-actina quando a força iônica diminui (Voet, 1995). Os filamentos de F-actina, que medem cerca de 1  $\mu\text{m}$  e têm um diâmetro de 80 Å, consistem em duas cadeias de F-actina organizadas em forma de hélice. Sobre estes filamentos localizam-se outras proteínas, tropomiosina e troponina (Fig. 1.9) (Azevedo, 1999).

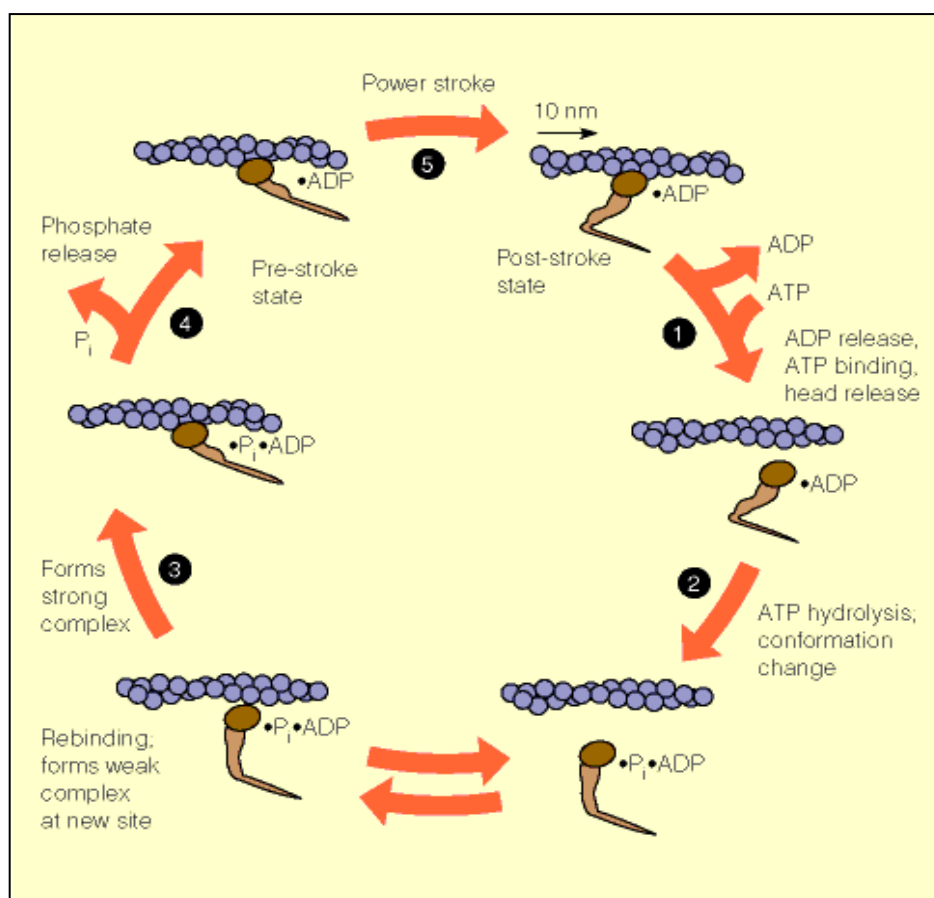


**Figura 1.9.** Estrutura do filamento de F-actina. Evidência dos monômeros de G-actina (azul) e das proteínas tropomiosina e troponina.

### 1.2.2. Mecanismo da contração muscular

A hidrólise de ATP pelo complexo actomiosina, no processo de contração muscular, envolve quatro passos principais: 1) ligação de ATP, 2) hidrólise de ATP, 3) formação de “pontes” entre as “cabeças” de miosina e o filamento de actina e 4) libertação de Pi e ADP. No estado relaxado do músculo, a “cabeça” de miosina tem ligados ADP e Pi mas não está ligada à actina. A contração é iniciada quando a miosina se liga à actina formando o complexo de actomiosina. O ADP e o Pi são então rapidamente libertados da “cabeça” de miosina do que resulta uma alteração conformacional nessa região que provoca uma variação no ângulo formado entre as “cabeças” de miosina e o filamento de actina. Esta alteração promove um deslizamento do filamento de actina para o centro do sarcômero. O encurtamento dos sarcômeros promove a contração das miofibrilas e conseqüentemente a contração da célula

muscular. A ligação de uma molécula de ATP ao local activo da miosina provoca a dissociação da “cabeça” de miosina do filamento de actina porque a afinidade do complexo miosina-ATP para a actina é 105 vezes menor do que a afinidade da miosina para a actina sem o substrato (Fig. 1.10). Após a hidrólise, a “cabeça” de miosina encontra-se numa posição activa para ligar novamente à actina. Todo este processo cíclico demora cerca de 1 milissegundo (Lymn e Taylor, 1971).

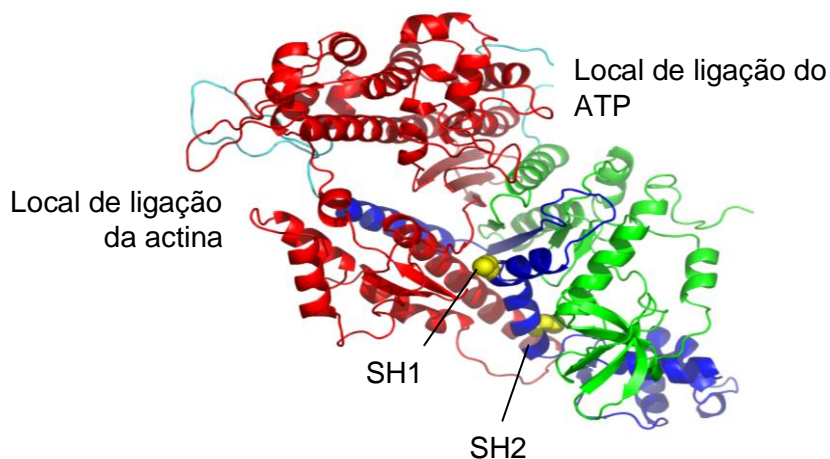


**Figura 1.10.** Modelo do mecanismo de hidrólise de ATP pelo complexo actomiosina no processo de contracção muscular (Adaptado de Spudich, 1994).

### 1.3. Stresse oxidativo no tecido muscular

O que torna o tecido muscular num alvo susceptível de ataque por parte de espécies reactivas? O músculo esquelético compreende cerca de 40% da massa total do corpo e possui importantes funções, nomeadamente na contracção muscular. Para além disso, o “turnover” das proteínas musculares é lento em comparação com proteínas de outros tecidos (Waterlow, 1978) e, deste modo, estas proteínas são mais susceptíveis a fragmentação ou alterações conformacionais induzidas por radicais livres (Nagasawa, 1997). Mais ainda, o tecido muscular é único em relação à capacidade que possui para sofrer alterações rápidas no fornecimento de energia e fluxo de oxigénio durante a contracção e, foi sugerido, que este facto torna o tecido muscular susceptível a danos provocados por ROS (Haycock et al., 1996). Verificou-se também que radicais livres de oxigénio modificam as proteínas contrácteis de um modo dependente do tempo e concentração (Lorinczy et al., 2000). Estudos indicam que os danos celulares provenientes da acção de espécies reactivas estão implícitos numa variedade de patologias, incluindo distrofias musculares (Dunn et al., 1991). Uma possível função para as ROS na distrofia muscular humana foi sugerida após o estudo de um tipo de distrofia muscular em animais induzida por deficiência de vitamina E e/ou selénio (Bradley et al., 1980). O aumento dos níveis de stresse oxidativo está também relacionado com múltiplos estados de doenças cardiovasculares, incluindo a insuficiência cardíaca, na qual estão implícitas uma grande variedade de espécies reactivas, sendo uma das mais tóxicas o ONOO<sup>-</sup> (Singh et al., 1995). De facto, foi recentemente demonstrado que o compartimento miofibrilar é um local de formação predominante de peroxinitrito e conseqüente nitrosilação de proteínas

durante disfunções cardíacas (Mihm et al., 2001; Mihm et al., 2001; Mihm et al., 2003). Numerosos estudos mostram que o aumento da formação de 3-nitrotirosina em proteínas musculares cardíacas ocorre durante descompensação cardíaca e está correlacionado com a gravidade da doença, contudo a contribuição deste fenómeno para o início/progressão da doença cardíaca ainda não está bem esclarecido (Weinstein et al., 2000; Ferdinandy et al., 2000). Uma das proteínas musculares afectadas por espécies reactivas é a miosina (Mihm et al., 2003). De facto, foi já verificado que radicais livres de oxigénio afectam a conformação local e global de miosina de músculo cardíaco (Lorinczy et al., 2000). Os grupos sulfidrílo mais reactivos (Cys707 (SH1) e Cys697 (SH2)) (Fig. 1.11) desta proteína, localizados perto do local de ligação do nucleótido, podem ser oxidados por radicais livres o que faz com que a velocidade de hidrólise do ATP seja alterada bem como a afinidade da miosina para a actina (Kaneko et al., 1993).



**Figura 1.11.** Estrutura do subfragmento-1 de miosina II de músculo esquelético de coelho. Evidência dos locais de ligação de actina e ATP e das cisteínas reactivas, SH1 (cys 707) e SH2 (cys 697).

#### 1.4. Objectivo

O presente trabalho tem como objectivo determinar a susceptibilidade do subfragmento-1 de miosina de músculo esquelético de coelho após exposição aguda e crónica, *in vitro*, da espécie reactiva peroxinitrito, produzida sinteticamente ou através da decomposição de SIN-1. Para tal, determinou-se a actividade da  $Mg^{2+}$ -ATPase estimulada por F-actina, caracterizou-se o estado de oxidação das cisteínas mais reactivas da proteína através da medição das actividades não-fisiológicas dependentes de  $Ca^{2+}$  e  $K^+$  e da medição das cisteínas reduzidas com DTNB. Quantificou-se espectrofotometricamente as 3-nitrotirosinas e ainda se identificou os domínios da proteína nitrosilados por imunodeteccção. Finalmente, verificou-se a protecção e reversão com agentes antioxidantes contra os efeitos do peroxinitrito.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Material biológico

Para o isolamento das proteínas contrácteis, miosina e actina, foram utilizados coelhos domésticos com cerca de 2 kg. As proteínas foram extraídas apenas a partir de músculo esquelético da zona dorsal e dos membros posteriores.

### 2.2. Reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho possuíam um grau de pureza elevado e foram adquiridos a empresas especializadas, referindo-se em seguida alguns exemplos: Ácido ascórbico (Riedel-de Haën), Anticorpo primário (anti 3-nitrotirosina MOAB (rato), Calbiochem); Anticorpo secundário (anti-mouse Ig G horseradish peroxidase (HRP), Calbiochem); ATP (Adenosina 5'-trifosfato, Sigma); Catalase (Sigma); DTNB (5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzóico), Sigma); Fosfoenolpiruvato (Sigma); Glutaciona redutase (Sigma); Hepes (Ácido(N-2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etano sulfónico, Sigma); L-lactato desidrogenase (Roche); Marcador de baixa massa molecular (MW: 6,5–66, Sigma); Marcador de elevada massa molecular (MW: 36–205, Sigma); 3-Morpholinosydnonimine (SIN-1, Sigma); NADH (Nicotinamida adenina dinucleótido, Sigma); 3-nitro-L-tirosina (Sigma);  $\alpha$ -quimotripsina (Sigma); Peróxido de hidrogénio (Merck); Piruvato cinase (Roche); Ponceau S (Sigma); Substrato (Immun-Star HRP Luminol/Enhancer/Immun-Star HRP Peroxidase Buffer, Bio-Rad); Superóxido dismutase (Sigma); Tris (2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol, Riedel-de Haën); Tween-20 (Sigma).

### 2.3. Isolamento e caracterização das proteínas

Todos os procedimentos envolvidos neste trabalho foram realizados a 4 °C, excepto quando indicado em contrário. Teve-se o cuidado de previamente refrigerar todas as soluções bem como todo o material, sempre que assim era necessário. Para além disso, as soluções foram todas preparadas com água MilliQ e os valores de pH foram acertados à temperatura ambiente.

#### 2.3.1. Isolamento de miosina

O procedimento seguido neste trabalho para o isolamento da miosina foi anteriormente descrito (Margossian, 1982) e baseia-se na capacidade que a proteína tem para precipitar, ou seja, formar filamentos na presença de uma força iónica baixa e, por outro lado, tornar-se solúvel na presença de uma força iónica elevada (Sellers, 1999). Ao longo do procedimento foram recolhidas amostras para posterior análise.

Sacrificou-se o coelho com uma pancada rápida e forte atrás do pescoço seguindo-se um corte na artéria jugular. Esfolou-se e colocou-se o animal numa tina com gelo. Removeu-se o tecido conjuntivo que envolve o tecido muscular e retirou-se cerca de 200 g de músculos dorsais e das pernas. Pesou-se este músculo, triturou-se moderadamente e extraiu-se em 3 volumes de solução de extracção (solução A: 0,012 M  $K_2CO_3$ /0,04 M  $KHCO_3$  pH 6,5/0,6 M KCl/10 mM 2-mercaptoetanol) mexendo-se lentamente durante 15 min. É importante não exceder este tempo de modo a evitar a extracção de actina. Centrifugou-se a suspensão de músculo a 2000xg (3700 rpm, Beckman J2-MC, rotor JA14) durante 20 min a 4 °C e filtrou-se o sobrenadante em lã de vidro. Guardou-se 1 ml de sobrenadante a – 20 °C (Amostra 1). Diluiu-se 14x com

água destilada o sobrenadante anterior, de modo a baixar a força iónica para 0,04 M, certificou-se que o pH se encontrava entre 6 e 7 e adicionou-se 10 mM 2-mercaptoetanol. Deixou-se a proteína precipitar durante cerca de 4 h a 4 °C e removeu-se o sobrenadante com o auxílio de uma bomba de vácuo. Centrifugou-se o precipitado a 2000xg durante 15 min a 4 °C, guardou-se 1 ml de sobrenadante a – 20 °C (Amostra 2) e desprezou-se o sobrenadante restante. Ressuspendeu-se o precipitado na solução A (aproximadamente 1 a 2 ml por tubo), mediu-se o volume numa proveta e adicionou-se solução tampão (solução B: 2 M KCl/100 mM HEPES pH 7,0) até trazer a força iónica a 0,6 M. Homogeneizou-se lentamente a solução no potter. Reduziu-se a força iónica para 0,04 M por adição lenta de água destilada refrigerada, certificou-se que o pH se encontrava entre 6 e 7 e adicionou-se 10 mM 2-mercaptoetanol. Deixou-se a proteína precipitar durante a noite a 4 °C e no dia seguinte removeu-se o sobrenadante com o auxílio da bomba de vácuo. Centrifugou-se o precipitado a 2000xg durante 15 min a 4 °C, guardou-se 1 ml de sobrenadante a – 20 °C (Amostra 3) e desprezou-se o sobrenadante restante. Ressuspendeu-se o precipitado na solução A (aproximadamente 1 a 2 ml por tubo), mediu-se o volume numa proveta e adicionou-se solução B até trazer a força iónica a 0,6 M. Homogeneizou-se lentamente a solução no potter. Reduziu-se a força iónica para 0,04 M por adição lenta de água destilada refrigerada, certificou-se que o pH se encontrava entre 6 e 7 e adicionou-se 10 mM 2-mercaptoetanol. Deixou-se a proteína precipitar durante cerca de 3 h a 4 °C e removeu-se o sobrenadante possível com o auxílio da bomba de vácuo. Centrifugou-se o precipitado a 2000xg, durante 15 min a 4 °C, guardou-se 1 ml de sobrenadante a – 20 °C (Amostra 4) e desprezou-se o sobrenadante

restante. Ressuspendeu-se o precipitado na solução B, mediu-se o volume numa proveta, adicionou-se solução B até trazer a força iónica a 0,6 M e homogeneizou-se no potter. Deixou-se repousar durante aproximadamente 2 h, a 4 °C e homogeneizou-se novamente no potter. Centrifugou-se a suspensão a 116000xg (55000 rpm, Beckman XL-80, rotor 90 Ti) durante 60 min a 4 °C. No fundo do tubo observou-se um precipitado escuro correspondente a complexos de actomiosina e proteína desnaturada. O último passo deste procedimento consistiu em filtrar o sobrenadante em lã de vidro para uma proveta de modo a remover lípidos que se encontravam em suspensão. Ressuspendeu-se o precipitado em solução A e guardou-se a – 20 °C (Amostra 5).

#### 2.3.1.1. Preparação do subfragmento-1 de miosina (S1)

A elevada massa molecular da molécula de miosina e a sua insolubilidade fazem com que seja necessário clivar a molécula em subfragmentos. O subfragmento-1 de miosina é um dos subfragmentos possíveis de obter, após clivagem da proteína com a enzima quimotripsina (Margossian, 1982). Este subfragmento solúvel é enzimaticamente activo (Sellers, 1999). Assim, neste trabalho foi sempre usado o S1 em vez de toda a molécula de miosina, tendo sido este obtido, no seguimento do procedimento anterior, da forma que a seguir se descreve:

Dialisou-se a proteína, obtida através do procedimento anterior, contra a solução tampão 1 (solução tampão 1: 0,12 M KCl/1 mM EDTA/25 mM HEPES pH 7,0) durante a noite, com agitação leve e a 4 °C. Quantificou-se a proteína obtida após diálise através do método de Bradford (descrito mais adiante), para se prever a quantidade de  $\alpha$ -quimotripsina necessária adicionar na digestão.

Equilibrou-se a suspensão de miosina à temperatura ambiente e digeriu-se a proteína com solução 2 (solução 2: 0,05%  $\alpha$ -quimotripsina em 0,001 N HCl), na proporção de 0,1 mg/ml  $\alpha$ -quimotripsina para 20 mg/ml miosina, durante 30 min. Teve-se o cuidado de agitar a solução de miosina enquanto se adicionava a  $\alpha$ -quimotripsina de forma a evitar precipitação local e desnaturação da miosina pela solução ácida. Adicionou-se 0,2 mM de solução 3 (solução 3: 0,1 M PMSF em 70% etanol) de modo a parar a digestão. Teve-se o cuidado de agitar durante a adição do PMSF de modo a evitar a precipitação da proteína pelo etanol. Centrifugou-se a solução a 116000xg (55000 rpm, Beckman XL-80, rotor 90 Ti) durante 60 min para separar produtos de digestão insolúveis do S1. Ressuspendeu-se o precipitado na solução A e guardou-se a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Amostra 6). O S1 foi armazenado em 10% de sacarose e 2 mM de 2-mercaptoetanol em alíquotas de 2 ml, a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3.2. Determinação da concentração de S1

Sempre que foi necessário ao longo deste trabalho determinar a concentração do S1, usou-se uma das seguintes opções: leitura directa da absorvência de S1 a 280 nm, sabendo o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon_{280}^{1\%} = 7,5\text{ cm}^{-1}$ ) ou pelo método de Bradford. Este último baseia-se na formação dum complexo, entre o reagente (Brilliant Blue G) e a proteína em solução, cujo máximo de absorvência é a 595 nm. Preparou-se uma recta padrão com diferentes concentrações de BSA (proteína padrão): 0, 2, 4, 6, 8 e 10  $\mu\text{g/ml}$  ( $[\text{BSA}]_{\text{stock}} = 1\text{ mg/ml}$ ) e reagiu-se com 800  $\mu\text{l}$  de reagente de Bradford, num volume final de 1600  $\mu\text{l}$ . Homogeneizou-se antes e após a adição do reagente e incubou-se à temperatura ambiente durante 5 min no

mínimo, não excedendo os 45. A amostra de S1 foi preparada de igual modo, em triplicado, fazendo a diluição necessária para que, depois de preparada, a absorvência se mantivesse “dentro” da recta de calibração. Após o tempo de incubação homogeneizou-se novamente, leu-se o valor de absorvência a 595 nm e a concentração de S1 foi calculada matematicamente por interpolação da recta padrão.

### 2.3.3. Isolamento de actina

O procedimento usado no isolamento da actina foi anteriormente descrito (Pardee, 1982) e garante um grau de pureza bastante elevado. Este procedimento compreende duas fases: a primeira consiste na preparação do chamado “pó de acetona” e a segunda consiste na obtenção da F-actina a partir do “pó de acetona”. Ao longo do procedimento foram recolhidas amostras para a posterior caracterização da proteína.

#### 2.3.3.1. Preparação de “pó de acetona”

Sacrificou-se o coelho com uma pancada rápida e forte atrás do pescoço e corte da artéria jugular. Sangrou-se, esfolou-se e colocou-se o animal numa tina com gelo. Com o auxílio duma pinça e bisturi retiraram-se os músculos dorsais e músculos brancos das pernas para um copo. Pesou-se cerca de 400g de músculo, triturou-se duas vezes e extraiu-se em três volumes de solução A (solução A: 0,1 M KCl; 0,15 M  $K_2HPO_4$ , pH 6,5), mexendo lentamente durante 10 min. Centrifugou-se a suspensão a 4000xg (5200 rpm, Beckman J2-MC, rotor JA14) durante 10 min a 4 °C. Guardou-se 1 ml de sobrenadante a 4 °C (Amostra 1) e desprezou-se o restante. Ressuspendeu-se

o precipitado em seis volumes de solução B (solução B: 0,05 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,2 – 8,5), mexendo lentamente durante 10 min e verificou-se se o pH se encontrava entre 8,2 e 8,5. Centrifugou-se a 4000xg durante 10 min a 4 °C, guardou-se 1 ml de sobrenadante (Amostra 2) a 4 °C e desprezou-se o restante. Ressuspendeu-se o precipitado em três volumes de solução C (solução C: 1 mM EDTA, pH 7,0) durante 10 min. Centrifugou-se a 4000xg, durante 10 min a 4 °C, guardou-se 1 ml de sobrenadante a 4 °C (Amostra 3) e desprezou-se o restante. Ressuspendeu-se o precipitado em quatro volumes de água MilliQ durante 5 min., mexendo lentamente. Centrifugou-se a 4000xg durante 10 min. a 4 °C, guardou-se 1 ml do sobrenadante (Amostra 4) a 4 °C e desprezou-se o sobrenadante restante. Ressuspendeu-se uma vez mais o precipitado em quatro volumes de água MilliQ durante 5 min., mexendo lentamente. Centrifugou-se a 4000xg durante 10 min. a 4 °C, guardou-se 1 ml do sobrenadante (Amostra 5) a 4 °C e desprezou-se o sobrenadante restante. Ressuspendeu-se o músculo cinco vezes sucessivas em três volumes de acetona durante 10 min., mexendo lentamente à temperatura ambiente. Filtrou-se o músculo com gaze e deixou-se o resíduo a evaporar na hotte durante a noite. No dia seguinte guardou-se as fibras de músculo desidratado, “pó de acetona”, num frasco bem fechado a – 20 °C. O “pó de acetona” é estável durante vários meses. O passo de desidratação com acetona teve como objectivo desnaturar eventuais proteínas ainda presentes e também permitir o armazenamento da amostra por mais tempo (Sheterline, 1998).

### 2.3.3.2. Obtenção de F-actina a partir de “pó de acetona”

Por cada grama de “pó de acetona” obtido anteriormente, adicionou-se 20 ml de solução D (solução D: 0,2 mM  $\text{CaCl}_2$ /0,2 mM  $\text{Na}_2\text{ATP}$ /0,5 mM 2-mercaptoetanol/0,005%  $\text{NaN}_3$ /2 mM Tris-HCl, pH 8,0) e mexeu-se lentamente a suspensão durante 30 min, a 4 °C. A adição de 2-mercaptoetanol à solução é apenas realizada após o acerto do pH, uma vez que interfere com a determinação correcta do pH causando insensibilidade no eléctrodo. O extracto foi separado do “pó de acetona” hidratado filtrando a suspensão anterior com quatro camadas de gaze fixadas no topo de um copo. O músculo foi extraído novamente com o mesmo volume de solução D, durante mais 30 min, com agitação lenta. Após este tempo juntou-se os dois extractos e centrifugou-se a 16000xg (Beckman J2-MC, rotor JA20) durante 30 min a 4 °C. Decantou-se o sobrenadante para uma proveta e registou-se esse volume. Adicionou-se ao sobrenadante KCl até uma concentração final de 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  até 2 mM e ATP até 1 mM de modo a promover a polimerização da G-actina (a inclusão de 1 mM ATP garante uma completa polimerização). Esta adição foi feita com agitação lenta e contínua da solução. Deixou-se polimerizar à temperatura ambiente e em repouso. Nesta fase, observou-se um aumento da viscosidade da solução evidenciado pela presença de bolhas de ar. O passo seguinte consistiu na remoção da tropomiosina. Para tal, arrefeceu-se a suspensão durante 15 min no gelo, adicionou-se KCl sólido até uma concentração final de 0,6 M e mexeu-se lentamente durante 30 min a 4 °C. Seguidamente centrifugou-se a suspensão a 116000xg (Beckman XL-80, rotor 90 Ti) durante 2h30m a 4 °C, guardou-se 1 ml do sobrenadante a 4 °C (Amostra 6) e desprezou-se o sobrenadante restante. Adicionou-se a cada precipitado cerca

de 500  $\mu\text{l}$  de solução D e ressuspendeu-se. Transferiu-se para o mini potter e homogeneizou-se com cuidado. Após homogeneização dialisou-se contra a solução D, com agitação e a 4 °C durante a noite. No dia seguinte trocou-se a solução de diálise por nova solução D e deixou-se a dialisar durante toda a manhã. A actina dialisada foi centrifugada a 116000xg durante 2h30m a 4 °C. Reservou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado em 500  $\mu\text{l}$  de solução D (Amostra 7) que se guardou-se a 4 °C. Determinou-se a concentração da proteína na forma de G-actina por medição do valor de absorvência a 290 nm ( $\epsilon = 0,62 \text{ mg}^{-1}.\text{ml}.\text{cm}^{-1}$  ou  $0,026 \text{ }\mu\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ). A polimerização em F-actina consistiu em adicionar KCl até uma concentração final de 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  e ATP até 1 mM. Finalmente adicionou-se 0,02%  $\text{NaN}_3$  e armazenou-se a 4 °C. A F-actina não deverá ser congelada.

#### 2.3.4. Análise do estado de pureza das proteínas isoladas

A técnica escolhida para analisar o estado de pureza das proteínas isoladas foi a electroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE). A electroforese consiste na migração de uma partícula carregada sob a influência de um campo eléctrico. O SDS-PAGE em particular, baseia-se na separação de proteínas de acordo com o seu tamanho (massa molecular) sendo assim possível determinar a massa molecular de cada proteína. O SDS (dodecilo sulfato de sódio) é um detergente aniónico usado para desnaturar as proteínas. Este detergente atribui-lhes carga negativa o que faz com que estas migrem ao longo do gel de acordo com a sua massa molecular, quando sujeitas a um campo eléctrico (Wilson, 1997).

As amostras recolhidas ao longo do procedimento de isolamento do S1 (Amostra 1 – 6) e uma amostra de S1 foram aplicadas num gel 12% SDS-PAGE. Para preparar o gel de resolução, misturou-se num copo, 6 ml de acrilamida concentrada (29,2% (m/v) acrilamida/0,8% (m/v) N,N'-metil-bis-acrilamida), 3,75 ml de tampão do gel de resolução (1,5 M Tris, pH 8,8 (4x concentrado)), 150 µl 10% SDS (m/v) e 5 ml de água. Adicionou-se 75 µl de 10% PSA (m/v) (preparado no dia) e 5 µl de TEMED, para iniciar a polimerização. Agitou-se ligeiramente e verteu-se para a “sanduíche” de vidro previamente preparada. Cobriu-se com uma pequena camada de água destilada para que quando polimerizado o gel ficasse uniforme. O gel polimerizou após cerca de 30 min. Retirou-se a camada de água destilada e preparou-se o gel de concentração misturando: 400 µl de acrilamida concentrada, 750 µl de tampão do gel de concentração (0,5 M Tris, pH 6,8 (4x concentrado)), 30 µl de 10% SDS (m/v) e 1,83 ml de água. Para iniciar a polimerização adicionou-se 15 µl de 10% PSA e 5 µl de TEMED. Agitou-se ligeiramente e verteu-se para a “sanduíche” de vidro. Deixou-se polimerizar durante cerca de 30 min.

As amostras foram preparadas para uma concentração final de proteína 1 mg/ml, num volume final de 100 µl, incluindo 25 µl de tampão de amostra (320 mM Tris pH 6,8 / 0,4 M 2-mercaptoetanol (reduz as pontes dissulfídicas que constituem as proteínas)/8% SDS (m/v)/15% (v/v) glicerol (confere densidade à amostra) e 0,024% (m/v) azul bromofenol (permite a observação da frente de migração) (4x concentrado)). A electroforese decorreu a 180 V durante 3h30m. Após este tempo transferiu-se o gel para uma tina com solução

corante Coomassie Brilliant Blue (GCI 42655) onde permaneceu durante 1 h. Seguidamente deixou-se o gel a descorar em solução descorante.

As amostras recolhidas ao longo do procedimento de isolamento da F-actina (Amostra 1 – 7) foram aplicadas também num gel 12% SDS-PAGE, que foi preparado como descrito nesta secção. As amostras foram preparadas para uma concentração final de proteína 1 mg/ml, num volume final de 100  $\mu$ l, incluindo 25  $\mu$ l de tampão de amostra (320 mM Tris pH 6,8/0,4 M 2-mercaptoetanol/8% SDS (m/v)/15% (v/v) glicerol e 0,024% (m/v) azul bromofenol (4x concentrado)). A electroforese decorreu a 150 V durante 4h30m. Após este tempo transferiu-se o gel para uma tina com solução corante Coomassie Brilliant Blue onde permaneceu durante 1 h. Seguidamente deixou-se o gel descorar em solução descorante. A massa molecular das proteínas foi determinada através de uma recta padrão obtida a partir do log da massa molecular das proteínas padrão em função das suas mobilidade relativas.

#### 2.3.5. Medição das actividades enzimáticas de S1

A actividade ATPásica de S1 na presença de cálcio, EDTA ou actina, é um bom critério para avaliar a qualidade da preparação de S1 (Margossian, 1982). Uma preparação adequada deste subfragmento de miosina tem a actividade da  $K^+$ /EDTA-ATPase superior à actividade da  $Ca^{2+}$ -ATPase e preserva os grupos sulfidrílo no estado reduzido, nomeadamente as cisteínas mais reactivas, Cys 707 (SH1) e Cys 697 (SH2) (Sellers, 1999). Assim foram determinadas as duas actividades não fisiológicas da proteína, dependente de  $Ca^{2+}$  ( $Ca^{2+}$ -ATPase) e dependente de  $K^+$  ( $K^+$ /EDTA-ATPase) bem como a actividade fisiológica dependente de  $Mg^{2+}$  ( $Mg^{2+}$ -ATPase) estimulada por

F-actina. As duas primeiras actividades, não fisiológicas, foram determinadas através do ensaio Fiske-Subarow modificado. Este ensaio consiste na medição do fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) libertado proveniente da hidrólise de ATP. Os ensaios foram efectuados à temperatura ambiente em, 50 mM Tris, pH 7,9; 2,5 mM ATP; 0,23 M KCl e 2,5 mM  $\text{CaCl}_2$  para a actividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase e 0,6 M KCl e 1 mM EDTA para a actividade da  $\text{K}^+$ /EDTA-ATPase. Nos dois casos usou-se 0,1 mg/ml de S1. O substrato, ATP, uma vez que irá iniciar a reacção foi sempre o último reagente a ser adicionado. Após a adição do substrato, homogeneizou-se ligeiramente e incubou-se num banho a 25 °C. A reacção para a determinação da actividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase teve a duração máxima de 20 min, em que foram recolhidas amostras de 150  $\mu\text{l}$  de 2 em 2 min para eppendorfs previamente preparados com 150  $\mu\text{l}$  de 10% TCA refrigerado. Para a determinação da actividade da  $\text{K}^+$ /EDTA-ATPase a reacção decorreu durante 10 min e foram recolhidas amostras também de 150  $\mu\text{l}$  mas de 1 em 1 min para eppendorfs também preparados com 150  $\mu\text{l}$  de 10% TCA refrigerado. Homogeneizou-se, colocou-se em gelo e centrifugou-se a 1500xg (Eppendorf 5415 D) durante 10 min. Retirou-se 200  $\mu\text{l}$  de sobrenadante para novos eppendorfs aos quais se adicionou 1580  $\mu\text{l}$  de água. Homogeneizou-se, adicionou-se 200  $\mu\text{l}$  de solução de molibdato de amónio (2,5% molibdato de amónio / 2,5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) e homogeneizou-se novamente. Adicionou-se a cada eppendorf 20  $\mu\text{l}$  de reagente redutor (5 mg ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico / 30 mg bissulfito de sódio / 30 mg sulfito de sódio / 2,6 ml água (este reagente foi sempre preparado imediatamente antes da sua utilização e como é sensível à luz teve-se o cuidado de o proteger com papel de alumínio)), deixou-se reagir durante 10 min e mediu-se os valores de absorvência a 660 nm com o mesmo

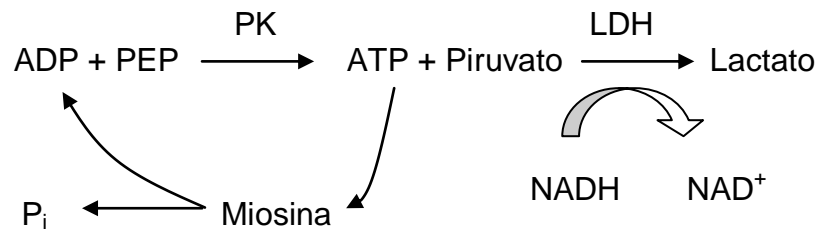
intervalo de tempo. A recta de calibração foi preparada de acordo com a Tabela 2.1.

**Tabela 2.1.** Recta de calibração com fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) para o ensaio Fiske-Subarow modificado.

| Tubo | 5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ( $\mu\text{l}$ ) | $\text{H}_2\text{O}$ ( $\mu\text{l}$ ) | $\text{PO}_4^{3-}$ (nmol) |
|------|---|--|---------------------------|
| 1    | 0   | 1780                                   | 0                         |
| 2    | 5   | 1775                                   | 25                        |
| 3    | 10  | 1770                                   | 50                        |
| 4    | 20  | 1760                                   | 100                       |
| 5    | 40  | 1740                                   | 200                       |
| 6    | 100   | 1680                                   | 500                       |

Foi também adicionado a cada tubo da recta de calibração 200  $\mu\text{l}$  de solução de molibdato de amónio e 20  $\mu\text{l}$  de reagente redutor. Elaborou-se a recta de calibração representando os valores de absorvência em função do número de nmol de fosfato. Em seguida, por interpolação da recta de calibração determinou-se o número de nmol de fosfato para as amostras e representou-se esses valores em função do tempo de reacção. Através do declive deste último gráfico determinou-se cada uma das actividades em nmol ATP/min.mg S1.

A actividade da  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase estimulada por F-actina foi determinada pelo método de enzimas acopladas. Este método consiste num ciclo constituído por ADP e fosfoenolpiruvato (PEP) que são convertidos em ATP e piruvato, pela piruvato cinase (PK). O piruvato é transformado em lactato, na presença da lactato desidrogenase (LDH), acompanhado da oxidação do NADH a  $\text{NAD}^+$  (Fig. 2.1).



**Figura 2.1.** Esquema de reacção do método de enzimas acopladas.

Na presença de S1 de miosina, há hidrólise do ATP em fosfato e ADP. Assim, o ATP é sempre regenerado (mantendo-se sempre a sua concentração inicial) permitindo a manutenção do ciclo. Uma vez que as enzimas estão em excesso, a velocidade de oxidação do NADH, monitorizada pela variação do valor de absorvência a 340 nm, será limitada pela produção de ADP e fosfato pelo S1. Assim, adicionou-se numa cuvete, 800  $\mu\text{l}$  de meio de reacção (25 mM HEPES pH 7,0 / 3,125 mM  $\text{MgCl}_2$ ), 10  $\mu\text{l}$  de 42 mM PEP, 10  $\mu\text{l}$  de enzimas (piruvato cinase e lactato desidrogenase, 10  $\mu\text{g/ml}$ ), S1 (50  $\mu\text{g/ml}$ ), 15  $\mu\text{l}$  de 25 mM NADH e o restante em água para perfazer 1000  $\mu\text{l}$ . A reacção foi iniciada pela adição de 20  $\mu\text{l}$  de 100 mM ATP ( $[\text{ATP}]_f = 2 \text{ mM}$ ). Para a medição da actividade da  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase estimulada por F-actina utilizou-se 2  $\mu\text{M}$  F-actina e através do declive originado pela oxidação de NADH determinou-se esta actividade em nmol ATP/min.mg S1, após conversão da absorvência a 340 nm em moles de NADH oxidadas e através do coeficiente de extinção molar deste ( $\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) sabendo que por cada mol de NADH oxidado hidrolisa-se uma mol de ATP.

## 2.4. Tratamento de S1 com espécies oxidantes

No presente trabalho o S1 foi tratado com peroxinitrito produzido sinteticamente ou com um composto químico, o SIN-1, que tem a capacidade de libertar de um modo contínuo e em simultâneo as espécies  $\text{NO}^-$  e  $\cdot\text{O}_2^-$  que quando reagem entre si formam o  $\text{ONOO}^-$ . O S1 foi também tratado com  $\text{H}_2\text{O}_2$ , como estudo controlo ao tratamento com SIN-1. As espécies oxidantes foram sempre preparadas no máximo 1 ou 2 dias antes da sua utilização uma vez que são relativamente instáveis.

### 2.4.1. Preparação de espécies oxidantes

#### 2.4.1.1. Preparação de peroxinitrito sintético

O peroxinitrito foi produzido sinteticamente de acordo com um procedimento anteriormente descrito (Gutiérrez-Martín, 2002). Para tal colocou-se num copo, a 4 °C e sempre com agitação moderada 2,5 ml de 0,7 M  $\text{H}_2\text{O}_2$ /0,6 M HCl. Adicionou-se um volume igual de 0,6 M  $\text{NaNO}_2$  de modo a formar-se a espécie  $\text{ONOO}^-$ . Logo após a adição das primeiras gotas de  $\text{NaNO}_2$  adicionou-se 5 ml de 3 M NaOH. Este último irá estabilizar o  $\text{ONOO}^-$  uma vez que este se decompõe muito rapidamente. Seguidamente, adicionou-se 67 mg de  $\text{MnO}_2$  sólido, de modo a eliminar o excesso de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , e manteve-se em agitação durante 30 min, sempre no gelo. Após esse tempo centrifugou-se a 3000xg (Beckman J2-MC, rotor JA20), durante 10 min e a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado através dum filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  e guardado num frasco de vidro a – 80 °C. Após congelado verificou-se que a camada superior de  $\text{ONOO}^-$  era mais escura que o restante  $\text{ONOO}^-$ , logo mais concentrada. Assim, retirou-se com uma espátula alguns microlitros da camada superior e deixou-se

descongelar. Mediu-se a concentração de  $\text{ONOO}^-$  a 302 nm em 1,5 M NaOH (solução em que está o  $\text{ONOO}^-$ ) usando como coeficiente de extinção molar  $1670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . O peroxinitrito preparado sinteticamente ao longo de todos os estudos apresentou uma concentração entre 40 e 100 mM.

#### 2.4.1.2. Preparação e determinação da cinética de decomposição de SIN-1

O composto SIN-1 ( $\text{MM} = 206,6 \text{ g/mol}$ ) foi preparado em água com uma concentração de 200 mM, aliquotado e guardado a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ . Uma vez que este composto é foto-sensível protegeu-se sempre da luz com papel de alumínio.

A cinética de decomposição de SIN-1 em  $\text{ONOO}^-$  foi determinada através da oxidação do NADH a 340 nm. Numa cuvete a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  adicionou-se 1 ml de 10 mM Tris/25 mM KCl pH 8,5 e  $375 \text{ } \mu\text{M}$  NADH. Iniciou-se a reacção pela adição de 50 ou  $100 \text{ } \mu\text{M}$  SIN-1 e deixou-se decorrer durante cerca de 3 h. O NADH deverá estar sempre em excesso em relação ao SIN-1 uma vez que estamos a seguir a sua oxidação. Ao fim desse tempo determinou-se a percentagem de SIN-1 decomposto através do coeficiente de extinção do NADH ( $\epsilon_{\text{NADH}} = 6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

#### 2.4.1.3. Preparação de peróxido de hidrogénio

A solução de peróxido de hidrogénio (10 mM) foi preparada em 10 mM Tris/25 mM KCl pH 8,5 e guardada a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 2.4.2. Tratamento de S1

Antes do tratamento do S1 com o peroxinitrito, quer o sintetizado quer o obtido através da decomposição de SIN-1, ou com o peróxido de hidrogénio, a

proteína foi sempre dialisada contra o tampão do tratamento (especificado a seguir), de modo a ser removido o 2-mercaptoetanol (um agente redutor). A diálise decorreu durante cerca de 12 h com agitação contínua e a 4 °C.

#### 2.4.2.1. Tratamento de S1 com peroxinitrito sintético

De modo a simular uma exposição aguda e uma exposição crónica da proteína à espécie  $\text{ONOO}^-$ , seguiu-se o procedimento a seguir descrito. Dialisou-se a proteína no tampão do tratamento (0,5 M Tris pH 7,2 ou 0,25 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7,2) e diluiu-se para 1 mg/ml no mesmo tampão. A exposição crónica consistiu em efectuar repetidas adições (pulsos) de  $\text{ONOO}^-$  stock à proteína, com intervalos de 20 segundos e homogeneização ligeira entre cada adição, de modo a se atingir a concentração final de  $\text{ONOO}^-$  desejada. A exposição aguda consistiu numa única adição de uma solução concentrada de  $\text{ONOO}^-$  à proteína. O estudo controlo foi realizado com pulsos de 1,5 M NaOH e vortex, em vez de  $\text{ONOO}^-$ , de modo a garantir que os efeitos observados eram devidos apenas ao  $\text{ONOO}^-$ . O valor de pH foi sempre verificado antes e depois do tratamento registando-se uma variação máxima de 0,26 unidades (desde pH 7,2 a pH 7,46).

#### 2.4.2.2. Tratamento de S1 com o composto SIN-1

Antes do tratamento com SIN-1 a proteína foi dialisada em 10 mM Tris/25 mM KCl pH 8,5 e diluída para 1 mg/ml no mesmo tampão. O composto SIN-1 foi adicionado à proteína em diferentes concentrações (25, 50, 100, 200, 250, 500  $\mu\text{M}$ ) e esta foi incubada num banho a 25 °C durante 2 h (tempo de decomposição do SIN-1 previamente determinado para as condições de

reação utilizadas). Após esse tempo parou-se a reação colocando os tubos em gelo. Também aqui o pH foi sempre verificado antes e depois do tratamento, registando-se uma variação máxima de pH de 0,11 unidades (desde pH 8,5 a pH 8,61).

#### 2.4.2.3. Tratamento de S1 com peróxido de hidrogénio

Antes do tratamento com peróxido de hidrogénio a proteína foi dialisada em 10 mM Tris/25 mM KCl pH 8,5 e diluída para 1 mg/ml no mesmo tampão. A solução concentrada de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi adicionada à proteína em diferentes concentrações (10, 25, 50, 100, 200 e 500 µM). Incubou-se a proteína tratada num banho a 25 °C durante 2 h e após esse tempo parou-se a reação colocando os tubos em gelo.

#### 2.4.3. Protecção com agentes antioxidantes

Testou-se o efeito protector de alguns agentes antioxidantes, nomeadamente, GSH, ascorbato e NADH contra a acção da espécie ONOO<sup>-</sup> proveniente da decomposição de SIN-1. Os agentes antioxidantes foram preparados no dia de utilização: 100 mM GSH em 50 mM Tris pH 7,0, 100 mM ascorbato em 50 mM Tris pH 7,0 e 25 mM NADH em água. No caso da GSH e ascorbato foi necessário acertar o pH. A proteína foi dialisada em 10 mM Tris / 25 mM KCl pH 8,5 e diluída para 1 mg/ml no mesmo tampão. Adicionou-se diferentes concentrações dos antioxidantes, ascorbato (50, 100, 250, 500 e 1000 µM), GSH (25, 50, 100, 250, 500 e 1000 µM) ou NADH (5, 10, 25, 50 e 100 µM). Após a adição destes adicionou-se a cada tratamento 50 µM SIN-1 e deixou-se reagir durante 2h a 25 °C. Realizou-se ainda um outro tratamento em

que se adicionou os agentes antioxidantes (1 mM ascorbato, 2 mM GSH e 50  $\mu$ M NADH) após o tratamento da proteína com SIN-1, de modo a testar uma eventual reversão dos efeitos promovidos pelo ONOO $\cdot$ .

## 2.5. Quantificação de 3-nitrotirosina

Um dos parâmetros analisados depois do tratamento do S1 com o peroxinitrito foi a existência, ou não, de 3-nitrotirosinas. A quantificação das 3-nitrotirosinas foi obtida espectrofotometricamente a 415 nm e usando o respectivo coeficiente de extinção molar previamente determinado.

O coeficiente de extinção molar de 3-nitrotirosina foi determinado nos tampões dos tratamentos: 0,5 M Tris pH 7,2; 0,25 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,2 e 10 mM Tris/25 mM KCl pH 8,5, nos quais se preparou uma solução concentrada 10 mM 3-nitro-L-tirosina (MM = 226,2 g/mol). Quantificou-se a solução concentrada a 415 nm e através da lei de Beer-Lambert ( $Abs = \epsilon \cdot c \cdot l$ ) determinou-se o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) de 3-nitrotirosina em M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> para cada um dos tampões (Tab. 2.II).

**Tabela 2.II.** Coeficientes de extinção molar ( $\epsilon$ ) de 3-nitrotirosina calculados a 415 nm em diferentes tampões.

| Tampão   | $\epsilon_{415\text{ nm}}$ (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ) |
|--|--|
| 0,5 m Tris pH 7,2  | 3500   |
| 0,25 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,2 | 2800   |
| 10 mM Tris / 25 mM KCl pH 8,5  | 4271   |

## 2.6. Tripsinização de S1

Às amostras de S1 (tratadas e não tratadas com pulsos de ONOO $\cdot$ ) foi adicionado 0,5 mg/ml tripsina na proporção de 1:50 (tripsina:S1) e deixou-se reagir durante 45 min à temperatura ambiente. A tripsina irá clivar o S1 nos

seus diferentes domínios. A reacção terminou por adição de inibidor de tripsina numa proporção de 2:1 (inibidor:tripsina).

## **2.7. Imunodeteccção de 3-nitrotirosina**

O Western blotting é um dos métodos mais eficazes para separar e posteriormente detectar uma determinada proteína. Este método combina o elevado poder de resolução da electroforese, a especificidade de anticorpos e a sensibilidade de ensaios enzimáticos (Lodish, 1999). Em resumo, a amostra proteica é aplicada num gel SDS-PAGE e posteriormente transferida para uma membrana. Esta é incubada primeiro com um anticorpo primário (especifico para a proteína), seguidamente com um anticorpo secundário (que reconhece e se liga ao anticorpo primário) o qual está covalentemente ligado a uma enzima. Se a enzima for, por exemplo, uma fosfatase alcalina, a adição de substrato resultará num produto corado, que se depositará no local da proteína de interesse. Por outro lado, se a enzima for uma peroxidase, uma das formas de detectar a conversão de substrato em produto é através da produção de luz (Quimioluminescência) (Wilson, 1997).

Preparou-se as amostras de S1 (10 µg proteína) tratadas com ONOO<sup>-</sup> para a electroforese. Ferveu-se durante 5 min, aplicou-se no gel 12% SDS-PAGE (preparado como se descreve na secção 2.3.4.) e deixou-se correr a 130-180 V. Seguidamente cortou-se duas folhas de papel (“extra thick filter paper” 15x20 cm, BioRad), duas esponjas e uma membrana (“pure nitrocellulose membrane” 0,45 µM, BioRad) do tamanho do gel. Num tabuleiro com tampão de transferência (25 mM Tris / 192 mM glicina / 20% metanol) embebeu-se as duas esponjas, as folhas de papel, a membrana e o gel e

montou-se uma “sanduíche” pela seguinte ordem: esponja, folha de papel, membrana, gel (previamente marcado no poço 1) folha de papel e esponja. Colocou-se a “sanduíche” na cassete de transferência, esta na tina de transferência e encheu-se com tampão de transferência. Iniciou-se a transferência a 300 mA, a 4 °C, com agitação contínua durante 2 horas. Após este tempo retirou-se a membrana e lavou-se com PBS (2L: 2,890 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  + 0,408 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 0,403 g KCl + 16 g NaCl) para remover o tampão. Corou-se a membrana com 0,1% solução Ponceau ((solução reutilizável) 0,1% Ponceau S em pó (m/v) / 5% ácido acético (v/v)) para ver as proteínas (cora rapidamente) e lavou-se com água para remover o excesso de corante. Marcou-se com um lápis os poços e as bandas do marcador. Lavou-se novamente com PBS, com agitação durante  $\pm 5$  min (até remover completamente o corante). Seguidamente bloqueou-se a membrana com leite magro em pó em PBS a 20%, com agitação à temperatura ambiente, durante 1 h. Após 1 h lavou-se a membrana com PBS-T (0,05% Tween-20 (v/v) em 1L de PBS) 2x 5 min, com agitação à temperatura ambiente (teve-se sempre o cuidado de não deixar a membrana secar). Diluiu-se o anticorpo primário 1:5000 e incubou-se a membrana, com agitação, à temperatura ambiente durante 2 horas. Após a incubação lavou-se a membrana com PBS-T (3x 5 min + 3x 10 min), com agitação à temperatura ambiente. Preparou-se o anticorpo secundário fazendo a diluição de 1:25000 e incubou-se a membrana, com agitação à temperatura ambiente, durante 1 h. Após a incubação, lavou-se a membrana com PBS-T (3x 5 min + 3x 10 min) + 1x com PBS (apenas para retirar o detergente), com agitação e à temperatura ambiente. Finalmente, cortou-se o excesso da membrana, misturou-se o substrato 1:1 e incubou-se a

membrana com o substrato durante 3 min. Enrolou-se a membrana depois de escorrida (mas não seca) em película aderente e incubou-se durante cerca de 1 h. As bandas foram detectadas por quimioluminescência usando um Molecular Imager FX System (Gutiérrez-Martín et al., 2002).

## **2.8. Quantificação de cisteínas reduzidas**

Outro parâmetro analisado após o tratamento da proteína com SIN-1 foi o número de resíduos de cisteína reduzidos. O reagente de Ellman, 5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) é normalmente usado para quantificar os grupos sulfidrilos reactivos das proteínas. Uma mol de grupos sulfidrilos reage com o DTNB para formar uma mol de um anião corado, o 3-carboxilato-4-nitrotiofenolato (CNT), o qual tem um máximo de absorvência a 412 nm (Robyt, 1990).

O procedimento utilizado foi anteriormente descrito (Gutiérrez-Merino, 1987). Assim, numa cuvete adicionou-se 220  $\mu$ l de tampão fosfato de sódio, 330  $\mu$ l de água MilliQ e 550  $\mu$ l de 1 mg/ml S1 tratado com diferentes concentrações de SIN-1 (50, 100, 250 e 500  $\mu$ M). Adicionou-se também 5,5  $\mu$ l de 100 mM DTNB (MM = 396,3 g/mol) e deixou-se a reacção decorrer durante 5 min. O DTNB vai ligar-se apenas aos resíduos de cisteína que estiverem reduzidos e expostos ao solvente. Finalmente, adicionou-se 0,01g SDS e deixou-se a reacção estabilizar. O SDS vai desnaturar a proteína o que faz com que todos os resíduos de cisteína fiquem expostos ao solvente podendo o DTNB ligar-se aos resíduos reduzidos .

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Isolamento e caracterização das proteínas

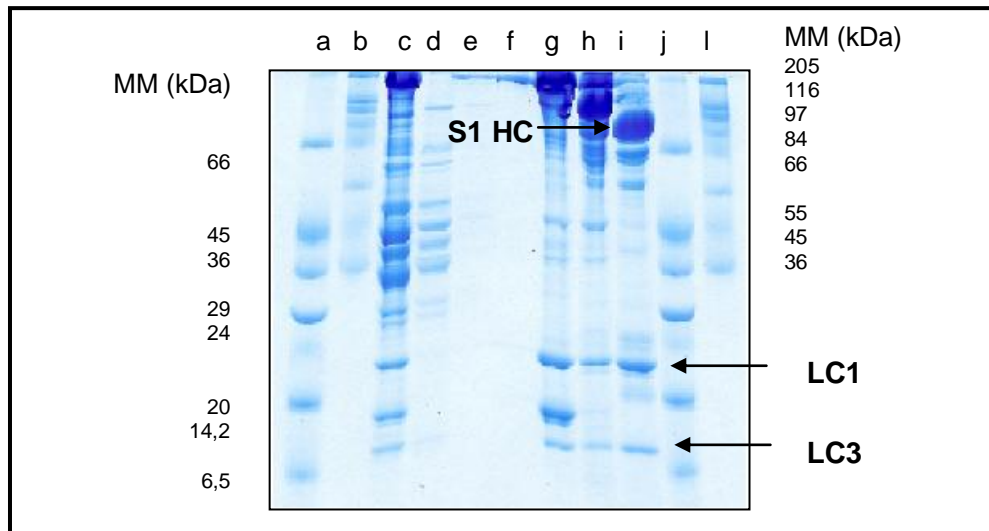
##### 3.1.1. Determinação da concentração das proteínas

Pela quantificação do S1, através do método directo a 280 nm ou pelo método de Bradford, obteve-se uma concentração deste subfragmento de miosina entre 5,3 e 7,1 mg/ml (n=4), enquanto que os valores para a F-actina, obtidos a 290 nm, foram entre 53 e 116  $\mu$ M (n=10).

##### 3.1.2. Análise do estado de pureza das proteínas isoladas

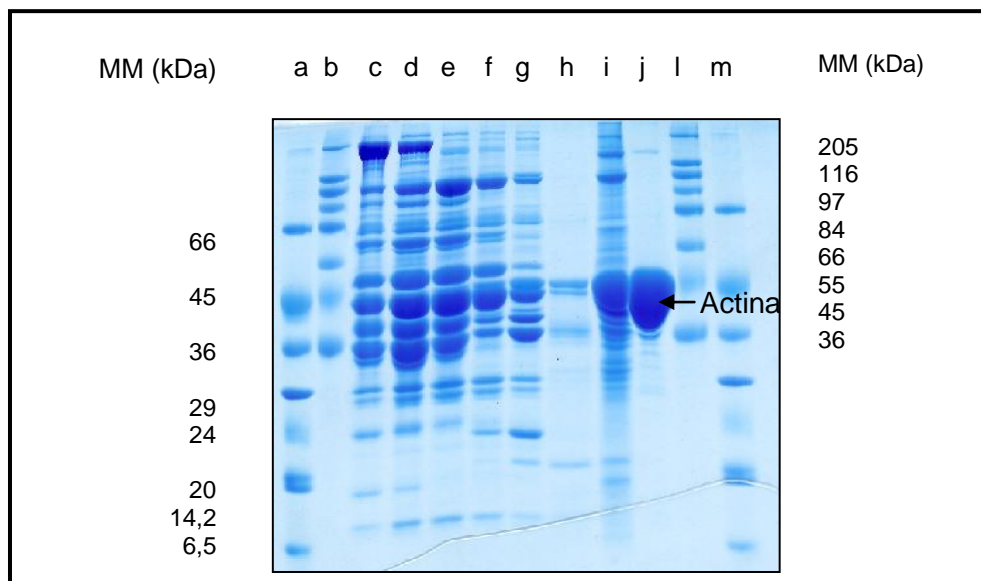
O estado de pureza das proteínas isoladas foi analisado por SDS-PAGE através das amostras recolhidas ao longo dos isolamentos, como descrito na secção 2.3 nos Materiais e Métodos. Os resultados obtidos relativos ao isolamento de miosina e preparação de S1 encontram-se na figura 3.1 e os resultados obtidos relativos à preparação de “pó de acetona” e isolamento de F-actina encontram-se na figura 3.2.

Na figura 3.1, no poço (c), referente à primeira amostra recolhida no isolamento de miosina, observa-se uma banda de grande intensidade com aproximadamente 200 kDa correspondente a uma das cadeias pesadas da molécula de miosina. No poço (i), referente à amostra de S1, é visível uma banda intensa de 95 kDa correspondente ao S1. Ainda no poço (i) observam-se outras duas bandas menos intensas identificadas como sendo as cadeias leves de S1, LC3 e LC1, com massas moleculares entre os 15 e 22 kDa, respectivamente (Voet, 1995). É possível também observar que a amostra de S1, poço (i), está praticamente livre de contaminações.



**Figura 3.1.** Gel 12% SDS-PAGE correspondente ao isolamento de miosina e preparação de S1. Nos poços (a) e (j) encontram-se 10  $\mu$ l de marcadores de baixa massa molecular (6,5 – 66 kDa) e nos poços (b) e (l) encontram-se 10  $\mu$ l de marcadores de elevada massa molecular (36 – 205 kDa). Poço (c) 20  $\mu$ g de amostra 1; poço (d) 6  $\mu$ g de amostra 2; poço (e) 0,75  $\mu$ g de amostra 3; poço (f) 0,26  $\mu$ g de amostra 4; poço (g) 20  $\mu$ g de amostra 5; poço (h) 20  $\mu$ g de amostra 6 e poço (i) 20  $\mu$ g de S1. S1 HC – cadeia pesada de S1, LC1 – cadeia leve de S1, LC3 – cadeia leve de S1.

Na figura 3.2, no poço (c), referente à primeira amostra recolhida no isolamento de F-actina, observa-se uma banda intensa com cerca de 200 kDa correspondente à cadeia pesada de miosina, que tende a desaparecer ao longo do isolamento de F-actina. No poço (j) é visível uma banda de grande intensidade com cerca de 42 kDa correspondente à G-actina (Voet, 1995). Observa-se ainda que a proteína foi isolada sem contaminações significativas de miosina ou quaisquer outras proteínas normalmente associadas à actina, como a troponina ou tropomiosina.



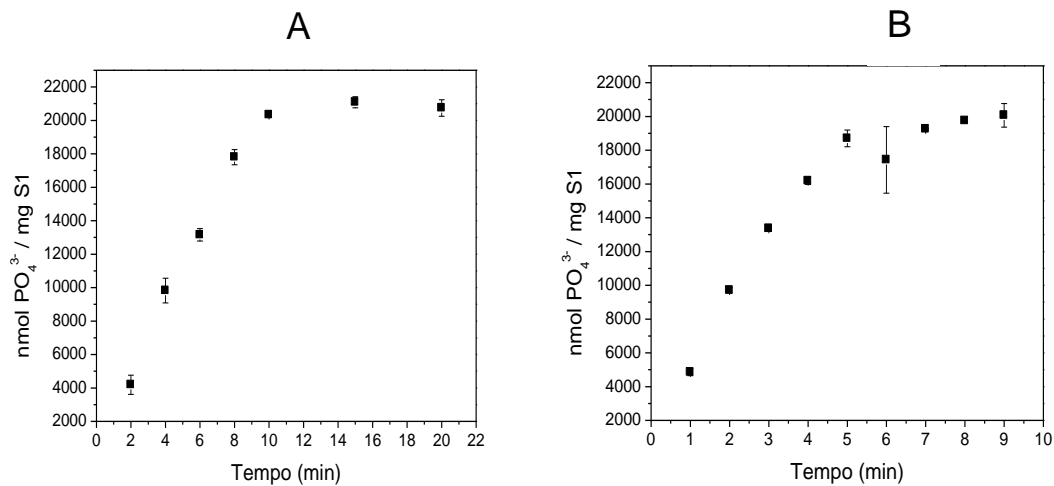
**Figura 3.2.** Gel 12% SDS-PAGE correspondente ao isolamento de F-actina. Nos poços (a) e (m) encontram-se 10  $\mu$ l de marcadores de baixa massa molecular (6,5 – 66 kDa) e nos poços (b) e (l) encontram-se 10  $\mu$ l de marcadores de elevada massa molecular (36 – 205 kDa). Poço (c) 20  $\mu$ g de amostra 1; poço (d) 20  $\mu$ g de amostra 2; poço (e) 21,2  $\mu$ g de amostra 3; poço (f) 13,7  $\mu$ g de amostra 4; poço (g) 13,1  $\mu$ g de amostra 5; poço (h) 6,4  $\mu$ g de amostra 6; poço (i) 16,4  $\mu$ g de amostra 7 e poço (j) 20  $\mu$ g de F-actina.

### 3.1.3. Análise da actividade enzimática de S1

As actividades não-fisiológicas de S1, dependente de cálcio e de potássio,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase e  $\text{K}^+$ /EDTA-ATPase, respectivamente, indicam o estado em que se encontram as duas cisteínas mais reactivas da proteína, SH1 e SH2. Modificações (oxidação, por exemplo) no SH1 resultam na inibição da actividade da  $\text{K}^+$ /EDTA-ATPase e estimulação da actividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Neste caso, a actividade da  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase estimulada por F-actina é também inibida. Modificações no SH2 resultam na completa perda de todas as actividades ATPásicas de S1 (Sellers, 1999). As actividades não-fisiológicas de S1 foram determinadas pelo método de Fiske-Subarow, tal como foi descrito na

secção 3.2.5 dos Materiais e Métodos. Na figura 3.3, representam-se as nmol  $\text{PO}_4^{3-}$ /mg S1 em função do tempo de reacção para cada uma das actividades não-fisiológicas, a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Fig. 3.3.A) e a  $\text{K}^+$ /EDTA-ATPase (Fig. 3.3.B).

No caso da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, observa-se um aumento de  $\text{PO}_4^{3-}$ , que é libertado após hidrólise do ATP, até cerca de 10 min de reacção (Fig. 3.3.A). Após esse tempo, observa-se uma saturação na quantidade de fosfato libertado, indicativo de que ao fim de 10 min de reacção o ATP foi todo hidrolisado ficando o meio de reacção com uma quantidade de fosfato constante. Assim, através do declive inicial do gráfico da mesma figura e sabendo que por cada mol de ATP hidrolisada liberta-se uma mol de fosfato e outra de ADP, determinou-se a actividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase: 2220 nmol ATP/min.mg S1. Por outro lado, para a  $\text{K}^+$ /EDTA-ATPase ao fim de cerca de 5 min o ATP já foi todo hidrolisado (Fig. 3.3.B). Do mesmo modo, a actividade da  $\text{K}^+$ /EDTA-ATPase foi determinada através do declive inicial do gráfico: 3829 nmol ATP/min.mg S1. Assim, a actividade dependente de  $\text{K}^+$  é cerca de 2 vezes superior à actividade dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estes resultados reflectem a qualidade da preparação de S1, uma vez que preparações adequadas deste subfragmento de miosina possuem a actividade da  $\text{K}^+$ /EDTA-ATPase superior à actividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (Sellers, 1999).



**Figura 3.3.** Actividades não-fisiológicas de S1 determinadas pelo método de Fiske-Subarow (n=3). **(A)** Actividade da Ca<sup>2+</sup>-ATPase e **(B)** actividade da K<sup>+</sup>/EDTA-ATPase.

Sempre que foi necessário, nos estudos seguintes, determinar as actividades da Ca<sup>2+</sup>-ATPase e da K<sup>+</sup>/EDTA-ATPase, estas foram determinadas ao fim de 5 e 3 minutos de reacção, respectivamente, uma vez que para estes tempos é garantido que o ATP não foi ainda todo hidrolisado.

A actividade da Mg<sup>2+</sup>-ATPase estimulada por F-actina foi determinada pelo método das enzimas acopladas, como descrito na secção 2.3.5 dos Materiais e Métodos. A F-actina normalmente estimula a actividade da Mg<sup>2+</sup>-ATPase de miosina cerca de 50 a 100 vezes, dependendo das condições experimentais (Sellers, 1999). No método das enzimas acopladas a adição de F-actina origina um declive correspondente à actividade da Mg<sup>2+</sup>-ATPase estimulada por F-actina que, em média, foi  $1636 \pm 152$  nmol ATP/min.mg S1.

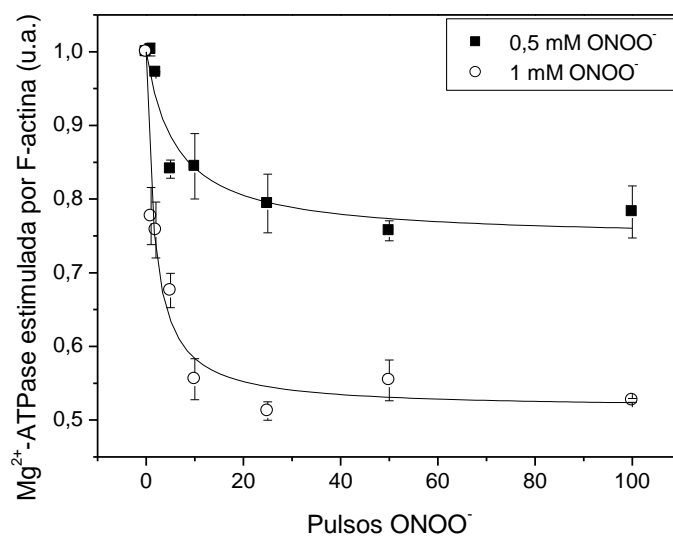
## 3.2. Tratamento de S1 com espécies oxidantes

### 3.2.1. Tratamento de S1 com peroxinitrito sintético

#### 3.2.1.1. Efeito de ONOO<sup>-</sup> nas actividades ATPásicas de S1

Simulou-se uma exposição aguda e crónica da proteína com ONOO<sup>-</sup>. O tratamento foi efectuado em tampão 0,5 M Tris pH 7,2 como descrito na secção 2.3.4 dos Materiais e Métodos. A elevada capacidade tampão usada justifica-se com o facto do ONOO<sup>-</sup> ter sido preparado em 1.5 M NaOH. Após o tratamento da proteína foram determinadas as actividades ATPásicas de S1: Ca<sup>2+</sup>-, K<sup>+</sup>/EDTA- e Mg<sup>2+</sup>-ATPase estimulada por F-actina, como descrito na secção 2.3.5 dos Materiais e Métodos. Os resultados obtidos encontram-se representados nas figuras 3.4. e 3.5.

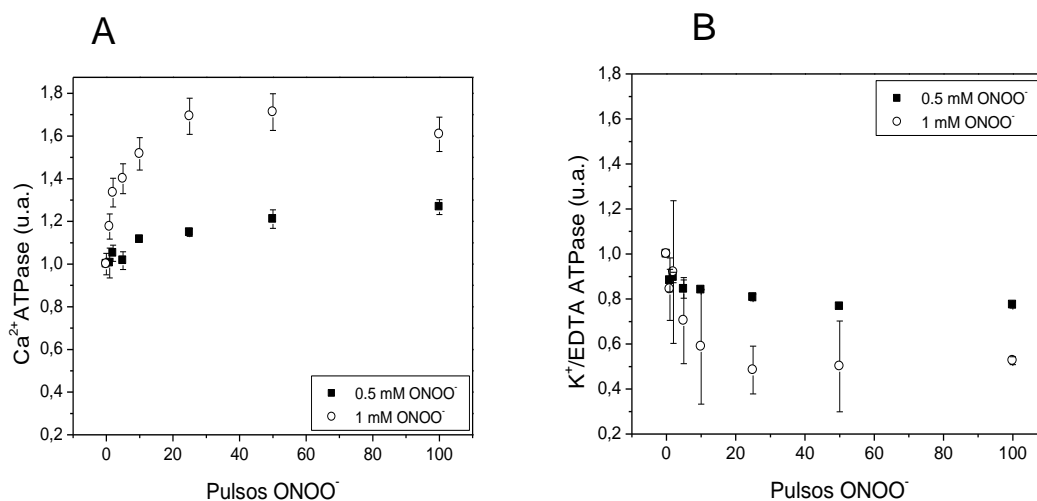
A actividade da Mg<sup>2+</sup>-ATPase estimulada por F-actina é mais eficientemente inibida para um maior número de pulsos de ONOO<sup>-</sup> (20 e 45% de inibição para 0,5 e 1 mM de ONOO<sup>-</sup>, respectivamente), simulando uma exposição crónica, do que para um único pulso de ONOO<sup>-</sup> (0 e 20% de inibição para 0,5 e 1 mM de ONOO<sup>-</sup>, respectivamente) simulando uma exposição aguda (Fig. 3.4). Assim, verifica-se que uma exposição crónica da proteína ao ONOO<sup>-</sup> é mais eficiente que uma exposição aguda, no que diz respeito à inibição da actividade fisiológica da proteína. Resultados semelhantes foram obtidos para a Ca<sup>2+</sup>-ATPase (uma proteína também muscular) de retículo sarcoplasmático, em que se verificou que a inibição da actividade da proteína era superior quando esta era sujeita a uma exposição crónica de ONOO<sup>-</sup> (Gutiérrez-Martin, 2002).



**Figura 3.4.** Actividade da  $Mg^{2+}$ -ATPase estimulada por F-actina após tratamento de 1 mg/ml de proteína com pulsos de  $ONOO^-$  em 0,5 M Tris pH 7,2 ( $n=2$ ) para (■) 0,5 mM de  $ONOO^-$  (1 pulso de 500  $\mu M$ , 2 pulsos de 250  $\mu M$ , 5 pulsos de 100  $\mu M$ , 10 pulsos de 50  $\mu M$ , 25 pulsos de 20  $\mu M$ , 50 pulsos de 10  $\mu M$  e 100 pulsos de 5  $\mu M$   $ONOO^-$ ) e (○) 1 mM de  $ONOO^-$  (1 pulso de 1 mM, 2 pulsos de 500  $\mu M$ , 5 pulsos de 200  $\mu M$ , 10 pulsos de 100  $\mu M$ , 25 pulsos de 40  $\mu M$ , 50 pulsos de 20  $\mu M$  e 100 pulsos de 10  $\mu M$  de  $ONOO^-$ ).

Em relação às actividades não-fisiológicas, a  $Ca^{2+}$ -ATPase é sempre activada, quer na presença de 0,5 ou 1 mM de  $ONOO^-$ , registando-se um máximo de 20 e 70% de activação, respectivamente (Fig. 3.5.A). Por sua vez, a  $K^+$ /EDTA-ATPase é sempre inibida, tanto na presença de 0,5 mM como de 1 mM de  $ONOO^-$ , registando-se uma inibição máxima na ordem dos 20 e 50%, respectivamente (Fig. 3.5.B). Como já foi anteriormente referido, se a actividade da  $Ca^{2+}$ -ATPase for estimulada e a actividade da  $K^+$ /EDTA-ATPase for inibida significa que o resíduo de cisteína reactivo SH1 está a ser modificado. Assim, de acordo com os resultados obtidos verifica-se que apenas o resíduo SH1 foi modificado (Fig. 3.5). No entanto, para um maior número de

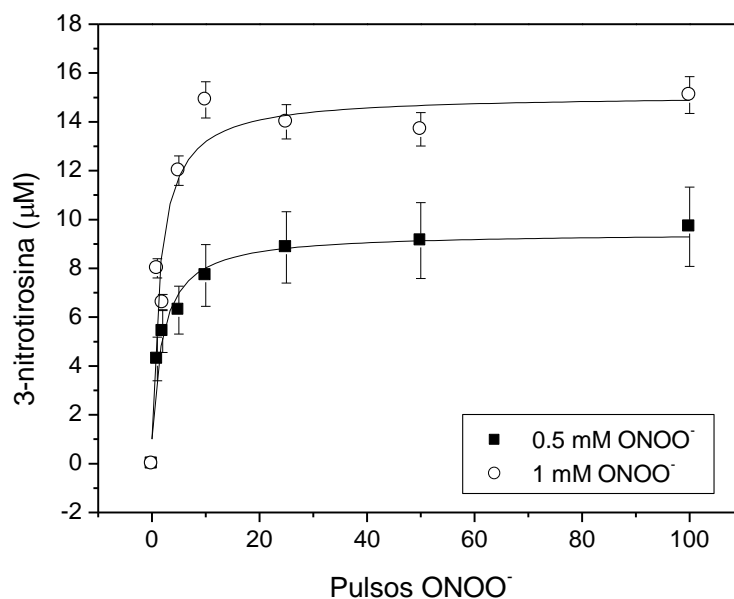
pulsos de  $\text{ONOO}^-$ , na situação de 1 mM, a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase começa a ser inibida, indicativo de que o resíduo SH2 começa a ser modificado (Fig. 3.5.A).



**Figura 3.5.** Atividades não fisiológicas de S1 (n=2). **(A)**  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase e **(B)**  $\text{K}^+$ /EDTA-ATPase. O tratamento ocorreu com 1 mg/ml de proteína e pulsos de  $\text{ONOO}^-$  em 0,5 M Tris pH 7,2 para (■) 0,5 mM de  $\text{ONOO}^-$  (1 pulso de 500  $\mu\text{M}$ , 2 pulsos de 250  $\mu\text{M}$ , 5 pulsos de 100  $\mu\text{M}$ , 10 pulsos de 50  $\mu\text{M}$ , 25 pulsos de 20  $\mu\text{M}$ , 50 pulsos de 10  $\mu\text{M}$  e 100 pulsos de 5  $\mu\text{M}$   $\text{ONOO}^-$ ) e (○) 1 mM de  $\text{ONOO}^-$  (1 pulso de 1 mM, 2 pulsos de 500  $\mu\text{M}$ , 5 pulsos de 200  $\mu\text{M}$ , 10 pulsos de 100  $\mu\text{M}$ , 25 pulsos de 40  $\mu\text{M}$ , 50 pulsos de 20  $\mu\text{M}$  e 100 pulsos de 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{ONOO}^-$ ).

### 3.2.1.2. Efeito de $\text{ONOO}^-$ na nitrosilação

Um dos parâmetros também analisados após o tratamento da proteína com pulsos de  $\text{ONOO}^-$  foi a existência, ou não, de nitrotirosinas. Tal como foi previamente referido o  $\text{ONOO}^-$  pode participar numa série de reacções químicas de carácter oxidativo. Por exemplo, possui uma elevada afinidade para nitrosilar resíduos de tirosina, em relação a outros oxidantes biológicos, resultando numa modificação pós-traducional destes resíduos em 3-nitrotirosina (Mihm, Coyle et al. 2001). Assim, quantificou-se a formação destes resíduos como descrito na secção 2.5 dos Materiais e Métodos e os resultados obtidos encontram-se na figura 3.6.

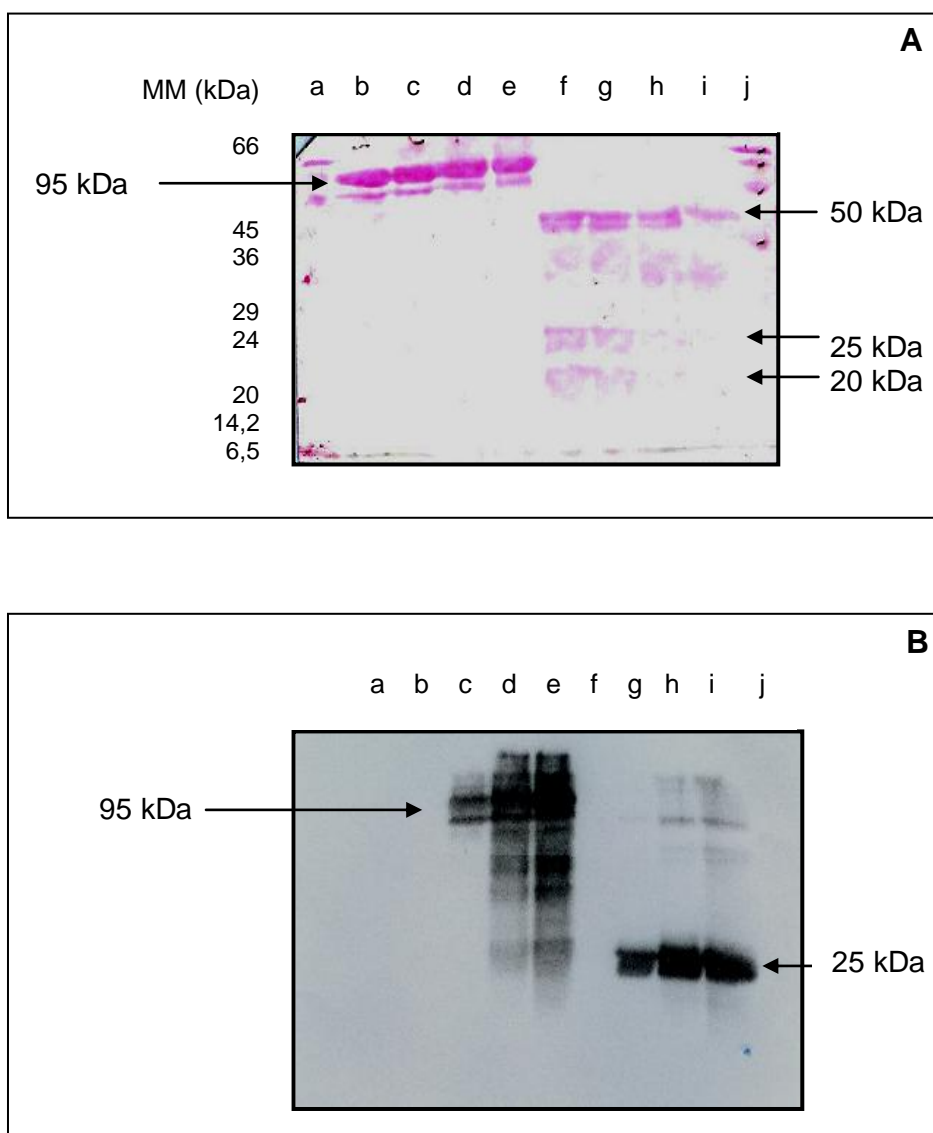


**Figura 3.6.** Nitrosilação de S1 (1 mg/ml ou 8.7 µM) após tratamento deste com pulsos de ONOO<sup>-</sup> em 0,5 M Tris pH 7,2 (n=2) para (■) 0.5 mM ONOO<sup>-</sup> (1 pulso de 500 µM, 2 pulsos de 250 µM, 5 pulsos de 100 µM, 10 pulsos de 50 µM, 25 pulsos de 20 µM, 50 pulsos de 10 µM e 100 pulsos de 5 µM ONOO<sup>-</sup>) e (○) 1 mM de ONOO<sup>-</sup> (1 pulso de 1 mM, 2 pulsos de 500 µM, 5 pulsos de 200 µM, 10 pulsos de 100 µM, 25 pulsos de 40 µM, 50 pulsos de 20 µM e 100 pulsos de 10 µM de ONOO<sup>-</sup>).

A espécie ONOO<sup>-</sup> origina a formação de 3-nitrotirosina no S1 de miosina. Assim, quando o S1 é tratado com 0.5 mM de ONOO<sup>-</sup> formam-se no máximo cerca de 9 µM de 3-nitrotirosina, ou seja, há um resíduo de tirosina nitrosilado por molécula de S1. Quando a proteína é exposta a 1 mM de ONOO<sup>-</sup> a concentração de 3-nitrotirosinas formadas sobe ligeiramente, em relação à situação anterior, registando-se uma concentração máxima de 15 µM de 3-nitrotirosina, ou seja, há aproximadamente dois resíduos de tirosina nitrosilados por molécula de S1 (Fig. 3.6).

Uma vez que se observou que o S1 de miosina sofre nitrosilação, após tratamento com a espécie  $\text{ONOO}^-$ , procurou-se determinar que domínios proteolíticos deste subfragmento eram mais nitrosilados (Fig. 3.7).

O anticorpo primário usado na imunodeteção é específico para 3-nitrotirosinas. Assim, só se vai ligar aos resíduos de tirosina nitrosilados de S1. A clivagem de S1 com tripsina origina três domínios distintos que constituem este subfragmento de miosina: um de 50 kDa, outro de 25 kDa e um último de 20 kDa (Fig. 3.7.A). Verifica-se que nos poços (b) e (f) não existe qualquer tipo de banda, visto as amostras contidas nestes poços não terem sido tratadas com  $\text{ONOO}^-$  (Fig. 3.7.B). Nos poços (c) a (e) observa-se uma banda intensa com 95 kDa correspondente ao S1 de miosina tratado com  $\text{ONOO}^-$  (Fig. 3.7.B). Por outro lado, cada um dos poços (g), (h) e (i) apresenta uma única banda bastante intensa com 25 kDa. Estes resultados indicam que, apenas o domínio de 25 kDa de S1 é nitrosilado (Fig. 3.7.B). Sugere-se que seja devido ao facto deste domínio possuir maior percentagem de resíduos de tirosina, 5%, contra 4,3 e 2,5% de resíduos de tirosina dos domínios de 50 e 20 kDa, respectivamente. Para além disso, possivelmente os resíduos de tirosina presentes no domínio de 25 kDa encontram-se mais expostos ao solvente, em relação aos outros dois domínios.



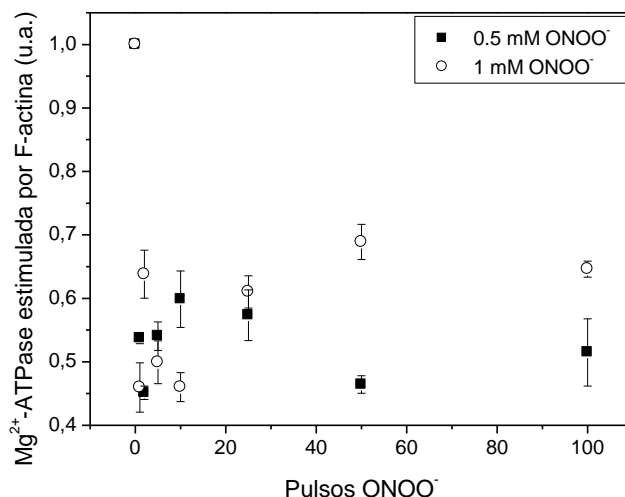
**Figura 3.7.** Detecção dos domínios de S1 nitrosilados. **(A)** Gel 12% SDS-PAGE com indicação do S1 (95 kDa) e dos seus três principais domínios proteolíticos (20, 25 e 50 kDa) e **(B)** “Immunoblot” correspondente ao gel SDS-PAGE. O S1 (1 mg/ml ou 8.7  $\mu$ M) foi tratado com pulsos de ONOO<sup>-</sup> em 0,25 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,2. Nos poços (a) e (j) estão 10  $\mu$ l de marcador de baixa massa molecular (6,5 – 66 kDa). Nos poços (b) e (f) estão 10  $\mu$ g de S1; nos poços (c) e (g) estão 10  $\mu$ g de S1 tratado com 100  $\mu$ M de ONOO<sup>-</sup> (25 pulsos de 4  $\mu$ M); nos poços (d) e (h) estão 10  $\mu$ g de S1 tratado com 500  $\mu$ M de ONOO<sup>-</sup> (25 pulsos de 20  $\mu$ M) e nos poços (e) e (i) estão 10  $\mu$ g de S1 tratado com 1 mM de ONOO<sup>-</sup> (25 pulsos de 40  $\mu$ M). As amostra dos poços (f) a (i) foram clivadas com tripsina.

### 3.2.1.3. Efeito do tampão fosfato no tratamento de S1 com ONOO<sup>-</sup>

O tratamento de S1 com pulsos de ONOO<sup>-</sup> foi também realizado em 0,25 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,2 como estudo controlo ao tratamento em tampão Tris. Resultados anteriormente descritos (Kirsch, 1998) revelam que, na presença de tampões aminados, como é o caso do tampão Tris, a espécie ONOO<sup>-</sup> reage com o tampão para formar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O mecanismo proposto para a formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> baseia-se na oxidação do grupo amina do tampão pelo ONOO<sup>-</sup>, através duma reacção que envolve um electrão, formando-se um radical  $\alpha$ -amino alquilo. Seguidamente ocorre a desprotonação deste radical que ao reagir com o oxigénio molecular leva à formação de  $\cdot\text{O}_2^-$  que, por dismutação origina o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kirsch, 1998).

As actividades não fisiológicas da proteína, Ca<sup>2+</sup>- e K<sup>+</sup>/EDTA-ATPase não podem ser determinadas em tampão fosfato uma vez que o método usado para a sua determinação (Fiske-Subarow) baseia-se na quantificação do fosfato libertado durante a hidrólise do ATP. Verifica-se que, quando a proteína é tratada com 500  $\mu\text{M}$  de ONOO<sup>-</sup> em tampão fosfato a actividade da Mg<sup>2+</sup>-ATPase estimulada por F-actina tem uma inibição máxima de aproximadamente 50% (Fig. 3.8). Esta inibição nunca foi atingida aquando do tratamento de S1 com pulsos de ONOO<sup>-</sup> (para a mesma concentração final de ONOO<sup>-</sup>) em tampão Tris, no qual se registou apenas 20% de inibição da actividade da Mg<sup>2+</sup>-ATPase estimulada por F-actina (Fig. 3.4). Deste modo, verifica-se que existe uma perda de eficiência da capacidade inibitória da espécie ONOO<sup>-</sup> quando o tratamento é realizado em tampão Tris, em comparação com o tratamento em tampão fosfato. Assim, a perda de eficiência da espécie ONOO<sup>-</sup> que se verificou no tratamento com tampão Tris poderá

então ser devida ao facto do  $\text{ONOO}^-$  estar a ser desviado para a reacção de formação de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



**Figura 3.8.** Actividade da  $\text{Mg}^{2+}$ ATPase estimulada por F-actina após tratamento de 1 mg/ml de proteína com pulsos de  $\text{ONOO}^-$  em 0,25 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7,2 (n=2) para (■) 0,5 mM de  $\text{ONOO}^-$  (1 pulso de 500  $\mu\text{M}$ , 2 pulsos de 250  $\mu\text{M}$ , 5 pulsos de 100  $\mu\text{M}$ , 10 pulsos de 50  $\mu\text{M}$ , 25 pulsos de 20  $\mu\text{M}$ , 50 pulsos de 10  $\mu\text{M}$  e 100 pulsos de 5  $\mu\text{M}$   $\text{ONOO}^-$ ) e (○) 1 mM de  $\text{ONOO}^-$  (1 pulso de 1 mM, 2 pulsos de 500  $\mu\text{M}$ , 5 pulsos de 200  $\mu\text{M}$ , 10 pulsos de 100  $\mu\text{M}$ , 25 pulsos de 40  $\mu\text{M}$ , 50 pulsos de 20  $\mu\text{M}$  e 100 pulsos de 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{ONOO}^-$ ).

#### 3.2.1.4. Efeito de bicarbonato no tratamento de S1 com $\text{ONOO}^-$

Em condições fisiológicas os radicais livres que derivam da reacção de  $\text{ONOO}^-$  com o  $\text{CO}_2$  ( $\text{CO}_3^{\cdot-}$  e  $\text{NO}_2^-$ ) são responsáveis pelo poder destrutivo do  $\text{ONOO}^-$  (Kirsch e De Groot, 2001). Por este motivo, neste trabalho foi realizado também o tratamento de S1 com pulsos de  $\text{ONOO}^-$  em 0,25 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7,2 com 25 mM  $\text{KHCO}_3$ . Verificou-se que não existiam diferenças nas inibições das actividades ATPásicas de S1 na presença de  $\text{KHCO}_3$  em relação aos resultados obtidos para as mesmas actividades mas sem  $\text{KHCO}_3$ .

### 3.2.2. Tratamento de S1 com SIN-1

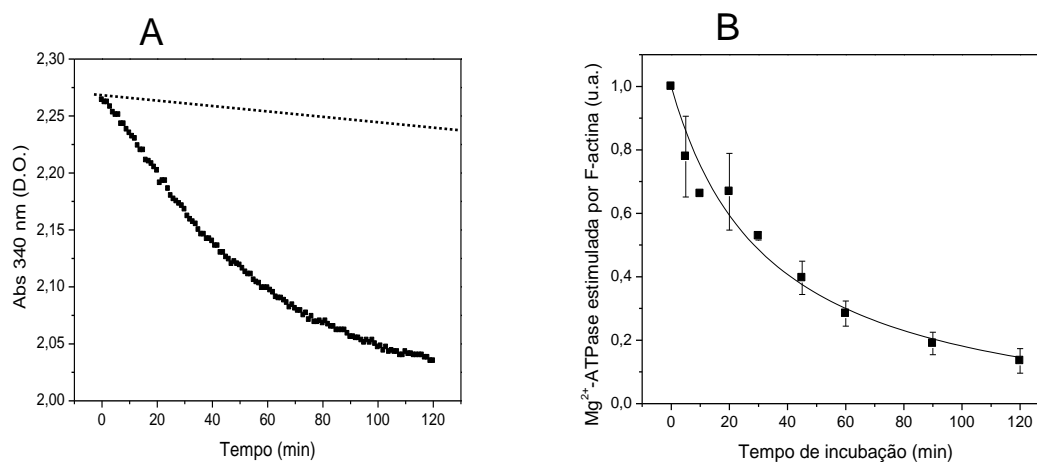
Após o tratamento de S1 com peroxinitrito sintético, verificou-se que uma exposição crónica da proteína a esta espécie era mais eficiente que uma exposição aguda, em termos de inibição da actividade da  $Mg^{2+}$ -ATPase estimulada por F-actina. Deste modo, de forma a melhor simular uma exposição crónica e aumentar assim a eficiência da reacção do  $ONOO^-$  com a proteína, minimizando perdas desta espécie reactiva, optou-se por prosseguir os estudos com o composto SIN-1. Como já foi referido anteriormente o SIN-1 é um composto químico que tem a capacidade de libertar de um modo contínuo e em simultâneo as espécies  $NO^-$  e  $\cdot O_2^-$  que ao reagirem entre si formam a espécie  $ONOO^-$ . Assim, ao usar o SIN-1 pretende-se simular uma situação em que a libertação de  $ONOO^-$  ocorre suavemente, como *in vivo*. Pretende-se também evitar eventuais erros que possam ocorrer associados a pipetagens de pequenos volumes aquando do tratamento de S1 com pulsos de  $ONOO^-$ , evitar os vortex entre os pulsos, bem como tornar o trabalho mais prático e rápido.

#### 3.2.2.1. Cinética de decomposição do composto SIN-1

De modo a determinar as condições de reacção adequadas para o tratamento da proteína com SIN-1, determinou-se primeiramente a cinética de decomposição deste composto através da oxidação do NADH.

Em soluções aquosas o NADH é oxidado pelo  $ONOO^-$  formando-se o radical  $NAD\cdot$  que rapidamente se converte em  $NAD^+$ . Deste modo, o NADH pode ser usado para seguir a cinética de libertação de  $ONOO^-$  após a decomposição de SIN-1. Resultados anteriores mostram que a oxidação do NADH pelo SIN-1 é devido à produção de  $ONOO^-$  e não às espécies  $\cdot O_2^-$  ou

NO<sup>•</sup> (Martin-Romero et al., 2004). Os resultados obtidos da cinética de decomposição do SIN-1, para as condições de reacção usadas, encontram-se a seguir na figura 3.9.



**Figura 3.9. (A)** Cinética de decomposição de SIN-1 determinada a 340 nm após a adição de 50  $\mu$ M SIN-1 a 10 mM Tris/25 mM KCl pH 8,5 contendo 375  $\mu$ M NADH. A linha a tracejado corresponde à auto-oxidação do NADH (n=1). **(B)** Actividade da Mg<sup>2+</sup>-ATPase estimulada por F-actina determinada ao longo da decomposição de SIN-1. O tratamento decorreu em 10 mM Tris/25 mM KCl pH 8,5 a 25 °C durante 2 h, com 1 mg/ml S1 e 50  $\mu$ M SIN-1. As amostras para a determinação da actividade da proteína foram recolhidas ao fim de 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90 e 120 min de reacção (n=2).

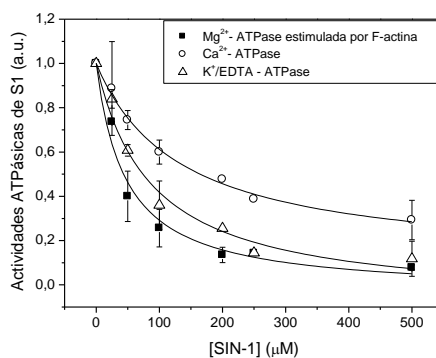
Para a determinação da cinética de decomposição do composto SIN-1 foram testadas diferentes condições, nomeadamente, a solução tampão (Tris e Hepes), o valor de pH (7.2, 8.0 e 8.5) e a temperatura (25 e 37 °C). Conclui-se que, para o sistema em estudo (S1 de miosina) e de modo a preservar a actividade da proteína, as condições mais adequadas para a decomposição de SIN-1 são, o tampão Tris, pH 8.5 a 25 °C. Deste modo a cinética de decomposição de SIN-1 foi determinada a 340 nm após a adição de 50  $\mu$ M

SIN-1 a 10 mM Tris/25 mM KCl pH 8,5 a 25 °C contendo 375  $\mu\text{M}$  NADH. O estudo controlo foi realizado seguindo a auto-oxidação do NADH a 340 nm.

Sabendo que o coeficiente de extinção molar do NADH a 340 nm é  $6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  e através dos valores de absorvências inicial e final retiradas do gráfico da figura 3.9.A determinou-se que ao fim de 2 h de reacção, 66% de 50  $\mu\text{M}$  SIN-1 se encontra decomposto. Comparando os gráficos A e B da figura 3.9 verifica-se que existe uma correlação entre a cinética de inibição da actividade da  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase estimulada por F-actina pelo SIN-1 e a cinética de oxidação do NADH pelo SIN-1, a qual é devido à produção de  $\text{ONOO}^-$ .

### 3.2.2.2. Efeito de SIN-1 nas actividades ATPásicas de S1

De acordo com os resultados anteriores, a exposição crónica da proteína ao  $\text{ONOO}^-$ , que se forma após decomposição do composto SIN-1, foi realizada em 10 mM Tris/25 mM KCl pH 8,5 a 25 °C durante 2 h. Neste tratamento já não é necessário uma capacidade tampão elevada visto o  $\text{ONOO}^-$  não estar em NaOH, como acontecia com o  $\text{ONOO}^-$  preparado sinteticamente. Concluído o tratamento determinou-se as actividades ATPásicas de S1 (Fig. 3.10) bem como os valores de  $\text{IC}_{50}$  para cada uma das actividades (Tab. 3.1).



**Figura 3.10.** Actividades ATPásicas de S1 (1 mg/ml ou 8.7  $\mu\text{M}$ ) após tratamento deste com SIN-1 em 10 mM Tris/25 mM KCl pH 8,5 a 25 °C durante 2 h (n=3).

O tratamento da proteína com SIN-1 inibiu sempre as suas actividades ATPásicas,  $\text{Ca}^{2+}$ -,  $\text{K}^+$ /EDTA- e  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase estimulada por F-actina, atingindo esta última os 90% de inibição para 500  $\mu\text{M}$  de SIN-1 (Fig. 3.10). Para além disso, o  $\text{IC}_{50}$  da inibição da actividade da  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase estimulada por F-actina (calculado a partir do gráfico da figura 3.10) mostra que com  $46,7 \pm 8,3 \mu\text{M}$  de SIN-1 para 8,7  $\mu\text{M}$  de S1 a actividade da proteína já está 50% inibida. Uma vez que a eficiência de decomposição de SIN-1 é 66%, o valor de  $\text{IC}_{50}$  da inibição da  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase estimulada por F-actina deverá ser corrigido. Assim, temos um  $\text{IC}_{50}$  para a inibição desta actividade de  $31 \pm 5 \mu\text{M}$  de SIN-1 para 8,7  $\mu\text{M}$  de S1.

O facto das duas actividades não-fisiológicas de S1,  $\text{Ca}^{2+}$ - e  $\text{K}^+$ /EDTA-ATPase, serem sempre inibidas indica que os dois resíduos de cisteína mais reactivos (SH1 e SH2) da proteína estão a ser modificados. Resultados semelhantes foram obtidos para a miosina extraída de músculos psoas (músculos abdominais) de coelho, em que se verificou oxidação do resíduo SH1 por parte de radicais livres, nomeadamente o radical  $\cdot\text{OH}$  (Konczol, et al., 1998). Mais ainda, foi também demonstrado que a actividade da creatina cinase (proteína também muscular) é inibida por radicais livres de oxigénio, através da modificação dos grupos  $-\text{SH}$  (Kaneko, Masuda, et al. 1993).

**Tabela 3.I.** Valores de  $\text{IC}_{50}$  das inibições das actividades ATPásicas de 8,7  $\mu\text{M}$  de S1 após tratamento com SIN-1 em 10 mM / 25 mM KCl pH 8,5 durante 2 h a 25 °C.

| Actividades ATPásicas de S1                    | $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) |
|--|------------------------------------|
| $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase estimulada por actina | $31,0 \pm 5,0$                     |
| $\text{Ca}^+$ -ATPase                          | $88,2 \pm 2,5$                     |
| $\text{K}^+$ /EDTA-ATPase                      | $57,4 \pm 3,8$                     |

Os valores de IC<sub>50</sub> das inibições das actividades Ca<sup>2+</sup>- e K<sup>+</sup>/EDTA-ATPase são próximos ao IC<sub>50</sub> da Mg<sup>2+</sup>-ATPase estimulada por F-actina, sugerindo assim que a modificação dos resíduos SH1 e SH2 contribui para o mecanismo de inibição da actividade da Mg<sup>2+</sup>-ATPase estimulada por F-actina. Esta observação foi confirmada através do ensaio com DTNB a 412 nm, o qual possibilita a determinação do número de resíduos de cisteína reduzidos que, por subtracção do número total de resíduos de cisteína origina o número de resíduos de cisteína oxidados (Tab. 3.II).

**Tabela 3.II.** Cisteínas reduzidas e totais quantificadas após ensaio com DTNB a 412 nm.

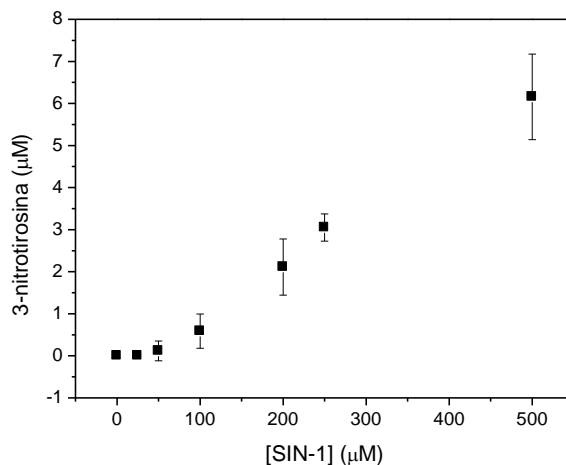
| Tratamento                   | Cisteínas rápidas | Cisteínas totais |
|------------------------------|-------------------|------------------|
| S1 controlo (sem tratamento) | 1,96 ± 0,41       | 10,08 ± 0,58     |
| S1 + 50 µM SIN-1             | 0,47 ± 0,12       | 6,62 ± 0,04      |
| S1 + 100 µM SIN-1            | 0,36 ± 0,01       | 5,60 ± 0,00      |
| S1 + 250 µM SIN-1            | 0,28 ± 0,03       | 3,98 ± 0,18      |
| S1 + 500 µM SIN-1            | 0,09 ± 0,00       | 2,58 ± 0,28      |

As cisteínas rápidas definem-se como aquelas que reagem com o DTNB em menos de 1 min, ou seja, as que estão expostas ao solvente. As cisteínas totais são as que reagem com o DTNB após a adição de SDS. O S1 possui aproximadamente 2 resíduos de cisteína expostos ao solvente (SH1 e SH2), num total de 10 (Tab. 3.II). Após o tratamento com DTNB verifica-se que, na presença de apenas 50 µM de SIN-1 (valor próximo do IC<sub>50</sub> da Mg<sup>2+</sup>-ATPase estimulada por F-actina), 75% dos resíduos de cisteína que se encontram expostos ao solvente já estão oxidados. Esta observação reforça a ideia de que a oxidação dos resíduos SH1 e SH2 contribui fortemente para o mecanismo de inibição da actividade fisiológica da proteína. Estes resultados mostram a elevada capacidade que a espécie ONOO<sup>-</sup>, que se forma após

decomposição de SIN-1, possui para oxidar resíduos de cisteína de S1. Resultados anteriormente descritos para a proteína  $\text{Ca}^{2+}\text{ATPase}$  (Gutiérrez-Martín et al., 2004) mostram que todos os resíduos de cisteína expostos ao solvente desta proteína de retículo sarcoplasmático são oxidados na presença de 1 mM de  $\text{ONOO}^-$ . De acordo com os resultados obtidos neste trabalho sugere-se que o S1 de miosina é mais sensível a oxidação por parte da espécie  $\text{ONOO}^-$ , que a  $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ , uma vez que apresenta todos os resíduos de cisteína rápidos oxidados apenas para 500  $\mu\text{M}$  de SIN-1.

### 3.2.2.3. Efeito de SIN-1 na nitrosilação de S1

A formação de 3-nitrotirosina foi também quantificada, após tratamento de S1 com SIN-1 (Fig. 3.11).



**Figura 3.11.** Nitrosilação de S1 (1 mg/ml ou 8,7  $\mu\text{M}$ ) após tratamento deste com SIN-1 em 10 mM Tris/25 mM KCl pH 8,5 durante 2 h a 25 °C (n=3).

A concentração de 3-nitrotirosina que se forma quando o S1 é tratado com SIN-1 é, no máximo, 7  $\mu\text{M}$  para 500  $\mu\text{M}$  de SIN-1, ou seja, aproximadamente um resíduo de tirosina nitrosilado por molécula de S1 (Fig.

3.11). Por outro lado, na presença de 100  $\mu\text{M}$  de SIN-1 há menos de 0,1 resíduos de tirosina nitrosilados por molécula de S1. Como se verificou anteriormente (Fig. 3.10), para 100  $\mu\text{M}$  de SIN-1 a  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase estimulada por F-actina já está cerca de 70% inibida. Assim, estes resultados sugerem que a nitrosilação não é o primeiro contributo para o mecanismo de inibição da actividade da  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase estimulada por F-actina.

#### 3.2.2.4. Efeito do $\text{NO}\cdot$ na actividade da $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase estimulada por F-actina

Neste trabalho, determinou-se também se a inibição da actividade da  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase estimulada por F-actina na presença de SIN-1 poderia ser devido à espécie  $\text{NO}\cdot$ , uma vez que esta é um dos produtos de decomposição de SIN-1. Assim, incubou-se a proteína com SIN-1 (50 e 200  $\mu\text{M}$ ) juntamente com 3000 unidades de SOD (elimina o  $\cdot\text{O}_2^-$  libertado pelo SIN-1) e 1500 unidades de CAT (elimina o  $\text{H}_2\text{O}_2$  que eventualmente se forma da reacção do SIN-1 com o tampão) em 10 mM Tris/25 mM KCl, pH 8,5 durante 2 h a 25 °C e determinou-se a actividade fisiológica da proteína. Verificou-se que a espécie  $\text{NO}\cdot$  não inibe a actividade  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase estimulada por F-actina de S1.

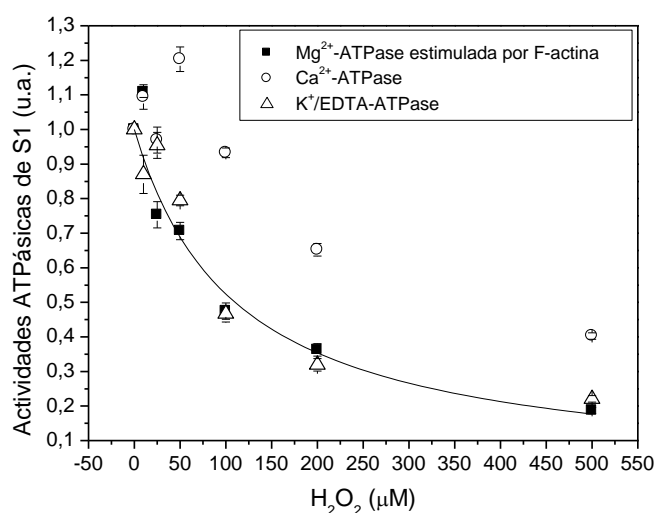
#### 3.2.2.5. Efeito dos produtos de decomposição de SIN-1

Foi também determinado neste trabalho se a inibição da actividade da  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase estimulada por F-actina poderia ser devida aos produtos de decomposição do  $\text{ONOO}^-$  ( $\text{HO}\cdot$  e  $\text{NO}_2$ ) obtido através do composto SIN-1. Assim, incubou-se o SIN-1 em 10 mM Tris/25 mM KCl pH 8,5 a 25 °C durante 4 h (para garantir a máxima decomposição de SIN-1) e após esse tempo adicionou-se o S1 e incubou-se novamente durante 2 h. Seguidamente

determinou-se a actividade da  $Mg^{2+}$ -ATPase estimulada por F-actina e verificou-se que esta mantinha a sua actividade, sugerindo assim que os produtos de decomposição do  $ONOO^-$  não inibem a actividade de S1. Verificou-se também que os produtos de decomposição da espécie  $ONOO^-$  não originam formação de 3-nitrotirosina no S1.

### 3.2.2.6. Tratamento de S1 com peróxido de hidrogénio

De modo a provar que as inibições das actividades ATPásicas de S1 não eram devidas ao  $H_2O_2$ , que eventualmente se forma após reacção do  $ONOO^-$  (após decomposição de SIN-1) com o tampão Tris, fez-se um estudo controlo no qual se expôs a proteína a  $H_2O_2$ . Como já foi referido anteriormente, na presença de tampões aminados, o SIN-1 reage com o tampão formando-se  $H_2O_2$  (Kirsch, 1998). Após o tratamento da proteína com  $H_2O_2$  determinou-se as suas três actividades (Fig. 3.12).



**Figura 3.8.** Actividades de S1 ( $Ca^{2+}$ ,  $K^+/EDTA$  e  $Mg^{2+}$ -ATPase estimulada por actina) após tratamento deste com  $H_2O_2$  em 10 mM Tris/25 mM KCl pH 8,5 durante 2h a 25 °C (n=3).

Quando o S1 é exposto a concentrações inferiores a 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a actividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase é ligeiramente activada e quando é exposto a concentrações superiores a 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  é sempre inibida, atingindo os 60% de inibição. Por outro lado, as actividades da  $\text{K}^+$ /EDTA e da  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase estimulada por F-actina são sempre inibidas quando a proteína é tratada com  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Esta inibição, em ambos os casos, atinge um máximo de 80% (Fig. 3.8). No entanto, comparando o valor de  $\text{IC}_{50}$  da inibição da  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase estimulada por F-actina na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (111,4  $\mu\text{M}$  para 8,7  $\mu\text{M}$  de S1) com o valor de  $\text{IC}_{50}$  da mesma actividade mas na presença de SIN-1 (31,0  $\pm$  5,0  $\mu\text{M}$  para 8,7  $\mu\text{M}$  de S1), verifica-se que é necessário cerca de 4 vezes mais  $\text{H}_2\text{O}_2$  que SIN-1 para a mesma percentagem de inibição. Assim, a inibição das actividades ATPásicas de S1 é devido ao  $\text{ONOO}^-$  e não ao  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

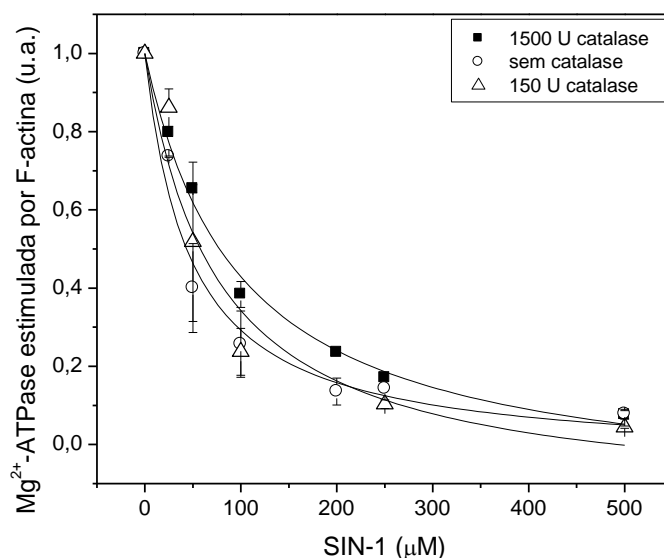
Em todo o caso, para garantir a remoção do eventual  $\text{H}_2\text{O}_2$  que se forma após a reacção do SIN-1 com o tampão, adicionou-se catalase ao tratamento de S1 com SIN-1. Antes de qualquer tratamento foi feito um estudo controlo com catalase para garantir que esta enzima mantém actividade ao fim de 2 h de incubação a 25  $^\circ\text{C}$  na presença de SIN-1. Assim, determinou-se a actividade de eliminação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de 1 unidade de catalase em 10 mM Tris/25 mM KCl pH 8,5 na presença de 15 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a 240 nm. A actividade da proteína foi determinada novamente após incubação desta a 25  $^\circ\text{C}$  durante 2 h. A mesma actividade foi ainda determinada após incubação com 500  $\mu\text{M}$  de SIN-1 (Tab. 3.III).

**Tabela 3.III.** Actividade (%) de 1 unidade de catalase determinada antes e após 2 h de incubação a 25 °C, bem com na presença de 500 µM de SIN-1.

| Condições do tratamento  | Actividade (%) |
|--|----------------|
| 1 unidade CAT<br>15 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub><br>10 mM Tris/25 mM KCl pH 8,5<br>Antes incubação 25 °C 2h                | 100            |
| 1 unidade CAT<br>15 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub><br>10 mM Tris/25 mM KCl pH 8,5<br>Após incubação 25 °C 2h                 | 67             |
| 1 unidade CAT<br>15 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub><br>10 mM Tris/25 mM KCl pH 8,5<br>500 µM SIN-1<br>Após incubação 25 °C 2h | 40             |

Verifica-se que a catalase mantém actividade após incubação a 25 °C durante 2 h. Na presença de SIN-1 a actividade da catalase é reduzida para 60% (Tab. 3.III), o que sugere que esta proteína é também alvo de oxidação por parte da espécie ONOO<sup>-</sup>. Nos tratamentos seguintes de S1 com SIN-1 foram usadas 150 e 1500 unidades de catalase que serão suficientes para compensar a baixa actividade da proteína na presença de SIN-1. Deste modo, comparou-se os resultados da actividade da Mg<sup>2+</sup>-ATPase estimulada por F-actina bem como a concentração de 3-nitrotirosina nas seguintes condições: tratamento de S1 com SIN-1 sem catalase, com 150 e com 1500 unidades de catalase (Fig. 3.9 – 3.11). Calculou-se também os valores de IC<sub>50</sub> nas três condições dos tratamentos (Tab. 3.IV).

Verifica-se um comportamento semelhante da inibição da actividade da Mg<sup>2+</sup>-ATPase estimulada por F-actina para os três tratamentos realizados (Fig. 3.9).



**Figura 3.9.** Actividade da  $Mg^{2+}$ -ATPase estimulada por F-actina após o tratamento de 1 mg/ml S1 com SIN-1 em 10 mM Tris/25 mM KCl pH 8,5 durante 2 h a 25 °C . O tratamento decorreu na (○) ausência (n=3) e presença de (△) 150 (n=2) e (■) 1500 U de catalase (n=2).

Os valores de  $IC_{50}$  das inibições da actividade da  $Mg^{2+}$ -ATPase estimulada por F-actina são próximos entre si, tanto na ausência como na presença de catalase (Tab. 3.IV), e de acordo com os resultados da figura 3.9 sugere-se que a concentração de  $H_2O_2$  que eventualmente se forma é baixa e que a inibição da actividade da  $Mg^{2+}$ -ATPase estimulada por F-actina é devida ao  $ONOO^-$  e não ao  $H_2O_2$ .

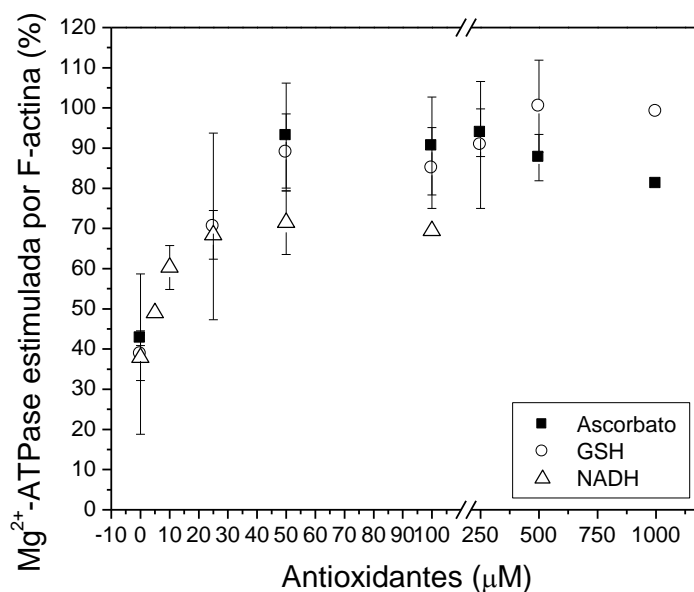
**Tabela 3.IV.** Valores de  $IC_{50}$  da inibição da actividade da  $Mg^{2+}$ -ATPase estimulada por F-actina de 8,7 µM de S1, após tratamento com SIN-1 em 10 mM / 25 mM KCl pH 8,5 durante 2 h a 25 °C, na ausência e presença de catalase (150 e 1500 U).

| Actividade $Mg^{2+}$ -ATPase estimulada por F-actina | $IC_{50}$ (µM)  |
|--|-----------------|
| sem catalase   | $31,0 \pm 5,0$  |
| 150 U catalase                                       | $50,0 \pm 12,9$ |
| 1500 U catalase                                      | $65,1 \pm 7,3$  |

Verifica-se que, apesar dos valores de  $IC_{50}$  das inibições da actividade da  $Mg^{2+}$ -ATPase estimulada por F-actina serem próximos entre si, há um aumento destes valores à medida que se passa do tratamento sem catalase para o tratamento com 150 e 1500 unidades de catalase (Tab. 3.IV). Estes resultados sugerem que está a ocorrer uma competição entre a catalase e o S1 de miosina para o  $ONOO^-$ , mostrando mais uma vez que a catalase é também um alvo de oxidação para esta espécie reactiva.

### **3.3. Protecção com agentes antioxidantes**

A glutathiona reduzida (GSH) tem sido descrita como um agente protector contra o  $ONOO^-$  (Gutiérrez-Martín, 2002). Para além deste há outros antioxidantes também já testados na protecção contra o  $ONOO^-$ , nomeadamente o ascorbato e o NADH (Gutiérrez-Martín, 2004). Assim, neste trabalho estudou-se os efeitos protectores destes três agentes antioxidantes na inibição da actividade da  $Mg^{2+}$ -ATPase estimulada por F-actina, provocada pelo SIN-1 (Fig. 3.10), bem como na formação de 3-nitrotirosina.



**Figura 3.10.** Protecção com agentes antioxidantes (n=2). O S1 (1 mg/ml) foi tratado com diferentes concentrações de antioxidantes, nomeadamente, ascorbato (50, 100, 250, 500 e 1000  $\mu$ M), GSH (25, 50, 100, 250, 500 e 1000  $\mu$ M) ou NADH (5, 10, 25, 50 e 100  $\mu$ M) e 50  $\mu$ M SIN-1 em 10 mM Tris/25 mM KCl pH 8,5 durante 2 h a 25  $^{\circ}$ C.

Os três agentes antioxidantes usados na protecção contra o  $\text{ONOO}^-$  protegem contra os efeitos do  $\text{ONOO}^-$  na inibição da actividade da  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase estimulada por F-actina. No caso da GSH e do ascorbato verificou-se uma protecção total da actividade da  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase estimulada por F-actina, quando o S1 é exposto a 50  $\mu$ M SIN-1, uma vez que ambos elevaram a actividade entre 90 e 100%, para 50  $\mu$ M de GSH ou ascorbato. Por outro lado, a protecção com NADH foi parcial, uma vez que este antioxidante elevou a actividade da  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase estimulada por F-actina até cerca de 70%, para 25  $\mu$ M de NADH (Fig. 3.10) Estes resultados estão de acordo com outros anteriormente obtidos para a proteína de retículo sarcoplasmático,  $\text{Ca}^{2+}$ ATPase (Gutiérrez-Martín et al., 2004).

Em relação à nitrosilação todos os antioxidantes estudados neste trabalho revelaram-se bastante eficientes, uma vez que quando o S1 foi tratado com SIN-1 na presença destes não se observou formação de 3-nitrotirosina.

A adição de antioxidantes após o tratamento de S1 com SIN-1 teve como objectivo averiguar a possibilidade de reversão dos efeitos do ONOO<sup>-</sup> na proteína. Assim, após o tratamento de 1 mg/ml S1 com 50 µM SIN-1 durante 2 h, adicionou-se antioxidantes (1 mM ascorbato, 2 mM GSH e 50 µM NADH) e incubou-se durante mais 1 h a 25 °C. Seguidamente, determinou-se a actividade da Mg<sup>2+</sup>-ATPase estimulada por F-actina e verificou-se, na presença de qualquer um dos três antioxidantes, 0% de reversão da inibição desta actividade provocada pelo SIN-1. Resultados semelhantes foram anteriormente também obtidos para a proteína Ca<sup>2+</sup>ATPase (Gutiérrez-Martín et al., 2002).

## 4. Conclusões

- ◆ O peroxinitrito sintético inibe a actividade da  $Mg^{2+}$ -ATPase estimulada por F-actina de S1 de miosina sendo a exposição crónica da proteína a esta espécie mais eficiente que a exposição aguda.
- ◆ A exposição crónica de peroxinitrito, formado após decomposição de SIN-1, inibe a actividade da  $Mg^{2+}$ -ATPase estimulada por F-actina com um  $IC_{50}$  de  $31,0 \pm 5,0 \mu M$  de SIN-1 para  $8,7 \mu M$  de S1 e atinge um máximo de 90% de inibição para  $500 \mu M$  de SIN-1.
- ◆ Os valores de  $IC_{50}$  das inibições das actividades  $Ca^{2+}$ -ATPase ( $88,2 \pm 2,5 \mu M$ ) e  $K^+$ /EDTA-ATPase ( $57,4 \pm 3,8 \mu M$ ), provocados pelo SIN-1, são próximos ao  $IC_{50}$  da  $Mg^{2+}$ -ATPase estimulada por F-actina ( $31,0 \pm 5,0 \mu M$ ), indicando que a modificação dos resíduos SH1 e SH2 contribui para o mecanismo de inibição da actividade da  $Mg^{2+}$ -ATPase estimulada por F-actina, facto confirmado através do ensaio com DTNB.
- ◆ Embora não seja provável que contribua para o mecanismo de inibição da actividade  $Mg^{2+}$ -ATPase estimulada por F-actina, uma vez que menos de 0,1 resíduos de tirosina são nitrosilados, por molécula de S1, para concentrações de SIN-1 que inibem cerca de 70% desta actividade, a nitrosilação do subfragmento-1 de miosina ocorre no domínio de 25 kDa.

- ◆ Os agentes antioxidante GSH, ascorbato e NADH, mostraram-se eficientes na protecção contra os efeitos do  $\text{ONOO}^-$ , elevando a actividade da  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase estimulada por F-actina entre 70 e 100%. Estes antioxidantes protegeram também contra a formação de 3-nitrotirosinas. Assim, os efeitos do peroxinitrito apenas se manifestarão em condições pato-fisiológicas nas quais exista deficiência de antioxidantes intracelulares.
  
- ◆ Deste modo, os resultados obtidos indicam que o subfragmento-1 de miosina de músculo esquelético de coelho é sensível a concentrações fisiologicamente relevantes de  $\text{ONOO}^-$ .

## 5. Estudos futuros

No sentido de melhor esclarecer o mecanismo de inibição da actividade da  $Mg^{2+}$ -ATPase estimulada por F-actina pela espécie  $ONOO^-$ , sugere-se como estudos futuros:

- ◆ Quantificação da formação de carbonilos no subfragmento-1 de miosina através do reagente DNPH a 358 nm e sua posterior detecção por um método que combina o reagente biotina-hidrazida com a electroforese bidimensional (2D) em géis de agarose para a electroforese por focagem isoeléctrica (IEF);
- ◆ Detecção de resíduos de triptofano oxidados através de variações da fluorescência ( $\lambda_{exc} = 325$  nm e  $\lambda_{emis} = 410$  nm);
- ◆ Efeito da espécie  $\cdot O_2^-$  nas actividades ATPásicas de S1.
- ◆ Efeito da incubação de diferentes espécies de vanadato na actividade da proteína tratada com  $ONOO^-$ ;
- ◆ Identificação de glutationilação no subfragmento-1 de miosina através da marcação radioactiva da GSH intracelular com L-[ $^{35}S$ ] cisteína (cultura de células).
  
- ◆ Sugere-se também a determinação da susceptibilidade da actina à espécie  $ONOO^-$  e conseqüente determinação de eventuais efeitos que possam ocorrer, após o tratamento da proteína, na actividade da  $Mg^{2+}$ -ATPase estimulada por F-actina. Este estudo poderá também ser feito para o complexo acto-miosina.

## 6. Bibliografia

- ◆ Azevedo, C. (1999) *Biologia Celular e Molecular*, 3ª edição, Lidel, edições técnicas.
- ◆ Babior, B. M. (2000) The NADPH oxidase of endothelial cells. *IUBMB Life* **50**:267.
- ◆ Bannister, J. V.; Bannister, W. H.; Rotilio, G. (1987) Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *Critic. Rev. Biochem.* **22**:111.
- ◆ Beckman, J. S.; Chen, J.; Ischiropoulos H.; Crow, J. P. (1994) Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Meth. Enzymol.* **233**:229.
- ◆ Beckman, K. B.; Ames, B. N. (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* **78**(2):547.
- ◆ Berlett, B. S.; Stadtman, E. R. (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **272**(33):20313.
- ◆ Blokhina, O.; Virolainen, E.; Fagerstedt, K. V. (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals Bot.* **91**:179.
- ◆ Bowler, C.; Van Montagu, M.; Inze, D. (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molecl. Biol* **43**:83.
- ◆ Bradley, R.; Fell, B. F. (1980) Myopathies in animals in *Disorders of voluntary muscle*, 3<sup>rd</sup> edition, Churchill Livingstone, London.
- ◆ Coon, M. J.; Ding, X.; Pernecky, S. J.; Vaz, A. D. N. (1992) Cytochrome P450: progress and predictions. *FASEB J.* **6**:669.
- ◆ Dringen, R.; (2000) Glutathione metabolism and oxidative stress in neurodegeneration. *Eur. J. Biochem.* **267**(16):4903.

- ◆ Dunn, J. F.; Frostick, S.; Brown, G.; Radda, G. K. (1991) Energy status of cells lacking dystrophin: an in vivo/in vitro study of mdx mouse skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* **1096**:115.
- ◆ Ferdinandy, P.; Danial, H.; Ambrus, I.; Rothery, R. A.; Schulz, R. (2000) Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure. *Circ. Res.* **87**:241.
- ◆ Floyd, R. A.; West, M.; Hensley, K. (2001) Oxidative biochemical markers; clues to understanding aging in long-lived species. *Exp. Gerontol.* **36**:619.
- ◆ Frei, B. (1999) Molecular and biological mechanisms of antioxidant action. *Faseb J.* **13**(9):963.
- ◆ Fridovich, I.; (1978) The biology of oxygen radicals. *Science* **201**(4359):875.
- ◆ Gutiérrez-Martín, Y.; Martín-Romero, F. J.; Henao, F.; Gutiérrez-Merino, C. (2002) Synaptosomal plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump activity inhibition by repetitive micromolar  $\text{ONOO}^-$  pulses. *Free Radic. Biol. Med.* **32**(1):46.
- ◆ Gutiérrez-Martín, Y.; Martín-Romero, F. J.; Iñesta-Vaquera, F. A.; Gutiérrez-Merino, C.; Henao, F. (2004) Modulation of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase by chronic and acute exposure to peroxynitrite. *Eur. J. Biochem.* **271**:1.
- ◆ Gutierrez-Merino, C. (1987) Gel to liquid crystalline phase transition promotes a conformational reorganization of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase from sarcoplasmic reticulum in dimyristoylphosphatidylcholine reconstituted systems. *Arch. Biochem. Biophys.* **252**:303.
- ◆ Gutteridge, J. M.; Halliwell, B. (2000) Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **899**:136.

- ◆ Halliwell, B. H.; Gutteridge, J. M. C. (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford, UK, Oxford Univ. Press.
- ◆ Haycock, J. W.; Jones, P.; Harris, J. B.; Mantle, D. (1996) Differential susceptibility of human skeletal muscle proteins to free radical induced oxidative damage: a histochemical, immunocytochemical and electron microscopical study in vitro. *Act. Neuropathol. (Berl)* **92**(4):331.
- ◆ Hunter, T. (1995) Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signalling. *Cell* **80**:225.
- ◆ Ischiropoulos, H.; Beckman, J. S. (1992) Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* **298**:431.
- ◆ Ischiropoulos, H.; Beckman, J. S. (2003) *FEBS* **364**:279.
- ◆ Josephy, P. D. (1997) *Molecular Toxicology*, Oxford University Press.
- ◆ Kaneko, M., Masuda, H., Suzuki, H., Matsumoto, Y., Kobayashi, A.; Jamuzaki, N. (1993) Modification of contractile proteins by oxygen free radicals in rat heart. *Mol. Cell. Biochem.* **125**:163.
- ◆ Kirsch, M.; Lomonosova, E. E.; Korth, H. G.; Sustmann, R.; De Groot, H. (1998) Hydrogen peroxide formation by reaction of peroxynitrite with HEPES and related tertiary amines. Implications for a general mechanism. *J. Biol. Chem.* **273**(21):12716.
- ◆ Kirsch, M.; De Groot, H. (2001) NAD(P)H, a directly operating antioxidant? *Faseb J.* **15**(9):1569.
- ◆ Klein, A.; Ackerman, S. (2003) Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *J. Clin. Invest.* **111**:785.

- ◆ Konczol, F.; Lorinczy, D.; Belagy, J. (1998) Effect of free radicals on myosin in muscle fibres. *FEBS Lett.* **427**:341.
- ◆ Kunsch, C.; Medford, R. M. (1999) Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ. Res.* **85**:753.
- ◆ Liochev, S. I.; Fridovich, I. (1999) Superoxide and iron: partners in crime. *IUBMB Life* **48**:157.
- ◆ Lymn, R. W.; Taylor, E. W. (1971) Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. *Biochem.* **10**(25):4617.
- ◆ Lodish, H.; Berck, A.; Zipursky, S. L.; Matsudaira, P.; Baltimore, D.; Darnell, J. (2000) *Molecular Cell Biology*, fourth edition, W. H. Freeman and Company.
- ◆ Lorinczy, D.; Gaszner, B.; Könczöl, F.; Belágyi, J. (2000) *Egypt. J. Biophys.*, in press.
- ◆ Martin-Romero, F. J.; Gutiérrez-Martín, Y.; Henao, F.; Gutiérrez-Merino, C. (2004) Fluorescence measurements of steady state peroxynitrite production upon SIN-1 decomposition: NADH versus dihydrodichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123. *J. Fluoresc.* **14**:1.
- ◆ Mihm, M. J.; Coyle, C.; Schanbacher, B. L.; Weinstein, D. W.; Bauer, J. A. (2001) Peroxynitrite induced nitration and inactivation of myofibrillar creatine kinase in experimental heart failure. *Cardiovasc. Res.* **49**:798.
- ◆ Mihm, M. J.; Yu, F.; Carnes, C. A.; Reiser, P. J.; McCarthy, P. M.; Van Wagoner, D. R.; Bauer, J. A. (2001) Impaired myofibrillar energetics and oxidative injury during human atrial fibrillation. *Circulat.* **104**(2):174.

- ◆ Mihm, M. J.; Yu, F.; Reiser, P. J.; Bauer, J. A. (2003) Effects of peroxynitrite on isolated cardiac trabeculae: selective impact on myofibrillar energetic controllers. *Biochim.* **85**:587.
- ◆ Margossian, S. S.; Lowey, S. (1982) Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle. *Meth. Enzym.* **85**:55.
- ◆ Nagasawa, T.; Hatayama, T.; Watanabe, Y.; Tanaka, M.; Niisato, Y.; Kitts, D. D. (1997) Free radical-mediated effects on skeletal muscle protein in rats treated with Fe-nitritotriacetate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **231** (1):37.
- ◆ Pardee, J. D.; Spudich, J. A. (1982) Purification of muscle actin. *Meth. Enzym.* **85**:164.
- ◆ Purves, W. K.; Sadava, D.; Orians, G. H.; Heller, H. C. (2003) The Science of Biology, 7<sup>th</sup> edition, Sinauer Associates Inc. Publishers.
- ◆ Rayment, I. (1996) The structural basis of the myosin ATPase activity. *The Amer. Soc. Biochem. Mol. Biol.* **271**:15850.
- ◆ Robyt, J. F.; White, B. J. (1990) Biochemical Techniques Theory and Practice, Waveland Press, Inc.
- ◆ Schulz, J. B.; Lindenau, J.; Seyfried, J.; Dichgans, J. (2000) Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur. J. Biochem.* **267**(16):4904.
- ◆ Sellers, J. R. (1999) *Myosins*, second edition, Oxford University Press.
- ◆ Sheterline, P.; Clayton, J.; Sparrow, J. C. (1998) *Actin*, fourth edition, Oxford University Press.
- ◆ Sies, H. (1982) Nicotinamide nucleotide compartmentation in *Metabolic Compartmentation*, Academic Press, London.

- ◆ Singh, N.; Dhalla, A. K.; Seneviratane, C. (1995) Oxidative stress and heart failure. *Mol. Cell. Biochem.* **147**:77.
- ◆ Spudich, J. (1994) How molecular motors work. *Nature* **372**:515.
- ◆ Stadtman, E. R.; Oliver, C. N. (1991) Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J. Biol. Chem.* **266**:2005.
- ◆ Stamler, J. S.; Single, D.; Loscalzo, J. (1992) Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* **258**:1898.
- ◆ Turrens, J. F. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* **552** :335.
- ◆ Vignais, P. V. (2002) The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol. Life Sci.* **59**:1428.
- ◆ Vliet, A.; Eiserich, J. P.; Shigenaga, M. K.; Cross, C. E. (1999) Reactive nitrogen species and tyrosine nitration in the respiratory tract: epiphenomena or a pathobiologic mechanism of disease? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **160**:1.
- ◆ Voet, D.; Voet, J. G. (1995) *Biochemistry*, second edition, John Wiley & Sons, Inc.
- ◆ Waterlow, J. C., Garlick, P. J.; Millward, D. J. (1978) *Protein Turnover in Mammalian Tissues and Whole Body*, North-Holland Publishing.
- ◆ Weinstein, D. M.; Mihm, M. J.; Bauer, J. A. (2000) Cardiac peroxynitrite formation and left ventricular dysfunction following doxorubicin treatment in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **294**:396.
- ◆ Wilson, K.; Walker, J. (1997) *Principles and Techniques of Practical Biochemistry*, fourth edition, Cambridge University Press.

- ◆ Yokoyama, Y.; Beckman, J. S.; Beckman, T. K.; Wheat, J. K.; Cash, T. G.; Freeman, B. A.; Parks, D. A. (1990) Circulating xanthine oxidase: potential mediator of ischemic injury. *Am. J. Physiol.* **258**:G564.
- ◆ Zhou, Z.; Sun, X.; James, Y. (2002) Metallothionein protection against alcoholic liver injury through inhibition of oxidative stress. *Exp. Biol. Med.* **227**(3):214.

## Anexos

### I

#### **INHIBITION OF SKELETAL MUSCLE S1-MYOSIN ATPase ACTIVITY BY THE PEROXYNITRITE-RELEASING AGENT SIN-1**

T. TIAGO<sup>(1)</sup>, S. SIMÃO<sup>(1)</sup>, M. AURELIANO<sup>(1)</sup>, F.J. MARTÍN-ROMERO<sup>(2)</sup> and C. GUTIÉRREZ MERINO<sup>(2)</sup>

(1) CBME, Depto. Química e Bioquímica, FCT, Universidade do Algarve, 8000 Faro, Portugal;(2) Depto. Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, 06071-Badajoz.

Impairment of muscle excitation-contraction has been reported upon exposure of muscle cells to chronic oxidative stress conditions, and it has been proposed that it is, at least in part, the result of oxidative modification of myofibril proteins [Mihm *et al.* (2001) *Circulation* 104:174-180; Canton *et al.* (2004) *Am. J. Physiol.* 286:H870-H877]. In this work, we have studied the sensitivity of S1-myosin (head segment of myosin responsible for the ATPase activity during muscle contraction) to the oxidative stress generated upon exposure to SIN-1, which slowly releases nitric oxide and superoxide anion and, as they rapidly react each other, slowly produce peroxynitrite. The results showed that exposure of S1 to SIN-1 produced a time-dependent inhibition of the F-Actin-stimulated  $Mg^{2+}$ -ATPase activity, reaching 50% inhibition with  $46.7 \pm 8.3$  mM SIN-1 for 8.7 mM S1. Differential scanning calorimetry of S1 (untreated and treated with different SIN-1 concentrations) pointed out that inhibition of S1 is paralleled by a protein modification that decreases the thermal stability of S1. In addition, SIN-1 also produced inhibition of the  $Ca^{2+}$ - and of the  $K^{+}$ -dependent ATPase activities of S1 with close  $IC_{50}$  values, thus, suggesting that the inhibition of F-Actin-stimulated S1  $Mg^{2+}$ -ATPase activity is due to oxidation of the highly reactive Cys of S1, located close to the catalytic centre. This point was further confirmed by titration of S1 Cys with 5,5'-dithiobis-nitrobenzoic acid, and it was reinforced by the fact that the other common protein modification produced by peroxynitrite, e.g. nitrotyrosines formation, was less than 0.3 moles nitrotyrosines per mole of S1 at the concentrations of SIN-1 that produced nearly 90% inhibition of the F-actin stimulated  $Mg^{2+}$ -ATPase activity.

(Work supported by Grants SFRH/BD/2924/2000 to TT, POCTI/38191/QUI/2001 to MA, and BMC2000-0547 to CGM).

## Free-Radical Mediated Effects on Myosin and Actin from Skeletal Muscle

S. Simão<sup>a</sup>, T. Tiago<sup>a</sup>, M. Aureliano<sup>a</sup> and C. Gutiérrez-Merino<sup>b</sup>.

<sup>a</sup>*CMQA Depto Química e Bioquímica, FCT, Univ do Algarve, 8000 Faro;*

<sup>b</sup>*Depto. Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Univ de Extremadura, 06071 Badajoz.*

Oxidative damage of proteins caused by free radicals is known to result in reduced biological function and enhanced susceptibility to proteolysis. Those with characteristically long half lives, such as skeletal muscle proteins, become susceptible targets for free radical attack. Although some *in vivo* studies have indicated that skeletal muscle proteins which have been modified by oxidative stress undergo rapid removal, there is little information on the specific changes occurring in these proteins upon exposure to free radical-generating systems. The objective of this study is to precisely quantify the susceptibility of the contractile proteins – myosin and actin from skeletal muscle, to oxidative damage by *in vitro* chronic exposure to peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) formed by the reaction of NO<sup>•</sup> with O<sub>2</sub><sup>-•</sup>. The later two species can be directly toxic, however the simultaneous generation of both potentiates the cytotoxicity of each of the compounds alone due to the formation of the first species. The formation of peroxynitrite is an established event in multiple settings of ventricular dysfunction that results in selective nitration of protein tyrosine residues and disruption of cellular energetic control. In the present work ONOO<sup>-</sup> was generated through the continuous release of O<sub>2</sub><sup>-•</sup> and NO<sup>•</sup> from the model compound SIN-1 or chemically synthesized, with subsequent analysis of damage by measuring the non-physiological Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup>-EDTA ATPase as well the actin activated Mg<sup>2+</sup>-ATPase of myosin and the extent of tyrosine nitration, cysteins oxidation and formation of carbonylated residues on myosin and actin.

### III

## Skeletal Muscle Myosin-S1 Susceptibility to Peroxynitrite

Sónia Simão<sup>a</sup>, Teresa Tiago<sup>a</sup>, Carlos Gutiérrez-Merino<sup>b</sup> and Manuel Aureliano<sup>a</sup>

<sup>a</sup>CBME, Depto Química e Bioquímica, FCT, Univ do Algarve, 8000 Faro;

<sup>b</sup>Depto Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Univ de Extremadura, 06071 Badajoz.

Recently, it has been shown that muscle cells are predominant sites of peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) formation and that several myofibrillar proteins demonstrated increased tyrosine nitration in cardiac dysfunction, namely the myosin heavy chain (S1) (Mihm, M. J. et al. 2003 *Biochimie* **85**:587). Peroxynitrite is one of the most toxic free radical species formed in the nearly-instantaneous reaction of nitric oxide with superoxide anion known to participate in a multiple oxidative chemistries. In the present study we quantify the susceptibility of myosin from skeletal muscle, to oxidative damage caused by *in vitro* chronic exposure to ONOO<sup>-</sup>. This species was generated through SIN-1, a compound that simultaneously releases nitric oxide and superoxide anion. The effects on S1 were analysed by measuring the actin-stimulated Mg<sup>2+</sup>-ATPase activity and the two non-physiological Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup>-ATPase activities. The extent of tyrosine nitration, cystein oxidation and formation of carbonylated residues on S1 were also analysed. It was observed an irreversible inhibition of the actin-stimulated S1 Mg<sup>2+</sup>-ATPase activity of about 50% in the presence of 46.7 ± 8.3 μM SIN-1. Moreover, both Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup>-ATPases of myosin-S1 were inhibited by SIN-1 with similar IC<sub>50</sub> values, indicating modification of the essential -SH groups located close to the catalytic centre. Several antioxidants studied showed an efficient capacity of protection against ONOO<sup>-</sup>. The results obtained suggest that myosin from skeletal muscle is highly sensitive to peroxynitrite.

Thanks to: SFRH/BD/2924/2000 and POCTI/QUI/38191/2001

