



UNIVERSIDADE DO ALGARVE



Faculdade de Ciências e Tecnologia

CCMAR



Centro de Ciências do Mar do Algarve

Efeito de Peroxinitrito nos Resíduos de Actina
e na sua Polimerização



Dorinda Marques da Silva

Relatório de Estágio de Licenciatura em Bioquímica

Orientadores:

Professor Doutor Manuel Aureliano Alves

Doutora Teresa Tiago

Faro, Dezembro de 2006

“A dúvida é o princípio da sabedoria”

Aristóteles (-384 – -322)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Doutor Manuel Aureliano Alves, por todo o apoio e motivação que me proporcionou durante a realização deste estágio.

À Doutora Teresa Tiago, pela sua disponibilidade, conhecimentos, conselhos e ajuda transmitidos neste estágio.

Ao Prof. Doutor Carlos Gutiérrez-Merino, da Universidade de Extremadura (Badajoz, Espanha), pela cooperação na realização deste trabalho.

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

Aos meus colegas de laboratório e amigos, Miguel, Dalila e Ofélia pela companhia e boa disposição, mesmo quando tudo corre mal. Um agradecimento especial à Susana pela sua preciosa ajuda.

Aos meus colegas e amigos pelos bons momentos que me fazem ter saudades.

Às amigas da equipa de basquete, pelas risadas de balneário e pela sua preocupação com a “proteína”.

Aos amigos do basquete pela presença, companhia e maluquice no “timing”.

Ao Cláudio, que me acompanhou na minha vida académica, que ouviu as minhas preocupações e que me ajudou nas minhas atitudes sociais.

Aos meus pais, por estarem sempre do meu lado, dando-me sempre o devido apoio e me ensinarem os princípios pelos quais me rejo.

Às minhas irmãs Amélia e Teresa, por me fazerem rir à gargalhada mesmo quando é impossível.

À minha família sempre presente e preocupada.

Ao meu avô Hermínio, à minha tia Catarina e ao meu tio João, que haviam de ter ficado orgulhosos.

COMUNICAÇÃO EM CONGRESSO

Parte dos resultados descritos nesse trabalho foram apresentados em painel no XV Congresso Nacional de Bioquímica da SPB:

- Teresa Tiago, Dorinda Silva, Carlos Gutiérrez-Merino, Manuel Aureliano,
Peroxynitrite-mediated impairment of G-actin/F-actin equilibrium, XV Congresso Nacional de Bioquímica, 8 de Dezembro 2006, Aveiro, Portugal (Anexo).

ABREVIATURAS

Abs - Absorvância

ADP – Adenosina 5'-difosfato

AOX - Antioxidante

ATP – Adenosina 5'-trifosfato

Br⁻ – Ião brometo

BSA – Albumina de soro bovino

Ca²⁺ – Ião de cálcio

CaCl₂ – Cloreto de Cálcio

CAT – Catalase

Cl⁻ – Ião cloreto

CNT – Anião 3-carboxilato-4-nitrotiofenolato

CO₂ – Dióxido de carbono

CO₃²⁻ - Carbonato

CT – Cloramina-T

Cys – Resíduo de cisteína

DNA – Ácido desoxiribonucleico

D.O. – Densidade óptica

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

ε - Coeficiente de extinção molar

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

eNOS – Óxido nítrico sintetase endotelial

EPO – Eosinofilo peroxidase

F-actina – Filamento de actina

g – aceleração da gravidade

G-actina – Monómero de actina

GPx – Glutathione peroxidase

H⁺ – Ião de hidrogénio

H₂O – Água

H₂O₂ – Peróxido de hidrogénio

H₄N₂ – Diamida

HCl – Ácido clorídrico

HOBr – Ácido hipobromoso

HOCl – Ácido hipocloroso

IC₅₀ – Concentração que inibe 50 %

iNOS – Óxido nítrico sintetase induzida

K₂HPO₄ – Hidrogenofosfato dipotássico

KCl – Cloreto de potássio

KOH – Hidróxido de Potássio

l – Largura da cuvete

Met – Resíduo de metionina

Mg²⁺ – Ião de Magnésio

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

MPO – Mieloperoxidase

Na₂ATP – ATP dissódio

NAD[•] – Radical de Nicotinamida adenina dinucleótido

NAD⁺ – Nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada)

NADH – Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reduzida)

NADP⁺ – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reduzida)

NaHCO₃ – Hidrogenocarbonato de sódio

NaN₃ – Azida de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

nNOS – Óxido nítrico sintetase neuronal

•NO – Radical óxido nítrico

NOS – Óxido nítrico sintetase

•O₂⁻ – Radical anião superóxido

•OH – Radical hidroxilo

ONOO⁻ – Anião peroxinitrito

Pi – Fosfato inorgânico

PMSF – Fluoreto de fenilmeilsulfonilo

PSA – Persulfato de amónia

ROS – Espécie reactiva de oxigénio

RNA – Ácido ribonucleico

RNS – Espécie reactiva 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

-SH – Grupo tiol ou grupo sulfidril

SIN-1 – 3-Morfolinosidnomina

SIN-1^{•+} – Radical catião de SIN-1

SOD - Superóxido dismutase

t_{1/2} – Tempo de meia vida

TEMED – N,N,N',N'-tetrametiletenodiamina

Tm – Tropomiosina

Tn – Troponina

TnC – Troponina C

Tris – 2-Amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol

Tyr – Residuo de tirosina

U.A. – Unidades arbitrarias

RESUMO

Sabe-se que várias patologias estão associadas à existência de dano oxidativo nos tecidos. O peroxinitrito (ONOO^-) é um dos agentes oxidantes referido em várias patologias, tais como na disfunção ventricular, na carcinogénese e em doenças neurodegenerativas. Para além destes estudos, verificou-se recentemente que a exposição dos filamentos de actina (F-actina) a fluxos submicromolares de peroxinitrito, provoca uma despolimerização destes filamentos com uma consequente inibição da estimulação da actividade ATPásica da miosina. No presente trabalho, estudou-se a susceptibilidade da actina, de músculo esquelético de coelho, à exposição crónica *in vitro* a peroxinitrito, resultante da decomposição do composto SIN-1. O SIN-1 liberta pulsos lentos das espécies oxidantes de superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) e óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$), que reagem entre si resultando em peroxinitrito (ONOO^-). O efeito deste agente oxidante na actina foi analisado medindo a capacidade de polimerização da proteína, a nitração dos resíduos de tirosina e a oxidação dos resíduos de cisteína e de metionina. Após exposição ao SIN-1 observou-se, que o peroxinitrito aumenta o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) da polimerização máxima de G-actina com um IC_{50} de $58,5 \pm 10,4 \mu\text{M}$ SIN-1. Verificou-se oxidação de cisteínas de G-actina, sendo a Cys374 a mais susceptível ao ONOO^- ($\text{IC}_{50} = 10,9 \pm 2,5 \mu\text{M}$ SIN-1). Identificou-se ainda uma possível oxidação das metioninas nas posições 44 e 47 com valores de IC_{50} de $58,7 \pm 19,2 \mu\text{M}$ e $30,8 \pm 8,8 \mu\text{M}$ de SIN-1, respectivamente. Não se detectou, no entanto, formação de 3-nitrotirosinas. Apesar da oxidação da Cys374 preceder a oxidação da Met44 e da Met47, os valores de IC_{50} semelhantes encontrados para a inibição da polimerização da G-actina e para oxidação das metioninas, sugerem que estes resíduos apresentam um papel relevante na oxidação induzida pelo peroxinitrito na actina.

ABSTRACT

It's known that oxidative stress is associated in diverse diseases. Peroxynitrite is one of these oxidant agents that is described in some diseases, like ventricular dysfunction, carcinogenesis and neurodegenerative diseases. Furthermore, was been recently shown that an exposure to submicromolar fluxes of ONOO^- , produces an extensive depolymerization of the actin filaments (F-actin) leading to an almost complete blockade of myosin ATPase activity stimulation. In this work, it was studied the susceptibility of actin from rabbit skeletal muscle to *in vitro* chronic exposure to peroxynitrite, resulting of the SIN-1 compound decomposition reaction. SIN-1 releases slow pulses of the oxidant species superoxide ($\bullet\text{O}_2^-$) and nitric oxide ($\bullet\text{NO}$), which react one each other to produce peroxynitrite (ONOO^-). The effect of this oxidant agent on actin was determined measuring the ability of G-actin polymerization, the tyrosine residues nitration and the cystein and methionine oxidation. After exposure to SIN-1 it was observed that the half-time of maximum polymerization of G-actin is increased with an IC_{50} value of $58,5 \pm 10,4 \mu\text{M}$ SIN-1. It was verified the G-actin cystein oxidation, being Cys 374 the most susceptible to ONOO^- ($10,9 \pm 2,5 \mu\text{M}$ SIN-1). It was identified a possible oxidation of methionine 44 and 47 with IC_{50} values of $58,7 \pm 19,2 \mu\text{M}$ and $30,8 \pm 8,8 \mu\text{M}$ SIN-1, respectively. There was no production of 3-nitrotyrosines. Although the oxidation of Cys-374 precedes that of Met-44 and Met-47, the close IC_{50} values obtained for the inhibition of G-actin polymerization and methionines oxidation suggests that these residues may play a relevant role in the functional impairment of peroxynitrite-induced actin oxidation.

ÍNDICE

I.	INTRODUÇÃO.....	1
I.1	Sistema Muscular.....	3
I.1.1	Miosina.....	4
I.1.2	Actina.....	5
I.1.3	Mecanismo de contracção muscular.....	6
I.2	Citoesqueleto de actina e a sua função.....	8
I.2.1	Estrutura.....	9
I.2.2	Importância.....	10
I.2.3	Actina e stresse oxidativo.....	11
I.3	Stresse oxidativo celular.....	12
I.3.1	Produção e Fontes de ROS.....	14
I.3.2	Peroxinitrito.....	16
I.3.3	Peroxinitrito gerado por SIN-1.....	17
I.3.4	Alvos do peroxinitrito nas proteínas.....	18
I.3.4.A	Cisteínas.....	19
I.3.4.B	Metioninas.....	20
I.3.4.C	Tirosinas.....	21
I.3.5	Doenças associadas ao efeito do peroxinitrito.....	23
I.3.5.A	Disfunção ventricular.....	23
I.3.5.B	Carcinogénese, como consequência de danos no DNA.....	23
I.4	Objectivo.....	24
II.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
II.1	Reagentes.....	26
II.2	Isolamento de actina.....	26

II.2.1	Obtenção do “Pó de acetona” a partir de músculo esquelético de coelho	28
II.2.2	Obtenção de G-actina e F-actina a partir do “Pó de acetona”	29
II.3	Caracterização de G-actina	30
II.4	Quantificação de F-actina	32
II.5	Preparação do SIN-1	33
II.6	Medição da percentagem de SIN-1 decomposto	33
II.7	Tratamento da actina com SIN-1	33
II.8	Medição da polimerização de G-actina por “Light-Scattering”	34
II.9	Quantificação de 3-nitro-L.tirosina	35
II.10	Quantificação de Cisteínas reduzidas	35
II.10.1	Preparação e contribuição da absorvância do DTNB	36
II.10.2	Cálculo do coeficiente de extinção do DTNB	36
II.10.3	Quantificação das cisteínas de actina	36
II.11	Quantificação da oxidação das Metioninas de G-actina	37
III.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
III.1	Isolamento e caracterização de G-actina	39
III.2	Decomposição do agente oxidante SIN-1	41
III.3	Efeito do peroxinitrito na polimerização de G-actina	42
III.4	Efeito do peroxinitrito nos resíduos de G-actina	45
III.4.1	Efeito do peroxinitrito nas Tirosinas de actina	45
III.4.1.A	Coeficiente de extinção molar de 3-nitro-L-tirosinas	45
III.4.1.B	Formação de 3-nitro-L-tirosinas na Actina	46
III.4.2	Efeito do peroxinitrito nas Cisteínas de G-actina	49
III.4.3	Efeito do peroxinitrito nas Cisteínas de F-actina	51
III.4.4	Efeito do peroxinitrito nas Metioninas da G-actina	53

III.4.4.A	Efeito do peroxinitrito na metionina 44 de G-actina	53
III.4.4.B	Efeito do peroxinitrito na metionina 47 de G-actina	55
IV.	CONCLUSÃO.....	60
V.	ESTUDOS FUTUROS.....	61
VI.	REFERÊNCIAS	62
VII.	ANEXO	66

I - INTRODUÇÃO

Quando ocorre um aumento dos níveis de stresse oxidativo, os organismos vivos têm uma extrema capacidade de adaptação a alterações internas e/ou externas a que são submetidos, apresentando mecanismos próprios que são desencadeados para que haja a manutenção do equilíbrio entre os agentes oxidantes e os antioxidantes. Se este equilíbrio não é conseguido, os sistemas sofrem dano oxidativo por parte do agente oxidante (Fig. 1) (Scandalios, 2002).

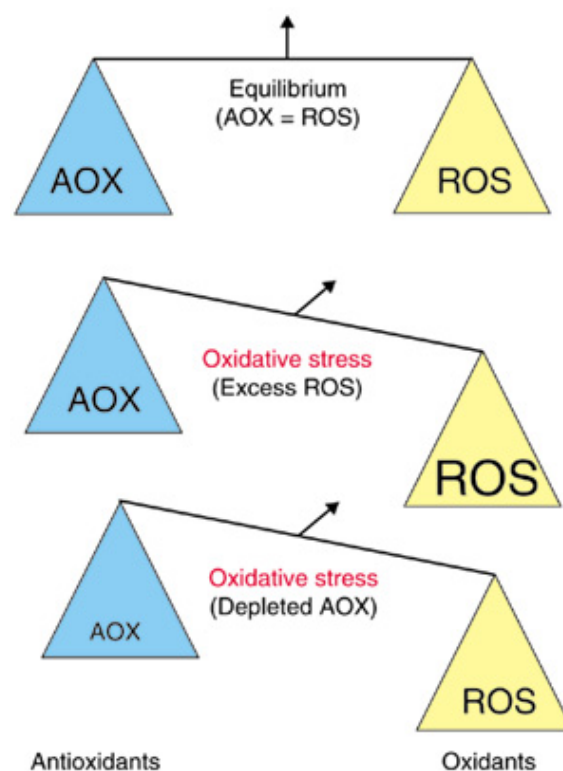
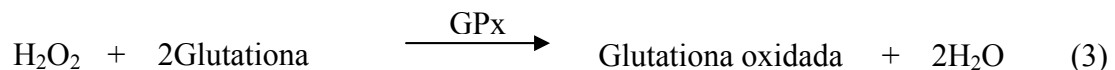
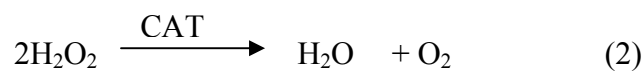
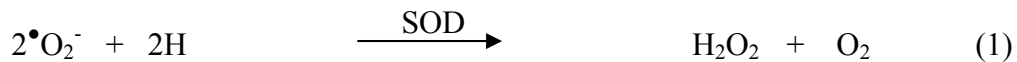


Fig. 1 – Equilíbrio entre agentes antioxidantes (AOX) e espécies reativas de oxigênio (ROS). Quando há maior concentração de ROS do que de AOX o sistema passa para o estado de stresse oxidativo (Scandalios, 2002).

Os agentes antioxidantes são compostos vitamínicos, minerais ou ainda enzimas. Estas enzimas são as primeiras defesas antioxidantes a actuar contra os radicais livres. São exemplos a superóxido dimutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutatona

peroxidase (GPx). A primeira reduz o radical anião superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) resultando em peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e oxigénio (O_2) (Reacção 1). A CAT e a GPx trabalham simultaneamente com a glutatona reduzindo o H_2O_2 para formar água (H_2O) (Reacção 2 e 3). Posteriormente a glutatona oxidada vai ser reduzida pela enzima antioxidante glutatona reductase.



As células musculares também estão sujeitas ao efeito de stresse e como consequência pode surgir envelhecimento celular, ou determinadas patologias como distrofia muscular e cardiomiopatias. Nestas células as proteínas contrácteis, como a miosina e a actina, são bastante frequentes e representam cerca de 40 % da massa total do corpo humano. A actina é uma proteína constituinte do citoplasma que é altamente conservada em todos os eucariotas e constituinte do citoesqueleto. Esta proteína desempenha funções importantes como a contracção muscular, a motilidade celular, o transporte de organelos e tem também um papel importante no metabolismo de aminoácidos e proteínas. No entanto, a actina é um dos alvos preferenciais da maioria dos agentes oxidantes e apresenta uma baixa capacidade de recuperação de danos oxidativos. Estas características podem ser duas das causas de envelhecimento celular. Em consequência do envelhecimento celular poderão surgir algumas patologias como a distrofia muscular e as cardiomiopatias.

A actina está presente em muitos tipos celulares, contudo neste trabalho focou-se a sua importância nas células musculares e a influência do peroxinitrito nesta proteína.

I.1 – Sistema Muscular

O tecido muscular está espalhado por todo o corpo, debaixo da pele, envolvendo muitos órgãos internos e vasos sanguíneos. Existem três tipos de tecido muscular, o músculo esquelético, o músculo liso e o músculo cardíaco. Em todos eles a actividade contráctil depende da interacção de dois tipos de filamentos: os filamentos grossos constituídos por miosina e os filamentos finos, constituídos por actina. Entre estas duas proteínas formam-se pontes, que são o resultado da interacção entre as cabeças de miosina e os filamentos de actina, que se movem na contracção fazendo com que estas duas proteínas deslizem uma pela outra (Voet e Voet, 1995).

O músculo esquelético é responsável por movimentos voluntários, como por exemplo locomoção. É também conhecido por músculo estriado, porque quando observado ao microscópio as fibras musculares que o constituem se assemelham a estrias (Fig. 2) (Voet e Voet, 1995).

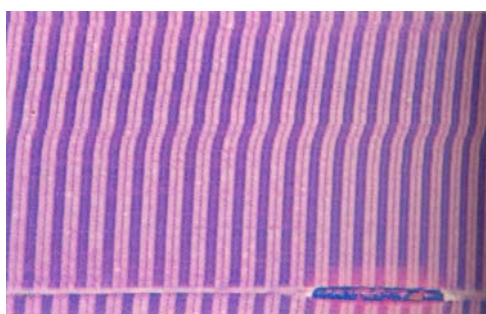


Fig. 2 – Fibra muscular vista sob luz de microscópio, com aparência de estrias (Voet e Voet, 1995).

O músculo é constituído por uma série de fibras musculares, sendo a fibra muscular constituída por células multinucleadas (Fig. 3), também designadas por

miofibrilas. Cada miofibrila contém vários sarcómeros que são constituídos pelos dois tipos de filamentos, o filamento grosso (de miosina) e o filamento fino (de actina) (Fig. 3) (Voet e Voet, 1995).

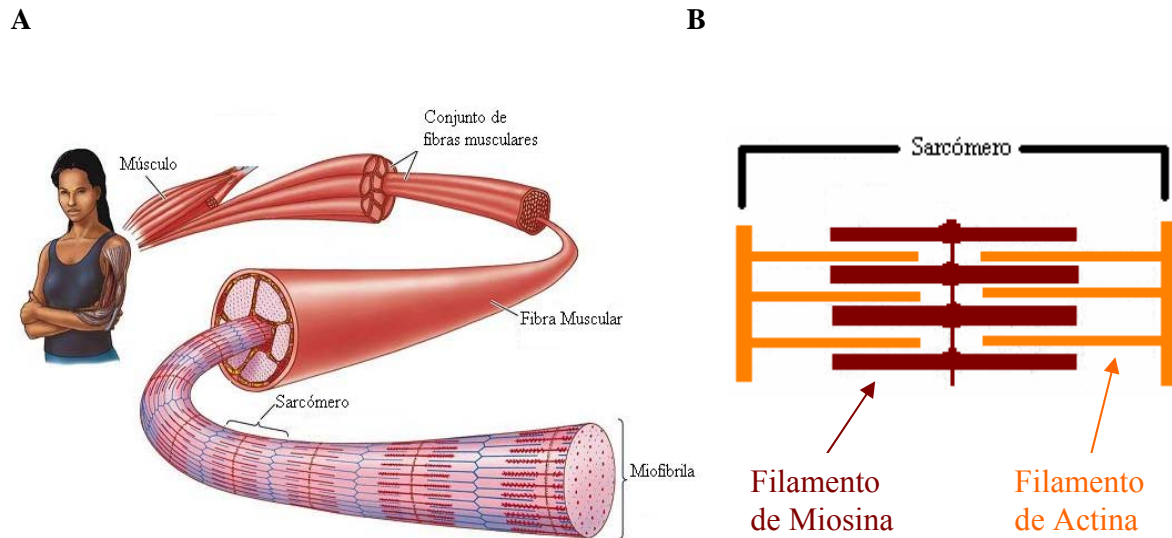


Figura 3 – (A) Organização do músculo esquelético. (B) Ampliação do sarcómero e das proteínas que o constituem, designadamente a miosina (filamento grosso) e a actina (filamento fino).

I.1.1 - Miosina

A miosina é normalmente associada a uma superfamília de proteínas motoras capazes de interagir com os filamentos de actina. Nesta superfamília estão representadas pelo menos quinze subclasses. A miosina do tipo II é a classe presente nas células musculares e é constituída por duas cadeias polipeptídicas iguais, enroladas entre si, tendo cada cadeia uma massa molecular relativa de, aproximadamente, 200 kDa (Sellers, 1999).

A miosina está dividida em três zonas: cabeça, pescoço e cauda. O domínio da cabeça ou domínio motor, contém um local de ligação para nucleótidos e outro para ligação à actina. O domínio do pescoço parece regular a distância da cabeça de miosina

para que esta funcione melhor, como uma alavanca, durante a geração de força responsável pela contracção muscular. A cauda ou âncora serve para fixar a miosina para que se possa mover em relação aos filamentos de actina (Sellers, 1999).

A molécula de miosina divide-se em meromiosina leve e meromiosina pesada, que podem ser clivadas por tripsina. A meromiosina pesada pode ainda ser clivada pela papaina dando origem ao subfragmento-1 (S1) da miosina e ao subfragmento-2 (S2) da miosina (Fig. 4) (Voet e Voet, 1995).

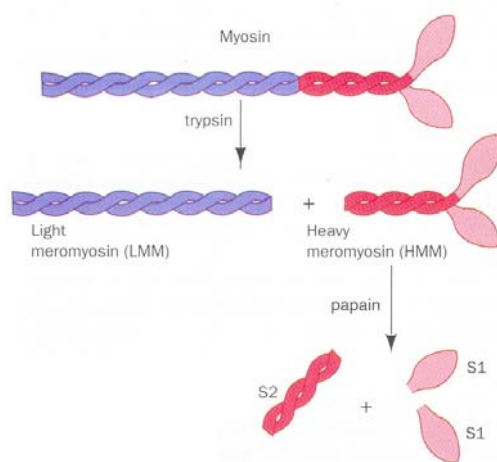


Figura 4 – Clivagem enzimática da miosina (Voet e Voet 1995).

I.1.2 – Actina

A baixas forças iónicas, a actina ocorre na forma de monómero globular com 375 resíduos (G-actina ou actina globular) (Fig. 5A). Na presença de condições salinas fisiológicas, cerca de 50-100 mM de cloreto de potássio (KCl) e 1 mM de iões magnésio (Mg^{2+}), os monómeros associam-se e a proteína converte-se em filamentos (F-actina) (Fig. 5B). É nesta estrutura que adquire a capacidade funcional morfológica para estimular a actividade de hidrólise do ATP (ATPásica) pela miosina. Cada monómero de G-actina catalisa a hidrólise de uma molécula de ATP durante um único ciclo de contracção muscular (Voet e Voet, 1995).

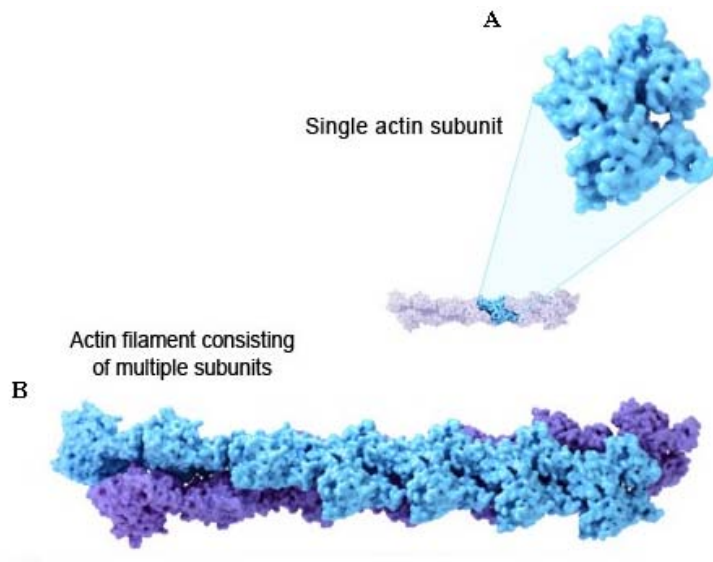


Figura 5 – Representação da actina na sua forma globular (A) e na sua forma filamentosas (B) (<http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/actin>).

I.1.3 – Mecanismo de contração muscular

A miosina interage com a actina formando pontes cruzadas entre os filamentos resultando na produção de força e, conseqüentemente, no deslizamento dos filamentos de actina pelos de miosina, diminuindo o tamanho do sarcômero. É por este motivo que o músculo contraído tem apenas um terço do comprimento total do músculo.

Na contração muscular, o mecanismo de hidrólise de ATP pelo complexo actina-miosina (actomiosina) pode ser resumida num ciclo de seis passos importantes: (1) ATP liga-se à cabeça de miosina (S1) e este desliga-se da actina; (2) o sítio activo fecha-se, dá-se a hidrólise de ATP e o S1 aumenta o seu ângulo em relação ao resto da molécula de miosina; (3) S1 forma uma ligação fraca com o monómero de actina; (4) P_i (fosfato inorgânico) é libertado do S1, fazendo com que a afinidade à actina, antes fraca, aumente; (5) “power stroke” ou geração de força acontece; (6) ADP é libertado, o músculo fica no estado de “rigor mortis” e o ciclo é finalizado (Fig. 6) (Voet e Voet, 1995).

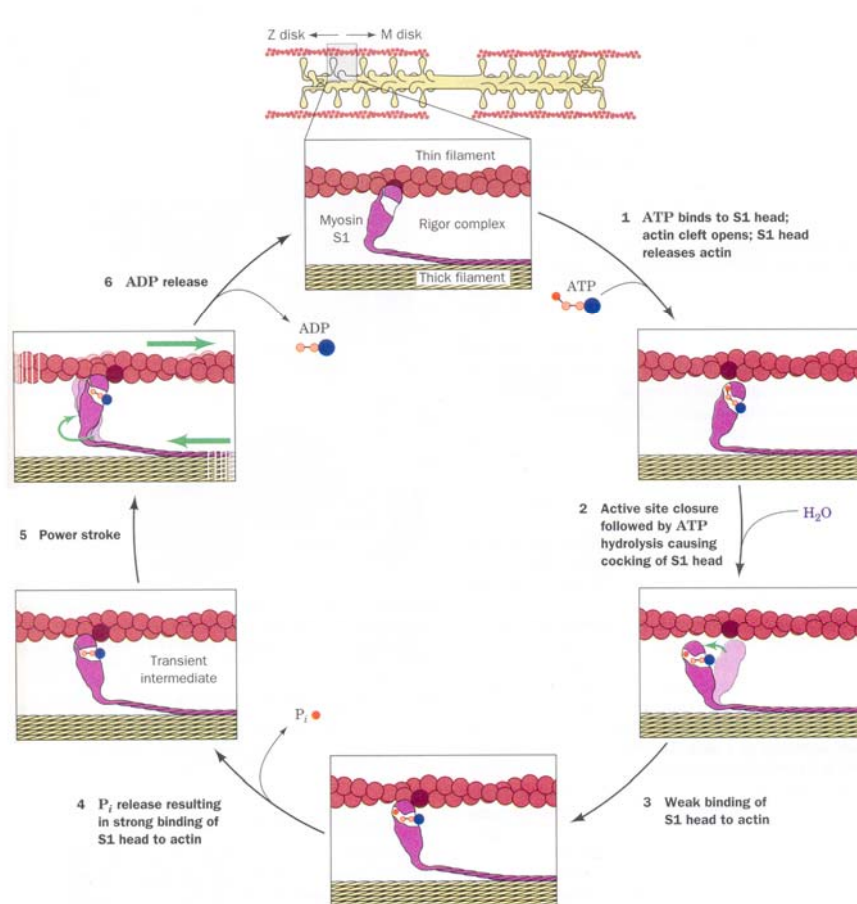


Fig. 6 – Mecanismo de hidrólise do ATP pelo complexo actomiosina durante o processo de contracção muscular. A cabeça de miosina desliza pelos monómeros de actina num processo que é acompanhado pela hidrólise de ATP. Observa-se na figura que o monómero ao qual o S1 se liga no início não é o mesmo a que o S1 se liga no fim, estando o primeiro destacado numa cor mais escura (Voet e Voet, 1995).

A regulação da contracção muscular acontece num processo regulado pelo ião de cálcio (Ca^{2+}), que envolve a troponina e a tropomiosina, onde a contracção se dá na presença de ATP, mas apenas quando o ião cálcio está presente (Fig. 7) (Voet e Voet, 1995).

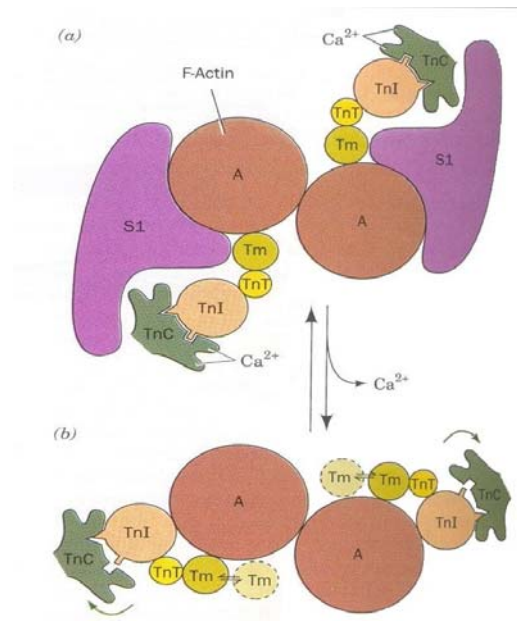


Figura 7 – Controle da contração muscular pela troponina (Tn) e pela tropomiosina (Tm). (a) O S1 interage e move-se sobre a F-actina (A) durante a contração e na presença de cálcio. (b) Quando há dissociação de cálcio da troponina C (TnC) a tropomiosina (Tm) muda para uma posição que impede a interação da actina com a miosina, ocorrendo assim o relaxamento do músculo (Voet e Voet, 1995).

I.2 – Citoesqueleto de actina e a sua função

Nos seres eucariotas existe uma estrutura denominada de citoesqueleto que lhes permite adoptar uma variedade de formas e executar movimentos coordenados, e que é constituída por uma rede de filamentos proteicos. Esta rede é formada por três principais tipos de filamentos: os microtúbulos, os filamentos intermediários e os microfilamentos. Estes filamentos diferem entre si quanto à estrutura, dimensão e função desempenhada na célula.

Os microtúbulos são estruturas tubulares constituídos por subunidades de um heterodímero de tubulina α e de tubulina β . Têm um papel importante no transporte intracitoplasmático de vesículas e organelos durante a interfase, na construção do fuso mitótico, no movimento de cromossomas e na criação e manutenção de domínios

citoplasmáticos (Azevedo, 1999). Os filamentos intermediários são compostos por proteínas fibrosas e possuem um diâmetro de 10 nm. Pensa-se que a sua função está relacionada com estabilidade mecânica que confere às células e tecidos para uma organização tridimensional (Azevedo, 1999).

Para além dos filamentos mencionados anteriormente existem ainda os microfilamentos ou filamentos de actina que são estruturas filamentosas resultantes da polimerização de actina globular (G-actina) em F-actina (actina filamentosa). Este sistema está envolvido na localização e motilidade intracitoplasmática de organelos e vesículas, bem como na motilidade celular. Para além destas funções pode ter um papel determinante nos mecanismos de transdução de sinal (Azevedo, 1999).

I.2.1 – Estrutura

A primeira determinação completa de uma sequência de aminoácidos de uma proteína miofibrilar foi feita por Elzinga et al (1973), que determinaram a sequência completa de aminoácidos da actina no músculo esquelético de coelho. A cadeia polipeptídica de actina consiste em 374 resíduos com uma massa molecular total de 41785 Da, aproximadamente 42 kDa. Ao comparar esta sequência com péptidos de actinas isoladas de outras fontes observa-se que a actina tem a sua sequência altamente conservada. É uma proteína globular que pode existir na forma monomérica de G-actina (Fig. 8A) na ausência de sais ou na forma filamentosa de polímero de dupla cadeia, denominando-se de F-actina (Fig. 8B) em concentrações fisiológicas salinas (50-100 mM KCl e 1 mM de iões de magnésio) (Elzinga et al, 1973).

A polimerização, *in vitro*, da actina pura necessita de ATP e iões monovalentes ou divalentes. Deste modo quando os iões de potássio ou magnésio são adicionados a monómeros de actina na presença de ATP, ocorre um aumento dos filamentos devido à

polimerização rápida. A localização, a extensão, a polaridade e o momento da polimerização da actina e as suas propriedades são regulados por um grande número de proteínas que se ligam à actina. As maiores categorias incluem a miosina, uma proteína motora, proteínas estabilizadoras dos filamentos como a tropomiosina e proteínas reguladoras como, por exemplo, a profilina.

As propriedades destas proteínas que determinam a organização do citoesqueleto de actina são moduladas por sinais ambientais através de hormonas, factores de crescimento e receptores da matriz extracelular, e também de diferenciação interna de sinais, como por exemplo os moduladores do citoesqueleto, incluindo os iões cálcio, pH, inositol, lipidos e fosforilação (Sheterline, 1998).

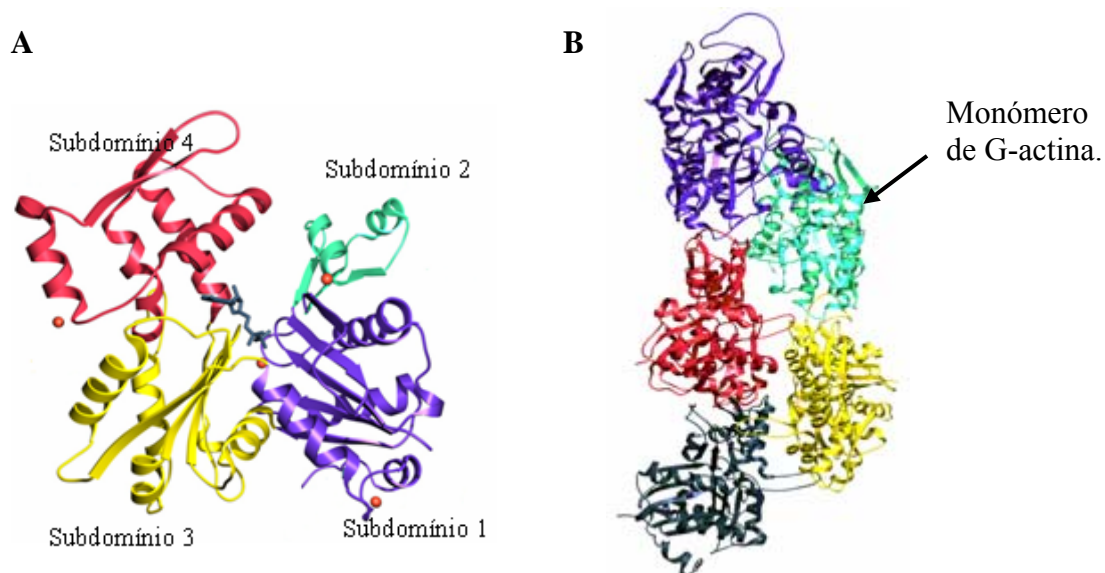


Figura 8 – Representação da estrutura da actina. (A) G-actina com os quatro subdomínios indicados. (B) Representação da estrutura de F-actina. Cada cor representa um monómero de G-actina, que constituem o polímero. A F-actina é um polímero helicoidal constituído por duas cadeias (<http://www.bbri.org/faculty/dominguez/Movies/>).

I.2.2 – Importância

A actina desempenha um papel importante na motilidade de macromoléculas e de organelos a nível celular, no transporte de cálcio (Wang et al, 2004) e sódio

(Ekaterina et al, 2003), assim como na produção de força no sistema muscular contráctil. Está associada a processos de comunicação neuronal, como, por exemplo na junção neuromuscular em que os receptores de acetilcolina estão ancorados ao citoesqueleto de actina. Tal como a acetilcolina, muitas outras proteínas de membrana estão ancoradas à actina através de ligação directa com proteínas que servem de ponte (Daniel et al, 1998). Para além destas funções, a actina serve como sítio de ligação das pontes cruzadas com a miosina, e ainda serve de suporte para as proteínas regulatórias como a troponina e a tropomiosina (Elzinga, 1973)

I.2.3 – Actina e stresse oxidativo

Milzani et al (1997) estudaram o efeito de alguns agentes oxidantes na actina e verificaram que o tratamento com peróxido de hidrogénio (H_2O_2) diminuía a capacidade da actina de polimerizar e produzia polímeros instáveis que falhavam na interacção com proteínas de “cross-linking” como a miosina. Esta inibição da polimerização é dependente da concentração de peróxido de hidrogénio. Verificaram também que a diamida, um agente oxidante possuindo dois grupos amido, inibe a polimerização de actina por afectar ligeiramente a extensão máxima de polimerização e por influenciar a extensão de polimerização de actina. Observaram que a influência do peróxido de hidrogénio, na extensão máxima de polimerização, é mais notável do que a obtida com diamida. Concluíram então, que a oxidação da actina e os danos oxidativos que sofre são específicos e relacionados com as características químicas do oxidante. Experiências em soluções de actina pura mostraram que o comportamento da actina à oxidação depende i) dos aminoácidos alvo do oxidante e ii) da plasticidade da molécula de actina, que responde de modo diferente a alterações químicas. A resposta da actina ao stresse oxidativo parece depender da “conectividade estrutural da actina”, a

propriedade que permite modular especificamente a arquitectura dos filamentos de actina.

Dalle-Donne et al (1999) também relataram a susceptibilidade da actina ao stresse oxidativo provocado pelo agente oxidante *tert*-Butil de Hidroperóxido, normalmente utilizado como antiséptico, e verificaram que existia oxidação das metioninas e da cisteína 374 da actina. Como consequência, esta oxidação provocava uma alteração da molécula de actina, e ainda uma alteração na cinética de polimerização. Mais tarde Dalle-Donne et al (2002) aprofundaram o conhecimento sobre a oxidação da actina pela cloramina-T, outro agente antiséptico, na polimerização e na estabilidade da molécula e observaram que a oxidação de várias metioninas leva à completa inibição de polimerização e afecta profundamente a estabilidade da F-actina, que rapidamente despolimeriza.

Estudos realizados com neutrófilos, por Clements et al (2003), mostram também que a actina intracelular quando sofre oxidação pelo peroxinitrito resultante da decomposição do SIN-1 apresenta alterações na sua função. A actina apresenta sinais de nitração, há inibição da polimerização e uma indução da despolimerização.

I.3 – Stresse oxidativo celular

O stresse oxidativo causa modificação de macromoléculas celulares e conduz a um dano celular. Nos organismos pode resultar do excesso de produção de espécies reactivas de oxigénio ou de uma deficiência no sistema de defesa antioxidante. As espécies reactivas de oxigénio são libertadas no citoplasma, entre outros locais, onde podem interagir com proteínas sinalizadoras e modificar a sua função. As espécies reactivas de oxigénio são produtos do metabolismo normal que envolve as enzimas SOD, CAT e GPx, descrito anteriormente e são exemplo o radical anião superóxido

($\bullet\text{O}_2^-$), o radical óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o radical hidroxilo ($\text{OH}\bullet$).

Os radicais livres de oxigénio, também conhecidos por espécies reactivas de oxigénio (ROS) são espécies químicas transitórias, altamente reactivas, caracterizadas pela presença de electrões desemparelhados. Podem ser formados durante o metabolismo aeróbico normal, como acontece durante o fluxo de electrões através da cadeia de transporte de electrões mitocondrial. As ROS têm um potencial para iniciar danos em vários componentes intracelulares, incluindo ácidos nucleicos, lipídios e proteínas, das quais o funcionamento normal das células depende (Haycock et al, 1996).

A acumulação de proteínas modificadas oxidativamente, durante o envelhecimento e o stresse oxidativo, fez com que se começasse a tentar compreender os mecanismos fisiológicos e não fisiológicos que geram ROS (espécies reactivas de oxigénio) e cuja produção envolve uma grande diversidade de factores bem como a modificação biológica por parte de ROS em vários tipos de macromoléculas. As ROS podem conduzir à oxidação de resíduos de aminoácidos das cadeias laterais, à formação de “cross-linking” (pontes cruzadas) entre proteínas, e à alteração da estrutura da proteína com consequente fragmentação.

A acumulação de proteínas oxidadas está associada a um grande número de doenças. Acredita-se que, durante o envelhecimento, existe uma acumulação progressiva de erros ao nível do DNA que afecta factores que governam a dinâmica da oxidação de proteínas e a dinâmica de degradação destas proteínas oxidadas. Existe portanto um desequilíbrio entre estes dois processos, onde a acumulação de proteína oxidada é o processo favorecido, com perda da sua função biológica.

Muitos agentes oxidantes, incluindo o peroxinitrito, são formados em leucócitos polimorfonucleares e noutras células fagocíticas que são activadas devido a uma

reacção ao agente estranho ao organismo. As células activadas produzem agentes oxidantes altamente tóxicos para microorganismos extracelulares invasores, mas também para os tecidos e para os próprios neutrófilos, levando à oxidação de vários aminoácidos de muitas proteínas. (DalleDone et al, 1999).

I.3.1 – Produção e Fontes de ROS

Quando um organismo está sob infecção e inflamação são activados mecanismos de defesa, onde se incluem as enzimas que produzem agentes oxidantes para combater a infecção (Fig. 9). Como exemplos destas enzimas temos a NADPH oxidase e a xantina oxidase que produzem o radical anião superóxido. Existe a óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) que produz o óxido nítrico a partir da l-arginina, a mieloperoxidase que produz o ácido hipocloroso (HOCl) através do peróxido de hidrogénio e do ião cloreto (Cl⁻) e a eosinófilo peroxidase que produz o ácido hipobromoso (HOBr) usando o peróxido de hidrogénio e o brometo (Br⁻). Estas duas ultimas enzimas podem também produzir cataliticamente o dióxido de nitrogénio ($\bullet\text{NO}_2$) usando o peróxido de hidrogénio e o nitrito como substratos (Ohshima et al, 2003).

Os vários oxidantes produzidos em tecidos inflamatórios reagem uns com os outros para produzir espécies oxidantes muito mais potentes do que as precursoras (Fig. 10). Estas ROS e as espécies reactivas de nitrogénio (RNS) são produzidas primeiramente para invadir agentes infecciosos e agentes estranhos ao organismo por reacções de nitração e oxidação nos resíduos de aminoácidos das proteínas. Contudo, quantidades excessivas de espécies produzidas nos tecidos inflamados podem causar danos nas células do próprio organismo e inclusive promover danos na molécula de DNA induzindo mutações (Ohshima et al, 2003).

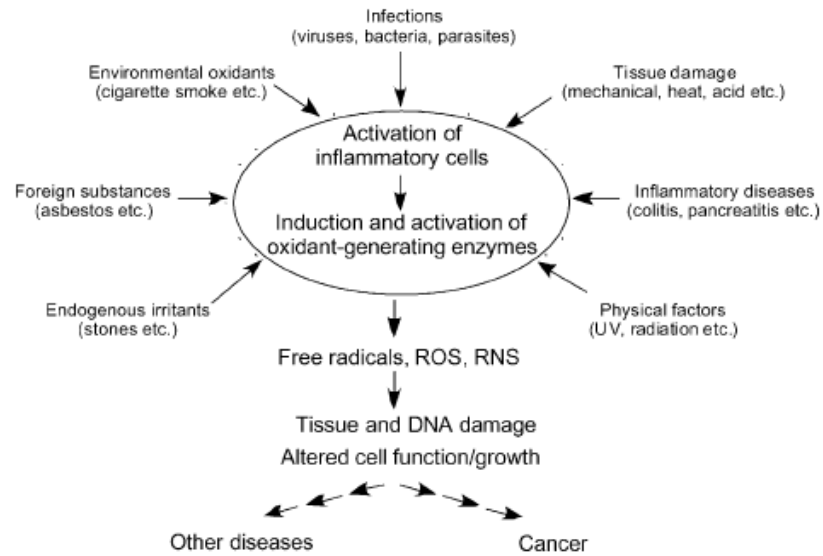


Figura 9 – A inflamação crónica causada por agentes biológicos, químicos e físicos é associada a um aumento do risco de cancro ou outras doenças (Ohshima et al, 2003).

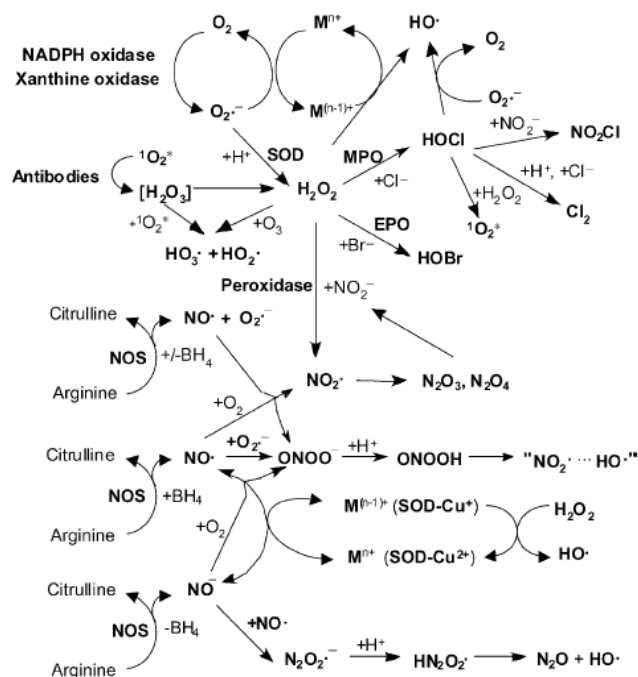


Figura 10 – Produção de ROS e de RNS por várias enzimas que produzem agentes oxidantes. São formados novos oxidantes potentes por reacções entre o $\bullet\text{NO}$, o $\bullet\text{O}_2^-$, H_2O_2 e HOCl . Estes oxidantes danificam o DNA, RNA, lípidos e proteínas por nitração e oxidação. SOD - Superóxido dismutase; MPO - Mieloperoxidase; EPO – eosinófilo peroxidase (Ohshima et al, 2003).

I.3.2 – Peroxinitrito

Foi demonstrado que os macrófagos, os neutrófilos e as células endoteliais conseguem gerar peroxinitrito quando estimuladas e existem dados que evidenciam uma formação *in vivo* em veias coronárias ateroscleróticas, em danos agudos dos pulmões e em inflamações crónicas (Ischiropoulos e Al-Mehdi, 1995).

O peroxinitrito resulta da reacção entre dois radicais livres, o óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$) e o anião superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$). O óxido nítrico aparece como sendo a forma predominante de um derivado endotelial relaxante, que é sintetizado enzimaticamente pela via de oxidação da arginina pela NADPH oxidase activada por cálcio. A acetilcolina, os nucleótidos de adenina, os inóforos de cálcio, a bradiquinina e muitos outros compostos, activam a síntese de $\bullet\text{NO}$ pelo endotélio.

O óxido nítrico aparece no organismo através da acção da enzima óxido nítrico sintase (NOS). São conhecidas três isoformas de NOS, a NOS induzida (iNOS), a NOS endotelial (eNOS) e a NOS neuronal (nNOS). Estas enzimas convertem a L-arginina em L-citrulina na presença de oxigénio e vários co-factores, originando o óxido nítrico (Fig. 11). Estas enzimas são frequentes no citoplasma (Carvalho et al, 2001).

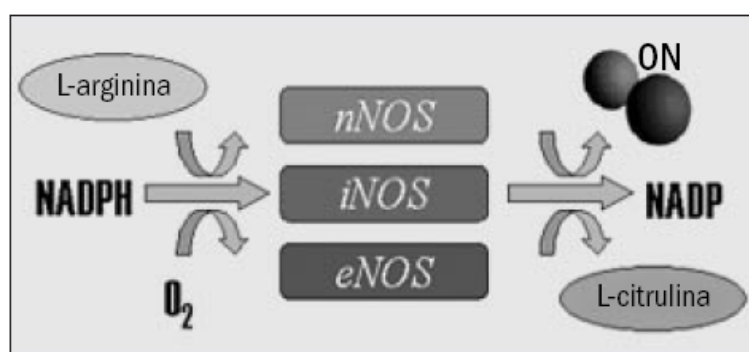


Figura 11 – Esquema representativo da formação de óxido nítrico nas células (Carvalho et al, 2001).

O superóxido é um biproducto do mecanismo celular normal. As fontes intracelulares de $\bullet\text{O}_2^-$ incluem a mitocôndria, o retículo endoplasmático e proteínas solúveis como a hemoglobina, aldeido oxidase, e xantina oxidase. A produção de superóxido pode ser realçada em processos patológicos incluindo hipoxia, metabolismo de xenobióticos, inflamação, e isquémia/reperfusão. Quando gerado em excesso, o $\bullet\text{O}_2^-$ é responsável por danos celulares (Radi et al., 1991).

A NADPH oxidase é um complexo multienzimático de membrana mitocondrial que pode ser activado por uma variedade de intermediários solúveis ou por estímulos particulares que interagem com os receptores da superfície da célula e produzem intermediários reactivos de oxigénio. Este complexo está separado da cadeia de transporte de electrões na mitocôndria. É um dador de electrões e converte o oxigénio molecular em superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) (Reacção 4) (Cadenas e Forman, 1997).



O Peroxinitrito não é um radical livre porque os electrões desemparelhados do óxido nítrico combinam com os do superóxido formando uma nova ligação (reacção 5). A constante de reacção de segunda ordem entre o óxido nítrico e o superóxido é de $6.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Radi et al., 1991).



I.3.3 – Peroxinitrito gerado por SIN-1

O composto SIN-1 (3-morpholino-sydnonimine) é usado *in vitro* para produzir peroxinitrito. Singh et al (1999) descreveram o mecanismo de decomposição do SIN-1

que, se decompõe em três passos, originando óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$) e superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) (Fig. 12). Inicialmente este composto sofre uma isomerização que resulta numa estrutura com um dos anéis aberto (SIN-1A) que, pela transferência de um electrão, reduz o oxigénio a superóxido. Como consequência, o radical catião do SIN-1 ($\text{SIN-1}^{\bullet+}$) decompõe-se em SIN-1C libertando o óxido nítrico. Como descrito anteriormente, o superóxido reage com o óxido nítrico dando origem ao peroxinitrito (ONOO^-).

O SIN-1 é um agente oxidante que imita o efeito de uma exposição crónica ao stress oxidativo provocado pelo peroxinitrito, porque na sua decomposição produz pulsos lentos e contínuos do radical anião superóxido e do radical óxido nítrico, formando o peroxinitrito (Singh et al, 1999).

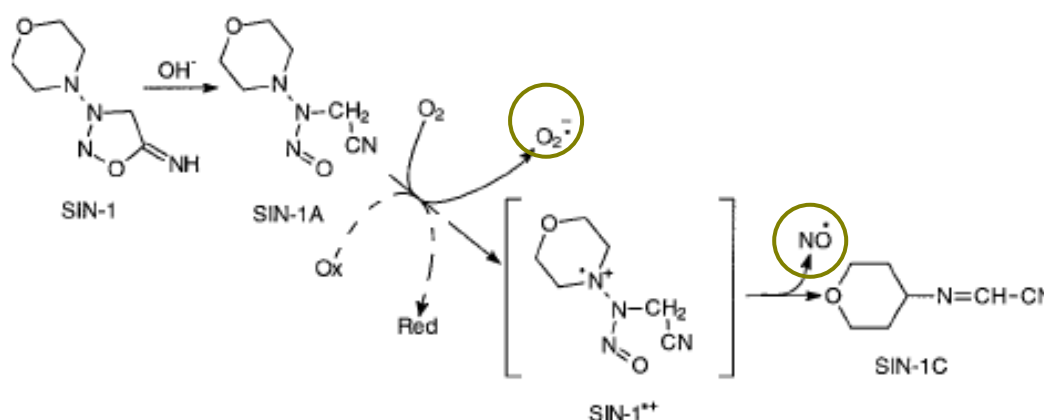


Figura 12 – Esquema representativo da decomposição de SIN-1 com o aparecimento do radical anião superóxido e do radical óxido nítrico (Singh et al, 1999).

I.3.4 – Alvos do peroxinitrito nas proteínas

O peroxinitrito é um potente agente oxidante capaz de promover danos incluindo a peroxidação lipídica, a inactivação de enzimas e nitração de resíduos de tirosinas que podem afectar a função proteica. Foi mostrado que o peroxinitrito oxida resíduos de aminoácidos incluindo as cisteínas, metioninas e tirosinas.

1.3.4.A – Cisteínas

A primeira reacção directa do peroxinitrito descrita foi com os grupos tiol das cisteínas. É também este resíduo que reage mais rapidamente com o peroxinitrito. Os grupos tiol (-SH) deste aminoácido são alvos comuns de radicais livres e a sua oxidação é a chave do mecanismo de toxicidade mediado por radicais livres ao nível molecular. Estes grupos são importantes, nos sítios activos de muitas enzimas, para manter a conformação nativa das proteínas. O anião peroxinitrito (ONOO^-) oxida os grupos tiol cerca de 10^3 vezes mais rápido que o peróxido de hidrogénio a 37°C e pH 7,4 (Radi et al, 1991). Esta oxidação acontece em moléculas não proteicas e proteicas. A constante de reacção do anião peroxinitrito com as cisteínas livres e com o único grupo tiol livre da albumina é de $5900\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e de $2600\text{-}2800\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente, a pH 7,4 a 37°C . Estas constantes de reacção são de três ordens de grandeza maiores do que as constantes relativas ao peróxido de hidrogénio com os grupos tiol a pH 7,4. Os efeitos citotóxicos do peroxinitrito podem estar relacionados com a oxidação dos grupos tiol nos tecidos. Nos aminoácidos este grupo está presente na cisteína, que é oxidada pelo peroxinitrito a cistina (Fig. 13).

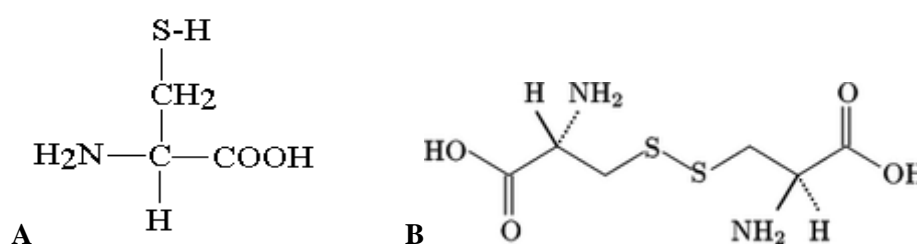


Figura 13 – Representação estrutural do resíduo de cisteína (A) e do composto resultante após a oxidação com o peroxinitrito, cistina (B).

A G-actina tem na sua estrutura cinco cisteínas nas posições 10, 217, 257, 285 e 374 (Elzinga et al, 1973). As quatro primeiras cisteínas estão localizadas no interior da proteína e por isso, não estão em contacto com o solvente. Mas a cisteína na posição 374 está no exterior da proteína e por isso em contacto com o solvente, pelo que quando

ocorre algum tipo de oxidação esta cisteína é, como veremos, a mais susceptível das cinco. Por este motivo é denominada de cisteína rápida (Takashi, 1979).

1.3.4.B – Metioninas

Com excepção do radical $\bullet\text{O}_2^-$, todos os oxidantes produzem, em sistemas biológicos, metioninas oxidadas que, juntamente com as cisteínas e os triptofanos, pertencem aos resíduos de aminoácidos mais rapidamente oxidados das proteínas. O produto de oxidação da metionina é um derivado sulfóxido, que pode ser reduzido novamente a metionina por químicos ou pela metionina sulfóxido reductase. A oxidação da metionina pode ter diferentes consequências funcionais.

Recentemente vários investigadores observaram que os resíduos de metioninas dentro das proteínas exibiam variedade na sua susceptibilidade à oxidação. A susceptibilidade normalmente está correlacionada com a exposição do resíduo à superfície, contudo os resíduos perto das metioninas também podem modular a sua susceptibilidade. Estudos de várias proteínas biologicamente activas suportam a hipótese de que os resíduos de metionina expostos à superfície atraem efectivamente os agentes oxidantes, enquanto que a função biológica da proteína é, geralmente, mantida (Levine et al, 1999). Assim os resíduos de metioninas expostos à superfície podem servir como antioxidantes endógenos, reagindo rapidamente com os agentes oxidantes a pH fisiológico, sendo a sua concentração efectiva à superfície da proteína elevada. Outros resíduos dentro de regiões críticas das proteínas ficam assim protegidos, e a existência de mecanismos de reparação significa que cada metionina pode atrair muitas moléculas oxidantes (Levine et al, 1999).

Dalle-donne et al (1999) ao investigarem o efeito da oxidação dos resíduos de metioninas na polimerização da actina e verificaram que as metioninas mais expostas ao

solvente (Met 44, 47 e 355) são mais susceptíveis à oxidação. Observou-se também que a oxidação de algumas metioninas críticas causa uma completa inibição da polimerização da actina e afecta gravemente a estabilidade dos filamentos de actina, que despolimerizam rapidamente (Dalle-donne et al, 2002).

Alvarez e Radi (2003) descrevem que as metioninas reagem com o peroxinitrito com uma constante de segunda ordem de cerca de $10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, resultando num derivado sulfóxido (Fig. 14) sugerido como responsável pela inactivação de proteínas ou pela diminuição da sua actividade biológica. Para além destes efeitos existem muitos estudos que documentam o conteúdo deste derivado sulfóxido nas proteínas durante o envelhecimento (Levine et al, 1999).

Na G-actina estão presentes dezasseis metioninas nas posições 44, 47, 82, 119, 123, 132, 176, 190, 227,269, 283, 299,305, 313, 325 e 355 (Elzinga et al, 1973).

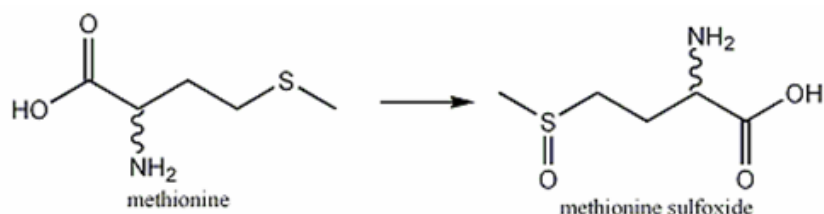


Figura 14 - Representação estrutural do resíduo de metionina e do seu derivado sulfóxido.

1.3.4.C – Tirosinas

O peroxinitrito ou os seus intermediários podem ser tóxicos ao reagirem com várias moléculas biológicas. Quando reage espontaneamente com proteínas um dos resultados pode ser a nitração dos resíduos de tirosina formando nitrotirosinas. (Ischiropoulos e Al-Mehdi, 1995).

Segundo Alvarez e Radi (2003) a tirosina é um dos aminoácidos que não reage directamente com o peroxinitrito. Pode, no entanto, ser modificada através de radicais

intermediários como o hidroxilo, o carbonato, o dióxido de hidrogénio ou ainda por metais de transição que se tornam espécies oxidantes pela reacção com o peroxinitrito. As tirosinas podem sofrer várias modificações na presença do peroxinitrito, dando origem a 3-nitrotirosinas, 3-ditirosinas, 3-hidroxitirosinas (Fig 15). Na actina existem 16 resíduos de tirosina, nas posições 53, 69, 91, 133, 143, 166, 169, 188, 198, 218, 239, 278, 293, 305, 336 e 361 (Elzinga et al, 1973). A formação de nitrotirosinas foi detectada em patologias humanas e é um marcador útil de detecção de peroxinitrito.

A formação de nitrotirosinas, como consequência da nitração dos resíduos de tirosina, tem sido detectada em patologias humanas e é considerado um marcador útil na detecção de existência de peroxinitrito em amostras biológicas.

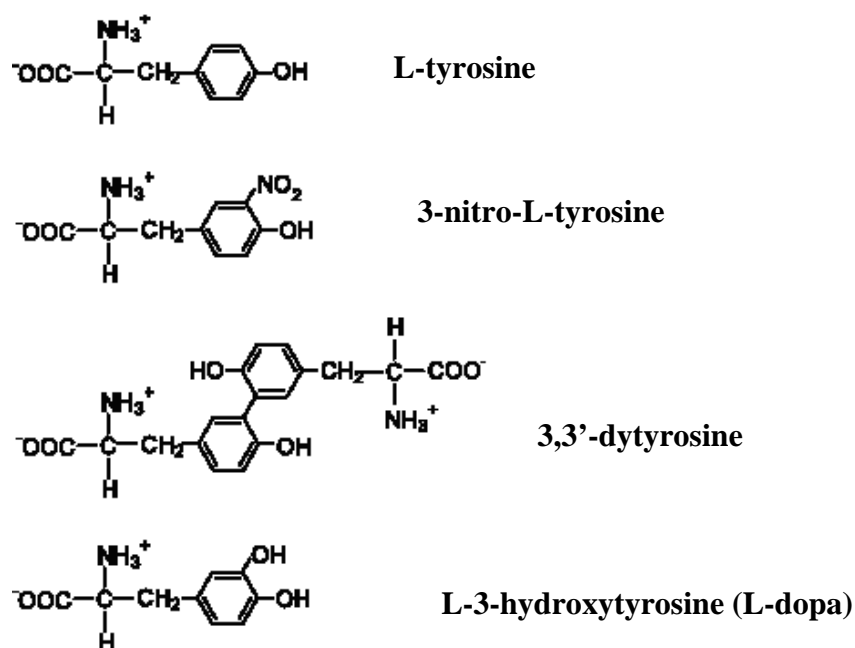


Figura 15 – Representação das modificações oxidativas na tirosina por reacções dependentes de peroxinitrito. Os compostos 3-nitro-L-tyrosine, 3,3'-dytyrosine e L-3-hydroxytyrosine são produtos primários formados pelas reacções dos derivados de peroxinitrito (dióxido de carbono, carbonato e hidroxilo) com a tirosina (Alvarez e Radi, 2003).

I.3.5 – Doenças associadas ao efeito do peroxinitrito

Alterações covalentes causadas pela oxidação das proteínas são primariamente responsáveis pela acumulação de enzimas deficientes a nível catalítico (inactivas ou menos activas) e estruturalmente alteradas durante o envelhecimento. Para além disso, a oxidação das proteínas pode desempenhar um papel em vários estados patológicos, incluindo doenças inflamatórias, aterosclerose, desordens neurológicas e cataratogenese. (DalleDone et al, 1999).

I.3.5.A – Disfunção ventricular

Na disfunção ventricular está já estabelecido que ocorre a formação de peroxinitrito e, como consequência, ocorre a nitração selectiva de resíduos de tirosina e disrupção do controlo energético celular. Nesta situação a concentração de óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$), conhecido por modular o fluxo de sangue e a contractilidade dos cardiomiócitos, pode ser alterada em períodos de grandes níveis de stresse oxidativo ou dano tecidular (Mihm et al, 2001). Como resultado formam-se espécies reactivas derivadas do $\bullet\text{NO}$, como é o caso do peroxinitrito que resulta da reacção entre o $\bullet\text{NO}$ e o $\bullet\text{O}_2^-$.

I.3.5.B – Carcinogénese, como consequência de danos no DNA

Oshima et al (2003) descrevem que a alteração da estrutura e função de algumas proteínas induzida por ROS ou por RNS, como é o caso do agente oxidante, peroxinitrito, podem contribuir para a carcinogénese.

O peroxinitrito pode induzir a quebra de uma cadeia simples de DNA, que activa a enzima poli-ADP-ribosilase e a rápida activação desta enzima provoca a depleção do seu substrato, NAD^+ , levando à perda de síntese de ATP e consequentemente a uma disfunção aguda e morte celular (Oshima et al, 2003). Foi também descrito que a

substituição de bases no DNA tem como principal indutor o peroxinitrito (Jeong et al, 1998).

O tratamento do DNA e do RNA isolado com peroxinitrito conduz a uma formação de 8-nitroguanina (Fig. 16B) dependente da concentração deste agente oxidante. De modo similar as reacções, induzidas pelo peroxinitrito de oligonucleótidos ou DNA contendo guanina resultam na formação do composto estável 5-guanidino-4-nitroimidazole (Fig. 16C).

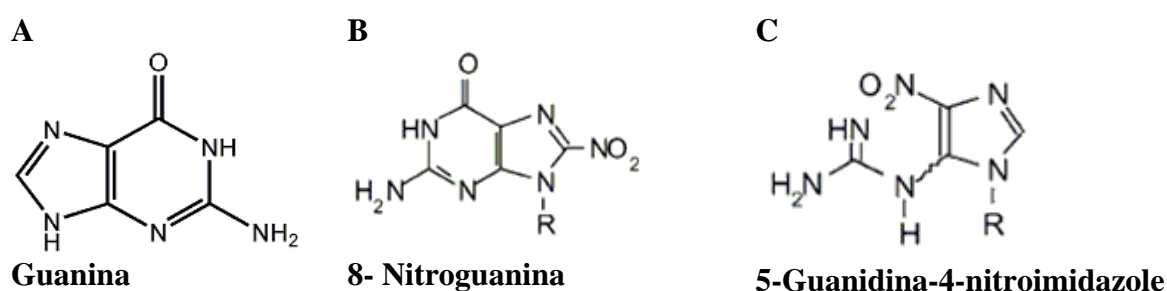


Figura 16 – (A) Estrutura da guanina, (B) Estrutura da 8-Nitroguanina e (C) Estrutura da 5-Guanidina-4-nitroimidazole. (B) e (C) Estruturas típicas de modificações de bases de DNA causadas por ROS e por RNS (Ohshima et al, 2003).

1.3.5.C – Doenças neurodegenerativas

O stresse oxidativo contribui significativamente para o mecanismo fisiológico de várias patologias neurodegenerativas. Entre os agentes oxidantes está o peroxinitrito que pode contribuir para o stresse oxidativo envolvendo a neurodegeneração em várias doenças, como na doença de Alzheimer, na doença de Parkinson e na esclerose múltipla. Li et al (1998) estudaram o efeito do peroxinitrito em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y e verificaram que este agente actuava de três modos diferentes: provocava aumento rápido de nitrotirosinas em várias proteínas, sendo mais evidente nas proteínas do citoplasma, inibia a activação do sistema de transducção de

sinal do fosfoinositol e por último diminuía e aumentava o conteúdo em fosfotirosinas de várias proteínas.

I.4 – Objectivo

O presente trabalho teve por objectivo determinar, *in vitro*, a susceptibilidade de actina após exposição a um agente oxidante, o peroxinitrito (ONOO^-), produzido na decomposição do SIN-1. Para tal determinou-se a extensão de polimerização da actina e a existência de oxidação de alguns resíduos de aminoácidos desta proteína, nomeadamente as tirosinas, as cisteínas e as metioninas.

II – MATERIAIS E MÉTODOS

II.1 – Reagentes

Na realização de todo o trabalho experimental foram utilizados reagentes, de elevado grau de pureza, que são descritos de seguida. Entre parêntesis estão indicadas as empresas responsáveis pela sua comercialização:

Acetato de sódio (Riedel), Acetona (Labsolve), Ácido acético glacial Acrilamida (Fluka), Bradford (reagente de) (Sigma), BSA (Merck), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck), DTNB (Sigma), EDTA dipotássio (BDH), Etanol (Panreac), HCl (Panreac), Glicerol (Sigma), Glicina (Sigma), KCl (Sigma-Aldrich), KOH (Pronalab), K_2HPO_4 (Merck), Metanol (Riedel), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Riedel), Marcador de baixo peso molecular (Sigma), β -Mercaptoetanol (Merck), NADH disódio (Sigma), N,N-metil-bis-acrilamida (Riedel), 3-nitro-L-tirosina (Sigma), NaHCO_3 (Pronalab), NaOH (Pronalab), NaN_3 (Riedel), Na_2ATP (Sigma), PMSF (Sigma), PSA (Merck), α -quimotripsina (Sigma), SDS (Sigma-Aldrich), SIN-1 (Sigma), Subtilisina A (Sigma), TEMED (Sigma), Tris (USB).

II.2 – Isolamento de actina

A solubilidade das proteínas varia bastante consoante as diferentes características destas macromoléculas. Algumas proteínas precipitam em condições que outras são solúveis. Os múltiplos grupos ácido-base das proteínas tornam a solubilidade destas macromoléculas dependente da concentração de sais dissolvidos, da polaridade do solvente, do pH e da temperatura. É com base neste efeito que muitos processos são utilizados na purificação de proteínas.

O procedimento utilizado neste trabalho para o isolamento e purificação da actina relaciona a solubilidade das proteínas com a força iónica do meio. A solubilidade

da proteína, numa solução de baixa força iónica, normalmente aumenta com a adição de sais em solução e este fenómeno designa-se de “salting in”. Por outro lado, o “salting out” consiste na adição de uma solução salina saturada que, ao competir eficazmente com as proteínas pelas moléculas de solvente, obriga estas a agregarem-se e precipitarem, sendo que as interacções proteína-proteína se tornam mais favoráveis que as interacções proteína-solvente. Este fenómeno “Salting out” é a base da maioria dos protocolos de purificação de proteínas, uma vez que é relativamente fácil ajustar a concentração de sal numa solução com diferentes proteínas, de modo a que a concentração de sais fique exactamente abaixo do ponto de precipitação da proteína que se pretende isolar. As restantes proteínas são eliminadas. Posteriormente aumenta-se a concentração de sais na solução para que a proteína do isolamento precipite (Voet e Voet, 1995) (Fig. 17).

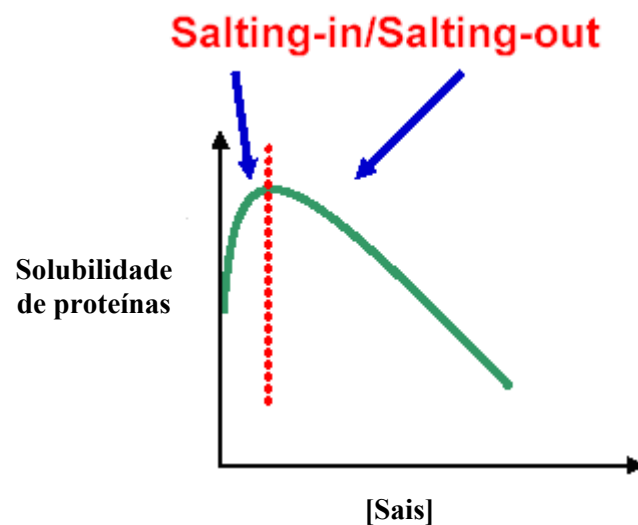


Figura 17 – Fenómeno de “salting in” e “ salting out”, variação da solubilidade de várias proteínas com a concentração de sais da solução.

O isolamento e a purificação da actina são realizados para obter a actina em estado de monómero (G-actina), um estado menos viscoso. A G-actina obtém-se pela extracção do “pó de acetona” com um tampão de baixa força iónica e, posteriormente,

adicionam-se sais para que a actina adquira um estado mais viscoso na forma de filamentos (F-actina). A presença de ATP na solução tampão é importante, uma vez que confere estabilidade à actina isolada.

Todo o protocolo de isolamento da actina foi realizado à temperatura de 4 °C para evitar que a proteína desnaturasse. Este protocolo foi realizado com base no descrito por Pardee e Spudis (1982). Neste procedimento existem duas fases, primeiramente é preparado um resíduo seco denominado “pó de acetona” e posteriormente este resíduo é utilizado para a extracção de G-actina que poderá ser polimerizada a F-actina, de imediato, consoante o estudo.

II.2.1 – Obtenção do “Pó de acetona” a partir de músculo esquelético de coelho

Sacrificou-se o animal, neste caso o coelho. Retiraram-se as gorduras envolventes, e aproveitou-se a maior quantidade possível de músculo, passou-se por água destilada, pesou-se e triturou-se. O músculo foi extraído em três volumes de solução A (0,1 M KCl, 0,1 M K₂HPO₄, pH 6,5) com agitação suave durante 10 minutos e posteriormente centrifugou-se a 4000 g durante 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se o sedimento em seis volumes de solução B (0,05 M NaHCO₃, pH 8,2-8,5), deixou-se novamente em agitação suave 10 minutos e depois centrifugou-se nas mesmas condições anteriores. Desprezou-se novamente o sobrenadante (retirando uma amostra – Amostra 1), o sedimento foi ressuspendido em três volumes de solução C (1 mM EDTA, pH 7,0) com agitação suave durante 10 minutos e centrifugou-se nas mesmas condições. Eliminou-se o sobrenadante (retirando uma amostra – Amostra 2), ressuspendeu-se o sedimento em seis volumes de H₂O refrigerada e agitou-se 5 minutos. De seguida centrifugou-se a 4000 g, durante 10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e voltou-se a realizar este último procedimento

de agitação em água destilada (ao sobrenadante foi retirada a Amostra 3). Ressuspendeu-se o sedimento resultante, em três volumes de acetona e agitou-se suavemente durante 10 minutos. O resíduo resultante foi filtrado com gaze esterilizada e repetiu-se este procedimento mais quatro vezes. O resíduo filtrado ficou num nicho a secar durante a noite. No dia seguinte triturou-se o resíduo seco e deixou-se secar mais umas horas. O “Pó de acetona” obtido foi guardado num frasco a -20 °C.

II.2.2 – Obtenção de G-actina e F-actina a partir do “Pó de acetona”

Pesou-se 3,5 g de pó de acetona e extraiu-se duas vezes em 50 ml de solução G (0,2 mM CaCl₂, 0,2 mM Na₂ATP, 0,5 mM β-mercaptoetanol, 0,005 % NaN₃, 2 mM Tris-HCl, pH 8,0) durante 30 minutos com agitação suave. No fim de cada extracção filtrou-se o resíduo em suspensão com gaze (Amostra 4), centrifugou-se o sobrenadante durante 30 minutos a 16000 g e o sedimento foi desprezado. Ao sobrenadante foi adicionado KCl até uma concentração final de 50 mM, ATP até 1 mM e MgCl₂ até 2 mM de forma a induzir a polimerização a 25 °C. Após 2 horas com agitação suave arrefeceu-se em gelo durante 15 minutos (Amostra 5) e adicionou-se KCl até perfazer a concentração final de 0,6 M. Após agitação lenta durante 30 minutos, centrifugou-se a 110000 g durante 1 hora. O sobrenadante foi desprezado (Amostra 6), retirou-se o sedimento com uma espátula e ressuspendeu-se no “potter” com 3 ml de solução G. Esta preparação ficou a dializar durante a noite contra 2 L de solução G. Centrifugou-se novamente a 110000 g durante 1 hora, desprezou-se o sedimento (Amostra 7) e determinou-se a concentração de G-actina no sobrenadante (Amostra 8) por medição da densidade óptica a 290 nm [$\epsilon = 0,62 \text{ mg/ml}\cdot\text{cm}$ ou $26000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Pardee e Spudich, 1982)].

A F-actina foi obtida por polimerização da G-actina, adicionando-se KCl até uma concentração final de 50 mM, MgCl₂ até 1mM, ATP até 1 mM e 0,02 % NaN₃. Armazenou-se a 4 °C e ficou a polimerizar durante cerca de 6 horas.

II.3 – Caracterização da G-actina

A caracterização de G-actina foi realizada por electroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A técnica de SDS-PAGE descrita por Weber and Osborn (1969) e U.K. Laemmli (1970) é utilizada para separação de proteínas consoante a sua massa molecular (a migração das proteínas é maior quanto menor for a sua dimensão). As amostras são desnaturadas pela adição do detergente aniónico SDS (dodecilo sulfato de sódio), que apresenta uma grande densidade de cargas negativas e confere esta carga às proteínas a que se liga. As amostras aplicadas no gel migram, assim, no sentido do eléctrodo positivo.

Preparou-se o gel de resolução com concentração de poliacrilamida a 12 %. Para tal adicionou-se 2 ml de solução stock de acrilamida [29,2 % (m/v) de acrilamida e 0,8 % (m/v) N,N'-metil-bis-acrilamida], 1,25 ml de tampão de resolução (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 4 x concentrado), 1,67 ml H₂O e 50 µl de SDS 10 %. Com a finalidade de promover a polimerização do gel adicionou-se 25 µl de PSA 10 %, 3,33 µl de TEMED e agitou-se. Na cassette preparada anteriormente colocou-se cerca de 3,5 ml desta solução e posteriormente adicionou-se água para uniformizar a superfície do gel e evitar a sua desidratação. Após, aproximadamente, 45 minutos o gel estava polimerizado.

Fez-se o gel de concentração de poliacrilamida 4 % adicionando 400 µl de solução stock de acrilamida, 750 µl de tampão de concentração (0,5 M Tris, pH 6,8, 4 x concentrado), 1,83 ml de H₂O, 30 µl de SDS, 15 µl de PSA 10 % e 5 µl de TEMED. Colocou-se a solução na cassette e utilizou-se o pente para definir os poços. O gel

polimerizou novamente durante, aproximadamente, 45 minutos, retirou-se o pente e transferiu-se a cassette para a tina de electroforese superior.

Preparou-se a tina inferior adicionando o tampão de electroforese anódico [25 mM Tris, 192 mM Glicina, 0,1 % (m/v) SDS, 0,1 M Acetato de sódio, pH 8,3] e à tina superior o tampão de electroforese catódico [25 mM Tris, 192 mM Glicina, 0,1 % (m/v) SDS, pH 8,3].

As amostras foram preparadas com um volume final de 100 μ l dos quais 25 correspondem ao tampão de amostra [320mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,4 M de β -Mercaptoetanol, 8 % SDS, 15 % (v/v) de Glicerol e 0,024 % de Roxo de m-cresol (4 x concentrado)]. Colocaram-se as amostras em água fervente durante 5 minutos.

Ao gel adicionou-se 5 μ l de padrão de baixo peso molecular e 20 μ l de cada amostra retirada no decorrer do isolamento de actina (secção II.2). O gel correu durante cerca de 2,5 horas a 90 Volts e de seguida foi transferido para uma tina com solução corante [“Comassie Brilliant Blue” com metanol 45 % (v/v) e ácido acético glacial 10 % (v/v)]. Após corar durante uma hora, utilizou-se a solução descorante [Metanol 10 % (v/v) e Ácido acético glacial 10 % (v/v)] para que as bandas ficassem bem definidas.

Devido à existência de proporcionalidade, foi possível determinar uma recta de calibração do logaritmo da massa molecular em função da migração das proteínas. Nesta recta utilizaram-se os dados das bandas do marcador de baixo peso molecular e de seguida, sabendo a mobilidade relativa das amostras, determinou-se a massa molecular da proteína por interpolação. Comparando os valores de massa molecular obtidos, com a literatura foi possível concluir sobre o grau de purificação da G-actina.

II.4 – Quantificação da F-actina

A quantificação da F-actina fez-se através do método de Bradford. Este método baseia-se no facto do corante "Coomassie blue", quando complexado com proteínas, exibir um máximo de absorção de radiações ao comprimento de onda de 595 nm. Este método é de rápida execução e elevada sensibilidade.

A concentração de proteína na amostra é determinada pela realização de uma recta padrão obtida com amostras de albumina de soro bovino (BSA) de concentração conhecida.

Usou-se uma preparação “stock” de BSA com concentração de 1 mg/ml para preparar seis amostras necessárias para a recta de calibração, de acordo com a seguinte tabela:

Tabela I – Quantidades necessárias dos vários reagentes para a realização da recta padrão do método de Bradford.

BSA (µg)	BSA (µl)	H₂O (µl)
0	0	600
2	2	598
4	4	596
6	6	594
8	8	592
10	10	590

Após a adição de água (H₂O) as amostras foram homogeneizadas no vortex. O reagente de Bradford (600 µl) foi o último a ser adicionado e após o qual se voltou a homogeneizar. Após 5 minutos registaram-se os valores da absorvância a 595 nm. A concentração de proteína em cada amostra foi determinada por interpolação da recta de calibração.

II.5 – Preparação do SIN-1

O SIN-1 com massa molecular de 206,6 g/mol foi preparado, num “eppendorf”, em água MiliQ com uma concentração stock de 200 mM e guardado a -80 °C protegido com papel de alumínio de forma a evitar a sua fotodecomposição.

II.6 – Medição da percentagem de SIN-1 decomposto

Para saber qual a percentagem de SIN-1 decomposto nas condições de incubação da proteína utilizou-se um método que segue o procedimento proposto por Kirsh e de Groot (1999). Este protocolo baseia-se no facto de a reacção do peroxinitrito (ONOO^-) com o NADH resultar na formação de NAD^+ e $\bullet\text{O}_2^-$. O NADH pode ser usado para seguir a cinética de decomposição do SIN-1 em peroxinitrito nas soluções tampão habituais em estudos com proteínas, com um limite de detecção inferior a 0,1 μM de ONOO^- a pH 7,4 (Martin-Romero et al., 2004). Este método tem a vantagem do NADH ser oxidado a NAD^+ pelo peroxinitrito numa razão equimolar e de esta cinética poder ser seguida ao comprimento de onda de 340 nm.

A cinética foi realizada numa cuvete de quartzo (1 ml) a 25 °C, com solução G (pH 8,0) e posterior adição de 375 μM de NADH ($[\text{NADH}]_{\text{stock}} = 25 \text{ mM}$, preparado em 50 mM Tes/Tris, pH 7,0). Adicionou-se o SIN-1 para uma concentração no ensaio de 50 μM e a cinética decorreu 5 horas a 25 °C. A eficiência de decomposição do SIN-1 foi determinada sabendo que $\Delta\text{Abs}_{340 \text{ nm}} = 6,2 \text{ mD.O./nmol}$ de NADH.

II.7 – Tratamento da actina com SIN-1

Antes de se realizar o tratamento com o agente oxidante ambas as proteínas, G-actina e F-actina, foram dialisadas “overnight” contra solução G sem β -mercaptoetanol.

Esta diálise foi um modo de eliminar este agente redutor da amostra de proteína, uma vez que pode haver interferências com a acção do peroxinitrito.

II.8 – Medição da polimerização de G-actina por “Light-Scattering”

A técnica de “light scattering” é muito fácil de utilizar, é não invasiva e bastante útil na caracterização da estrutura de macromoléculas e agregados moleculares. A luz é dispersada pela interacção dos electrões com a radiação incidente. O campo eléctrico oscilante causa vibração nos electrões, transformando-os em dipolos oscilantes que voltam a emitir radiação. Como os electrões estão em movimento constante, a frequência de radiação apresenta variações, dependendo da sua velocidade e direcção relativamente ao detector.

A dispersão de luz é sobretudo uma função da diferença entre o índice de refração do conteúdo da matriz e do meio de suspensão (Zimm, 1948). Assim sendo, a dispersão de luz é maior quanto maior for a dimensão das partículas em solução.

Esta técnica pode ser seguida pela diminuição de luz transmitida num espectrofotómetro normal, ou por um método mais sensível que mede a luz dispersa directamente através da geometria a 90 ° de um fluorímetro. Nestes estudos de dispersão de luz utilizou-se sempre o fluorímetro FluoroMax-3.

Observou-se a polimerização da G-actina a 25 °C, por alterações de “light scattering” a 90 °, utilizando os comprimentos de onda de excitação e de emissão de 546 nm. Numa cuvete de quartzo colocou-se a solução G (pH 8.0) e deixou-se estabilizar, adicionou-se G-actina (8 µM) e após a estabilização adicionou-se a solução de polimerização (100 mM KCl, 2mM MgCl₂). O mesmo procedimento foi realizado para as amostras em que a G-actina foi tratada com SIN-1. Os valores de intensidade foram

expressas em percentagem, considerando 100 % o sinal da amostra controlo (o sinal de G-actina foi subtraído ao sinal de F-actina).

II.9 – Quantificação de 3-nitro-L-tirosina

O método utilizado na quantificação de 3-nitro-L-tirosina baseia-se no facto de os resíduos de Tyr nitrosilados absorverem ao comprimento de onda de 415 nm.

Numa primeira fase, foi necessário determinar o coeficiente de extinção molar de 3-nitro-L-tirosina no meio de reacção utilizado. Preparou-se uma solução stock de 3-nitro-L-tirosina em solução G com uma concentração de 10 mM, mediu-se a absorvância a 415 nm de concentrações crescentes de 3-nitro-L-tirosinas (0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 500 e 1000 μM). Traçou-se uma recta de $\text{Abs}_{415\text{nm}}$ em função da concentração de 3-nitro-L-tirosina (μM) e através da lei de Lambert-Beer ($\text{Abs} = \epsilon \cdot c \cdot l$) determinou-se o coeficiente de extinção molar deste composto no meio pretendido. O valor encontrado foi de $4300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Ao mesmo comprimento de onda registou-se a absorvância das amostras previamente tratadas com SIN-1. Com o valor da absorvância obtido e usando o valor do coeficiente de extinção molar estimado, calculou-se a concentração de 3-nitro-L-tirosinas formadas na G-actina e F-actina.

II.10 – Quantificação de Cisteínas reduzidas

O método utilizado baseia-se na reacção entre os grupos sulfidrilo (-SH) reactivos das proteínas e o reagente de Ellman [5-5' - ditiobis(2-ácido nitrobenzóico) ou DTNB]. Esta reacção resulta na formação de uma ligação dissulfeto entre a proteína e o anião 3-carboxilato-4-nitrotiofenolato (CNT), o qual apresenta um máximo de absorvância a 412 nm (Robyt, 1990). Para que ocorra a reacção entre o DTNB e os grupos sulfidrilo, estes grupos tiol têm que estar reduzidos e expostos ao solvente.

II.10.1 – Preparação e contribuição da absorvância de DTNB

O reagente de Ellman foi preparado numa concentração stock de 50 mM em tampão fosfato de sódio de concentração 250mM e pH 7,2. Protegeu-se da luz com papel de alumínio e enquanto esteve a ser utilizado foi sempre mantido no frio.

Para determinar a absorvância deste reagente colocou-se na cuvete 780 µl de solução G (pH 8.0), 220 µl de tampão fosfato e fez-se um branco no espectrofotómetro a 412 nm. Adicionou-se 400 µM de DTNB e mediu-se a absorvância. Este valor de absorvância é descontado ao valor de absorvância apresentado pela proteína após a reacção com o DTNB.

II.10.2 – Cálculo do coeficiente de extinção molar de DTNB

Para determinar o coeficiente de extinção molar do produto de uma ligação dissulfeto com o anião 3-carboxilato-4-nitrotiofenolato (CNT) colocou-se 50 µM de DTNB numa cuvete e a esta adicionaram-se concentrações de cisteínas gradualmente crescentes (0, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 50 e 100 µM). A solução stock de cisteína tinha uma concentração stock de 165 µM e foi preparada em água destilada. Os valores de absorvância foram sendo registados após cada adição e com os dados determinou-se uma recta onde o declive representa o coeficiente de extinção molar.

II.10.3 – Quantificação das cisteínas de actina

Numa cuvete de quartzo colocou-se 780 µl de actina (6,24 µM) previamente tratada com SIN-1 e 220 µl do tampão fosfato de sódio. Fez-se o branco no espectrofotómetro a 412 nm e iniciou-se a cinética após a adição de 400 µM de DTNB. Assim que o valor de absorvância estabilizou adicionou-se 0,01 g de SDS. Este agente desnaturante serve para que todos os grupos sulfidriolo consigam estar expostos ao

solvente após a desnaturação da proteína. Pôde-se, assim, quantificar todas as cisteínas presentes na actina. A cinética decorreu até o valor da absorvância estabilizar.

A quantificação do número de cisteínas reduzidas por mol de proteína foi determinada através dos valores de absorvância a 412 nm registados após a adição de DTNB (cisteínas rápidas) e SDS (cisteínas totais) ao meio de reacção. Nestes cálculos utilizou-se o coeficiente de extinção molar $13,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, calculado anteriormente (ver secção II.10.2).

II.11 – Quantificação da oxidação das Metioninas de G-actina

Neste método recorreu-se da susceptibilidade enzimática da G-actina à α -quimiotripsina e à subtilisina para verificar o estado de oxidação das metioninas 44 e 47, respectivamente (DalleDonne et al, 1999), isto porque estas enzimas só clivam as respectivas metioninas se estes resíduos se encontrarem no estado reduzido.

O corte da α -quimiotripsina ocorre entre o resíduo de metionina na posição 44 e o de valina na posição 45 e resulta num fragmento de 33 kDa, que surge após a degradação de um fragmento precursor de 35 kDa. A subtilisina cliva a G-actina entre o resíduo de metionina na posição 47 e o de glicina na posição 45 e resulta num fragmento de 35 kDa

Preparou-se a α -quimiotripsina 0,05 % em 0,001 N HCl no próprio dia de utilização e adicionou-se numa razão enzima:proteína de 1:40, à G-actina tratada com SIN-1. Após 90 minutos parou-se a reacção com a adição de 2 mM de PMSF. Adicionou-se tampão de amostra 6x concentrado numa razão tampão: amostra de 1:5, as amostras ferveram durante 5 minutos e foram colocadas num gel de SDS-PAGE a 15 %.

Materiais e Métodos

Preparou-se a subtilisina 0,005 % em 0,0001 N HCl no próprio dia de utilização. À proteína incubada com SIN-1 foi adicionada subtilisina numa razão enzima:proteína de 1:1500 e após 10 minutos adicionou-se 2 mM de PMSF para parar a reacção. Adicionou-se tampão de amostra 6x concentrado numa razão tampão: amostra de 1:5, ferveram-se e correram-se as amostras num gel de SDS-PAGE a 15 %.

Com os géis obtidos analisou-se a densidade das bandas utilizando programa Quantity One da BIO-RAD, como software.

III – RESULTADOS E DISCUSSÃO

As condições utilizadas no presente trabalho tiveram como base estudos realizados anteriormente (Tiago et al, 2006) onde se analisou a susceptibilidade de actina ao peroxinirito utilizando duas soluções de incubação: 10 mM Tris, 25 mM KCl, pH 8,5; 10 mM Tris, 0,2 mM CaCl₂, 0,2 mM Na₂ATP, pH 8,5. No presente trabalho a solução de incubação escolhida foi 0,2 mM Tris, 0,2 mM CaCl₂, 0,2 mM Na₂ATP, pH 8,0, uma vez que a actina é mais estável nesta solução e o pH encontra-se mais próximo do fisiológico.

III.1 - Isolamento e caracterização de G-actina

Ao longo do desenvolvimento deste trabalho experimental realizou-se o procedimento de obtenção de “pó de acetona” 11 vezes, nas quais o rendimento (massa “pó de acetona”/massa de músculo) foi de aproximadamente 15 %, isto é cerca de 30 g por 200 g de “pó de acetona”.

O isolamento de G-actina a partir de “pó de acetona” foi realizado 31 vezes. A concentração final de G-actina foi obtida através da sua absorvância a 290 nm como referido na secção II.2.2 com uma média de $58,5 \pm 23,3 \mu\text{M}$ ($2,46 \pm 0,98 \text{ mg/ml}$). Ao analisar a concentração de G-actina em trabalhos anteriores verifica-se que a média é cerca de $96 \pm 40 \mu\text{M}$ ($4,0 \pm 1,7 \text{ mg/ml}$), o que significa que o valor de concentração obtido durante este trabalho experimental é baixo. Uma vez que o procedimento foi exactamente igual aos realizados nos trabalhos anteriores poderá ter existido alguma alteração nas soluções utilizadas durante todo o protocolo de isolamento, quer no processo de obtenção do “pó de acetona” (secção II.2.1), quer no de isolamento de G-actina (secção II.2.2). Sugere-se que tenha existido alguma alteração no pH aquando da ressuspensão com água destilada onde o pH não foi verificado. Para que o rendimento

possa melhorar sugere-se então que se verifique o pH e a sua manutenção no protocolo de isolamento de “pó de acetona”.

Com a realização do gel de SDS-PAGE 12 % conseguiu-se determinar a pureza da amostra obtida no isolamento (Fig. 18). As amostras recolhidas ao longo do processo de obtenção da G-actina foram colocadas nos poços (b-j). Do poço *b* ao *h* é visível a diminuição de proteínas ao longo do processo de isolamento, desaparecendo nos poços onde se encontra a G-actina purificada (*i* e *j*).

Com base na recta de calibração do logaritmo da massa molecular em função da migração das proteínas do marcador de baixo peso molecular foi possível calcular, por interpolação, a massa molecular da proteína isolada. A banda foi identificada como sendo o monómero de actina (G-actina), uma vez que a sua massa molecular é de 42 kDa.

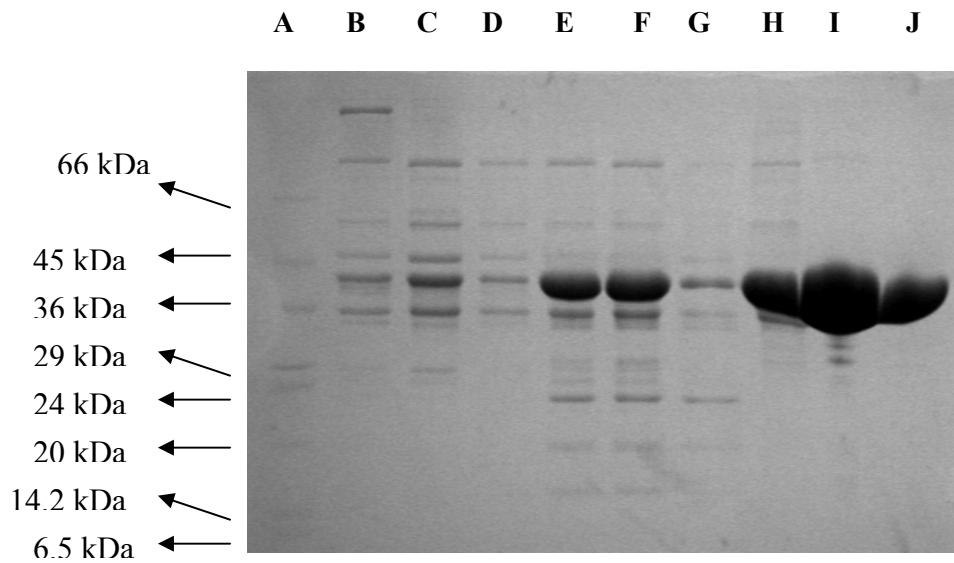


Figura 18 – Gel SDS-PAGE 12 % onde correram as 8 amostras recolhidas durante o protocolo de isolamento de actina (secção II.2). Poço (A): 5 μ l de padrão de baixo peso molecular (6,6 – 66 kDa); poço (B) - (H): 5 μ l das amostras recolhidas; poço (I): 5 μ l de proteína purificada, correspondente a 52,5 μ g de G-actina; poço (J): 1,9 μ l de proteína purificada, correspondente a 20 μ g de G-actina. O gel correu numa voltagem de 90 V durante cerca de 2,5 horas.

III.2 - Decomposição do agente oxidante SIN-1

Para determinar o tempo ideal de tratamento da proteína com o SIN-1, nas condições pretendidas (pH 8,0, 25°C em solução G) determinou-se a cinética de decomposição deste composto oxidante através da decomposição do NADH. Como foi demonstrado por Martín-Romero et al (2004), o peroxinitrito em soluções aquosas oxida o NADH a NAD[•], que se converte rapidamente em NAD⁺. Assim a utilização do NADH, que absorve a 340 nm, é uma boa estratégia para seguir a cinética de decomposição do SIN-1 em peroxinitrito.

Na figura 19 observa-se a cinética de decomposição do SIN-1 (50 µM) nas condições utilizadas no trabalho experimental (25 °C, pH 8,0 em solução G), ao longo de aproximadamente 4 horas.

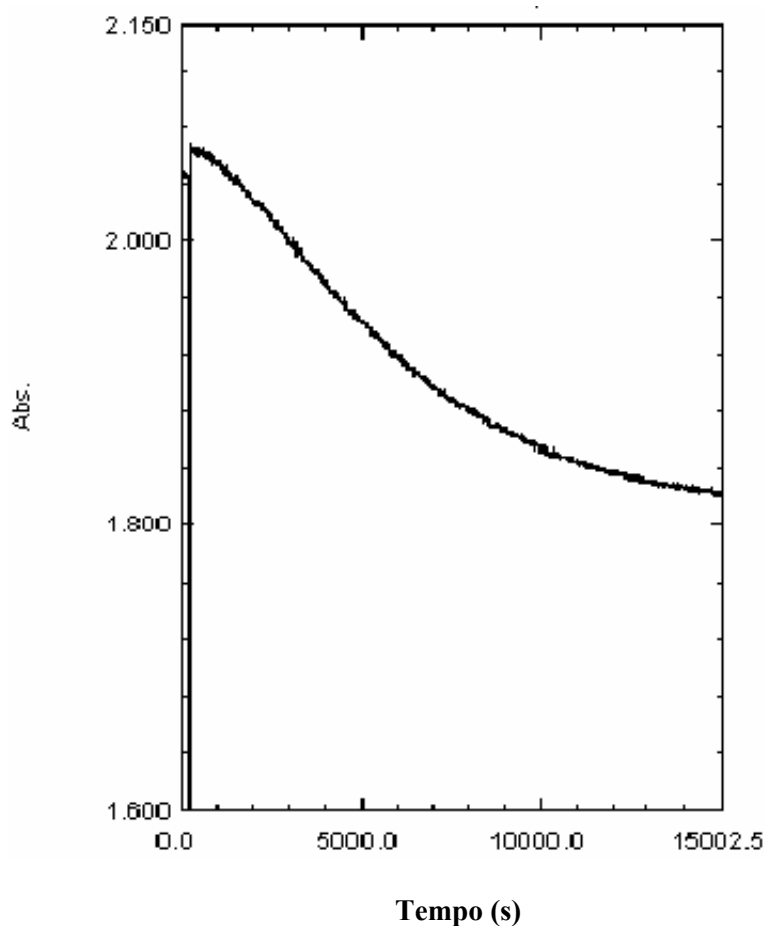


Figura 19 – Cinética de decomposição do SIN-1 determinada através da oxidação de NADH a 340 nm em função do tempo, 4 horas, em solução G, pH 8,0 a 25 °C.

Através desta cinética retirou-se os valores de absorvância no início e no final da oxidação de NADH. Calculou-se a eficiência de decomposição do SIN-1 em peroxinitrito, utilizando o coeficiente de extinção molar de NADH a 340 nm ($\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Sabendo que a oxidação em NAD^+ ocorre numa razão equimolar ao peroxinitrito existente no meio de reacção, após cerca de 4 horas a eficiência de decomposição do SIN-1 é de 78 %. Deste modo, para garantir uma decomposição de 78 % (no mínimo) de SIN-1 em peroxinitrito, o tratamento da actina com SIN-1 foi realizado sempre durante 5 horas.

III.3 – Efeito do peroxinitrito na polimerização da G-actina

O efeito do SIN-1 na polimerização da G-actina foi seguido a 25 °C pelo aumento da dispersão de luz, que é maior quanto maior for a dimensão das partículas em solução, esta técnica é conhecida por “light-scattering” e foi seguida a 90 ° num comprimento de excitação e emissão a 546 nm.

Verifica-se que a polimerização dos monómeros de actina oxidados é mais retardada e menos eficiente, isto é, com um máximo de polimerização inferior ao dos monómeros de actina controlo (ausência de SIN-1) (Fig. 20). Com excepção das amostras incubadas com 25 e 50 μM de SIN-1 que apresentam um máximo de intensidade de “light-scattering” superior (Fig. 20). Este aumento do máximo de polimerização pode dever-se à formação de estruturas intermediárias de maiores dimensões de actina, mas mais desorganizadas e conseqüentemente menos estáveis. Um dos estudos sobre este acontecimento foi realizado por Mossakowska e colaboradores (1993) que nesse trabalho verificaram o efeito do C-terminal e da sua remoção na actina e na sua polimerização. Concluíram que a extensão de polimerização da proteína com o C-terminal removido é maior devido a uma maior fragmentação espontânea dos

filamentos que já se encontravam polimerizados. Consequentemente os monómeros conseguiam adicionar-se a estes terminais dos polímeros, que se haviam fragmentado, formando novos polímeros cruzados.

Os valores de “light-scattering” para cada concentração de SIN-1 foram ajustados a uma equação de Boltzman para determinar o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) da polimerização. $y = [A_1 - A_2 / (1 + e^{-(x-x_0)/dx})] + A_2$, onde A_1 representa o valor inicial no eixo das ordenadas, A_2 representa o valor final de y , x_0 corresponde ao $t_{1/2}$, e dx é o valor no eixo das abscissas entre o início da polimerização e o final, ou seja o tempo necessário para que ocorra totalmente a polimerização.

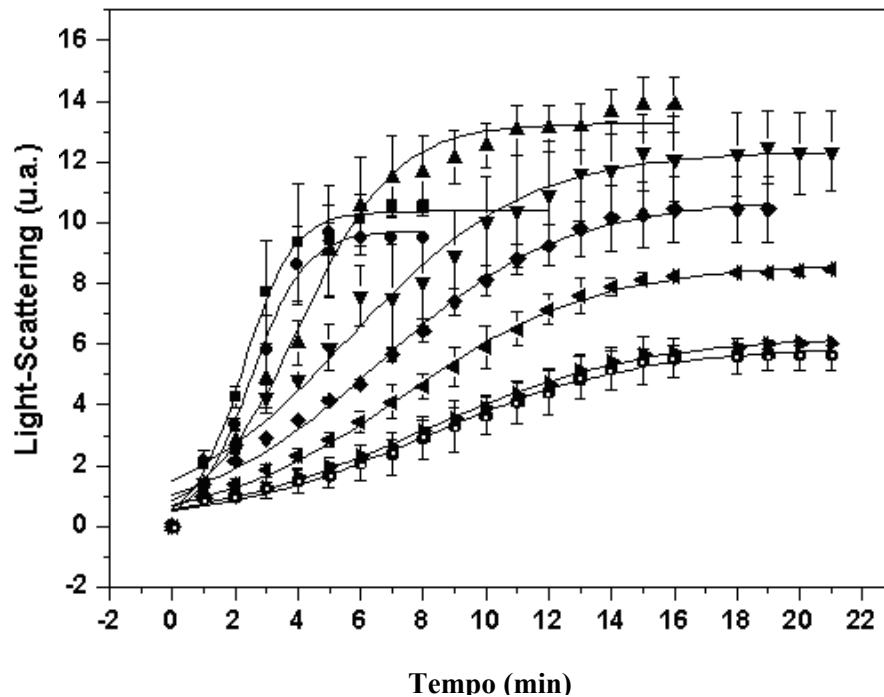


Figura 20 – Polimerização de 8 μ M de G-actina em F-actina após incubação durante 5 horas a 25 $^{\circ}$ C em solução G, pH 8,0 com diferentes concentrações de SIN-1: (■) 0 μ M de SIN-1; (●) 10 μ M de SIN-1; (▲) 25 μ M de SIN-1; (▼) 50 μ M de SIN-1; (◆) 100 μ M de SIN-1; (◄) 200 μ M de SIN-1; (►) 400 μ M de SIN-1 e (◦) 600 μ M de SIN-1. A polimerização foi iniciada pela adição da solução de polimerização (100 mM KCl e 2 mM MgCl₂). A variação na intensidade da dispersão de luz a 546 nm foi seguida continuamente por um período de aproximadamente 22 minutos. (n = 3).

Na figura 21, está representado o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) em minutos da polimerização de G-actina, determinado através dos valores de $t_{1/2}$ de cada amostra (Fig. 20), em função da concentração de SIN-1 (μM) presente no tratamento de G-actina ($8 \mu\text{M}$), a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 horas e em solução G (pH 8,0). Analisando os dados observa-se que o $t_{1/2}$ de polimerização aumenta de acordo com o aumento da concentração de peroxinitrito (ONOO^-) presente na amostra (Fig. 21).

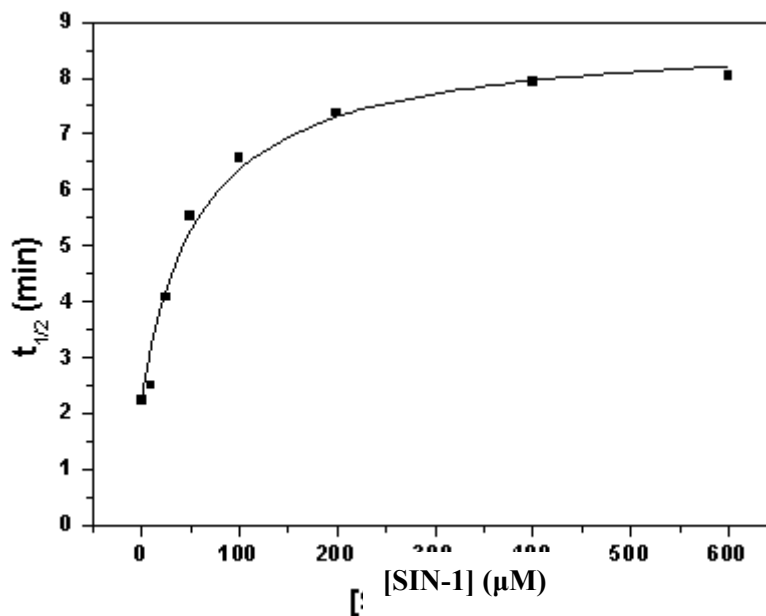


Figura 21 – Tempo de meia vida ($t_{1/2}$) da polimerização de $8 \mu\text{M}$ de G-actina em F-actina após incubação com diferentes concentrações de SIN-1 a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 horas, em solução G, pH 8,0.

Aplicando novamente a equação de Boltzman obteve-se um IC_{50} de $58,46 \pm 10,39 \mu\text{M}$ SIN-1. O facto de a polimerização da G-actina em F-actina não acontecer eficazmente vai influenciar a função biológica da actina. Como foi demonstrado em estudos anteriores (T. Tiago et al., 2006) a inibição da polimerização, pelo peroxinitrito, conduz a uma diminuição da actividade ATPásica da miosina estimulada por actina.

III.4 – Efeito do peroxinitrito nos resíduos de G-actina

Neste estudo analisou-se o efeito do peroxinitrito (ONOO^-) em vários resíduos da G-actina e da F-actina, nomeadamente nas tirosinas, cisteínas e metioninas com a finalidade de determinar quais os que sofriam oxidação e quais os que poderiam provocar alteração na polimerização da actina, e conseqüentemente inibição da sua função.

III.4.1 – Efeito do peroxinitrito nas Tirosinas de Actina

Com base na recta de calibração [3-nitro-L-nitrotirosina] (μM) *versus* Abs_{415} determinou-se o coeficiente de extinção molar de 3-nitro-L-nitrotirosina e posteriormente foi possível calcular a formação deste composto na actina.

III.4.1.A – Coeficiente de extinção molar de 3-nitro-L-tirosinas

Para quantificar a formação de 3-nitro-L-tirosinas nas amostras incubadas com SIN-1 foi necessário calcular o coeficiente de extinção molar de 3-nitro-L-tirosina. Realizou-se a recta de calibração ([3-nitro-L-nitrotirosina] (μM) *versus* Abs_{415}) (Fig. 22) e através da sua equação determinou-se pelo declive que o valor de ϵ_{415} é de $4300 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ em solução G, pH 8,0 e a 25°C .

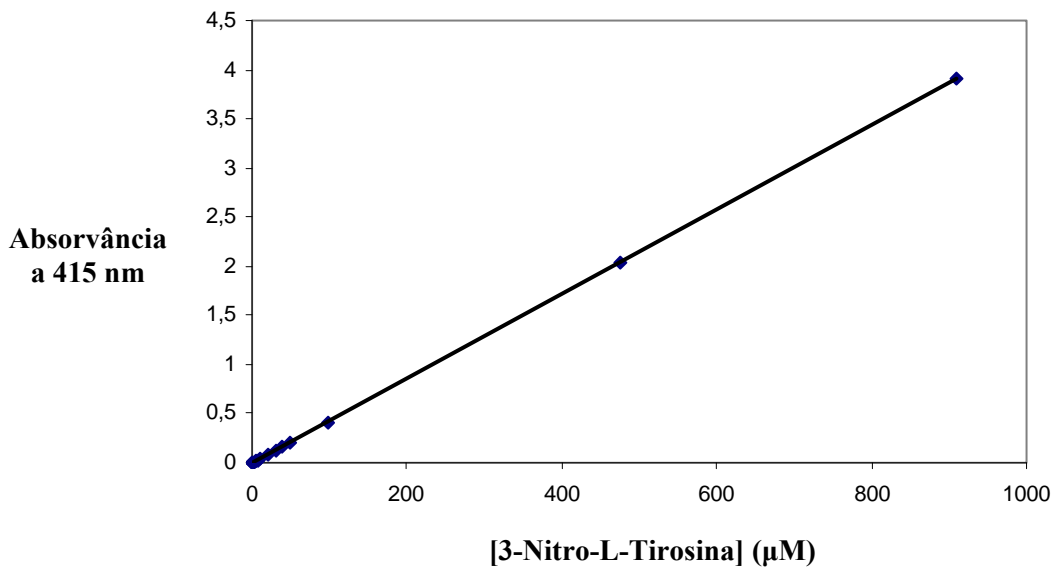


Figura 22 - Recta de calibração para determinar o coeficiente de extinção molar de 3-nitro-L-tirosinas a 415 nm, realizada em solução G, pH 8,0, a 25 °C. As soluções de 3-nitro-L-tirosina foram preparadas a partir de uma solução stock de 10 mM em solução G.

III.4.1.B – Formação de 3-nitro-L-tirosinas na Actina

Com base na absorvância a 415 nm e no coeficiente de extinção molar calculado anteriormente determinou-se a formação de nitrotirosinas nas amostras de G-actina e F-actina previamente tratadas com SIN-1.

Na tabela II estão indicadas as concentrações de SIN-1 com que a proteína foi incubada, a concentração de 3-nitro-L-nitrotirosina formadas no ensaio e ainda a quantidade de 3-nitro-L-tirosinas formadas por molécula de G-actina.

Resultados e Discussão

Tabela II – Valores de formação de 3-nitro-L-tirosinas (μM) na G-actina ($8 \mu\text{M}$) após incubação com diferentes concentrações de SIN-1 (0, 10, 25, 50, 100, 200 e $400 \mu\text{M}$) em solução G, pH 8,0 e $25 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 horas. Medição a 415 nm ($\epsilon_{3\text{-nitro-L-tirosinas}} = 4300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ($n=3$).

[SIN-1] (μM)	[3-nitro-L-nitrotirosina] (μM)	3-nitro-L-tirosinas/ G-actina (mol/mol)
0	$0,698 \pm 0,233$	$0,087 \pm 0,03$
10	$0,698 \pm 0,465$	$0,087 \pm 0,06$
25	$0,930 \pm 0,465$	$0,11 \pm 0,06$
50	$1,395 \pm 0,698$	$0,17 \pm 0,09$
100	$1,395 \pm 0,698$	$0,17 \pm 0,09$
200	$2,09 \pm 0,698$	$0,26 \pm 0,09$
400	$2,33 \pm 0,698$	$0,29 \pm 0,09$

Na tabela III estão indicadas as concentrações de SIN-1 com que a proteína foi incubada, a concentração de 3-nitro-L-nitrotirosina formadas no ensaio e ainda a quantidade de 3-nitro-L-tirosinas formadas por molécula de F-actina.

Resultados e Discussão

Tabela III – Valores de formação de 3-nitro-L-tirosinas (μM) na F-actina ($8 \mu\text{M}$) após incubação com diferentes concentrações de SIN-1 (0, 10, 25, 50, 100, 200 e $400 \mu\text{M}$) em solução G, pH 8,0 e $25 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 horas. Medição a 415 nm ($\epsilon_{3\text{-nitro-L-tirosinas}} = 4300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (n=3).

[SIN-1] (μM)	[3-nitro-L-nitrotirosina] (μM)	3-nitro-L-tirosinas/ F-actina (mol/mol)
0	$3,49 \pm 1,98$	$0,44 \pm 0,25$
10	$5,12 \pm 3,60$	$0,64 \pm 0,45$
25	$3,72 \pm 2,21$	$0,465 \pm 0,28$
50	$4,19 \pm 1,98$	$0,52 \pm 0,25$
100	$3,72 \pm 1,86$	$0,465 \pm 0,23$
200	$4,19 \pm 2,33$	$0,52 \pm 0,29$
400	$4,42 \pm 2,44$	$0,55 \pm 0,31$

Analisando os dados da tabela II, verifica-se que a formação de 3-nitrotirosinas foi inferior a 0.4 mol/mol de G-actina para as concentrações de SIN-1 mais elevadas (200 e $400 \mu\text{M}$). Na tabela III observa-se que a formação de 3-nitrotirosinas foi inferior a 1.0 mol/mol de F-actina. Sabendo que a actina contém, na sua estrutura, 16 resíduos de tirosina nas posições 53, 69, 91, 133, 143, 166, 169, 188, 198, 218, 239, 278, 293, 305, 336 e 361 (Elzinga et al, 1975), pode-se concluir que não há formação significativa de nitrotirosinas pelo peroxinitrito (ONOO^-) nem na forma monomérica da actina (G-actina) nem na filamentosa (F-actina).

A formação pouco significativa de 3-nitro-L-tirosinas pode estar relacionado com o descrito por Alvarez e Radi (2003). Estes autores defendem que a formação de nitrotirosinas não está relacionada directamente com o peroxinitrito, mas sim com os intermediários deste composto. No meio de reacção, *in vitro*, a G-actina foi incubada

apenas com o agente gerador de peroxinitrito, o SIN-1. Neste meio não estão presentes outras biomoléculas ou compostos químicos que se encontrariam *in vivo*, conseqüentemente, não existem os intermediários que são descritos como responsáveis pela nitração das tirosinas. Deste modo, é natural que não haja formação de 3-nitro-L-tirosinas na G-actina incubada com peroxinitrito.

III.4.2 – Efeito do peroxinitrito nas Cisteínas da G-actina

Na estrutura da G-actina estão presentes cinco cisteínas nas posições 10, 217, 257, 285 e 374. A Cys374 é denominada de cisteína rápida porque está exposta ao solvente e reage rapidamente com o DTNB. As cisteínas totais são o conjunto das cinco cisteínas da G-actina que só reagem totalmente com o DTNB após a desnaturação da proteína com SDS (T. Tiago et al., 2006).

Na figura 23 pode observar-se a presença de aproximadamente 5 cisteínas reduzidas na G-actina controlo (0 μ M de SIN-1) como proposto por Elzinga et al (1973). Neste estudo quantificou-se as cisteínas que permaneceram reduzidas após o tratamento da G-actina com o SIN-1 (Fig. 23).

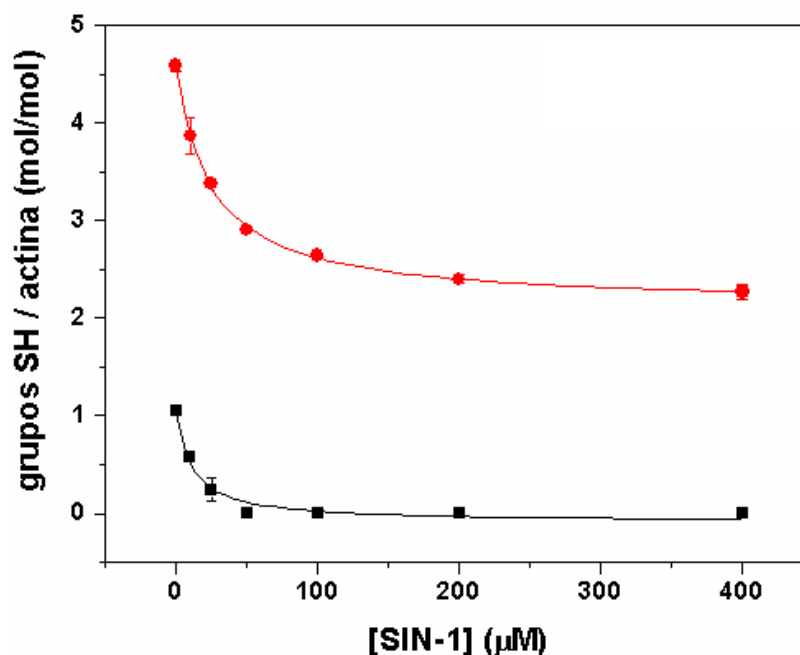


Figura 23 – Cisteínas reduzidas da G-actina (6.24 µM), em mol cisteínas/mol de G-actina, após tratamento de 5 horas com 0, 10, 25, 50, 100, 200 e 400 µM de SIN-1. O tratamento realizou-se em solução G, pH 8,0 e a 25 °C. Absorvância a 412 nm ($\epsilon_{\text{DTNB}} = 13,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) após 10 minutos de exposição ao DTNB. (■) Quantidade de Cisteína 374 reduzida; (●) Quantidade de Cisteínas totais reduzidas.

Verifica-se que, com apenas 50 µM de SIN-1, a cisteína 374 é completamente oxidada. Determinou-se o IC_{50} desta inibição utilizando uma equação hiperbólica do tipo de Michaelis-Menten [$y = y_0 - (P_1x / P_2+x)$], onde P_1 é a velocidade máxima, o P_2 é o K_m e o x é a concentração de SIN-1. O IC_{50} é de $10,9 \pm 2,5 \text{ µM}$ de SIN-1, o que significa uma estequiometria de 1,7 mol SIN-1/mol de G-actina (Fig. 23).

Na análise do efeito do peroxinitrito na oxidação das cisteínas totais observou-se que só cerca de 2,5 são totalmente oxidadas, sendo o IC_{50} de $24,4 \pm 0,8 \text{ µM}$ de SIN-1, isto é, uma estequiometria de cerca de 3,9 mol de SIN-1/ mol de G-actina (Fig. 23).

Confirma-se então, uma elevada capacidade do peroxinitrito originado pelo SIN-1 de oxidar a G-actina e em primeiro lugar a Cys 374. Segundo Vandekerckhove e

Webber (1978) a Cys374 encontra-se na região C-terminal da actina, estando mais exposto ao solvente, por isso é o resíduo mais reactivo e consequentemente é também o mais oxidado. Pode por isso ser uma das causas da inibição da polimerização da G-actina. Tal como Mossakowska e colaboradores (1993) descrevem, a remoção dos três últimos resíduos do C-terminal da actina parece influenciar as interacções monómero-monómero, uma vez que há diminuição da razão de nucleação dos monómeros de actina na polimerização. Como a Cys 374 pertence aos três últimos resíduos de actina pode-se considerar que este resíduo é importante na dinâmica de polimerização da actina. Mais recentemente Tiago et al (2006) descrevem que a oxidação de apenas esta cisteína pode ser suficiente para condicionar a polimerização da actina, bem como a sua função biológica de estimular a ATPase da miosina.

III.4.3 – Efeito do peroxinitrito nas cisteínas da F-actina

Através da absorvância a 412 nm, após 10 minutos de exposição ao DTNB, analisou-se o efeito do peroxinitrito nas cisteínas da F-actina. Na figura 24 observa-se que o controlo de F-actina, tal como a G-actina, contém as cinco cisteínas incluindo a cisteína rápida (Cys374). A F-actina, no entanto, parece conter as cisteínas mais protegidas do que a G-actina, como se comprova pelo IC_{50} para a oxidação da Cys 374 por peroxinitrito ($41,5 \pm 8,2 \mu\text{M}$ SIN-1, aproximadamente 6,7 mol de SIN-1/mol de F-actina) (Fig. 24). Este IC_{50} foi calculado com base numa equação hiperbólica do tipo de Michaelis-Menten como explicado na secção III.4.2. Em relação às cisteínas totais observa-se que mesmo com $400 \mu\text{M}$ de SIN-1 só a Cys374 é que se encontra oxidada. Outro modo de perceber que a oxidação não se estende para além da Cys374 passa por analisar o IC_{50} para a oxidação das cisteínas totais, que é de $48,9 \pm 23,2 \mu\text{M}$ de SIN-1, valor muito semelhante ao IC_{50} da oxidação da Cys rápida (Fig. 24).

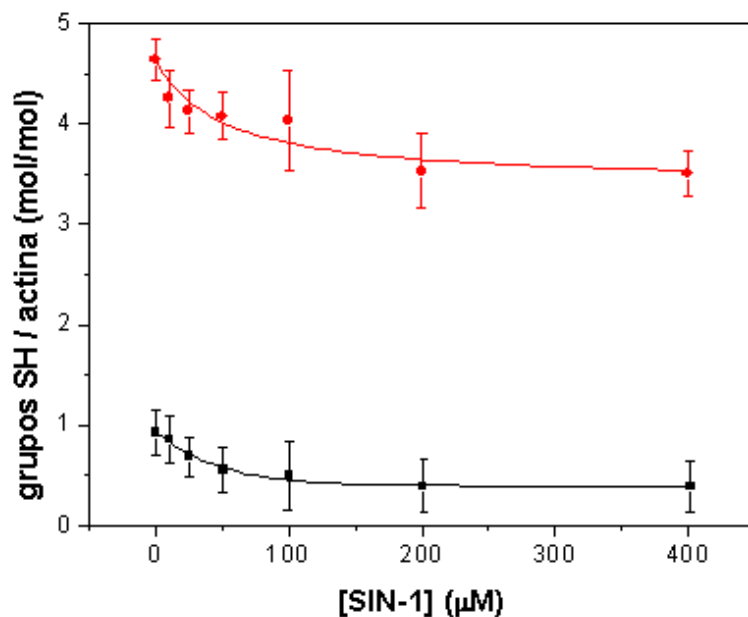


Figura 24 - Cisteínas reduzidas da F-actina, em mol cisteínas/mol de F-actina, após tratamento (durante 5 horas) de 6,24 µM de G-actina com 0, 10, 25, 50, 100, 200 e 400 µM de SIN-1. O tratamento realizou-se em solução G, pH 8,0 e a 25 °C. Absorvância a 412 nm ($\epsilon_{\text{DTNB}} = 13,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) após 10 minutos de exposição ao DTNB. (■) Cys374 reduzida com o aumento da concentração de SIN-1 presente na incubação; (●) Cisteínas totais reduzidas com o aumento da concentração de SIN-1.

Tiago et al (2006) descrevem a oxidação destes resíduos pelo peroxinitrito na F-actina e, tal como os resultados do presente trabalho, confirmam também que a Cys374 é a mais susceptível na estrutura filamentosa da actina.

No entanto, na análise da formação de 3-nitro-L-tirosinas e da oxidação dos resíduos de cisteína, é necessário ter atenção quando há referência à estrutura de F-actina, uma vez que a incubação com o SIN-1 durante as 5 horas não foi realizada numa solução em que a F-actina se mantivesse estável. É de lembrar que em solução G (solução de incubação) a F-actina pode despolimerizar para estruturas intermediárias

entre a estrutura de filamento e a de monómero, uma vez que esta solução não tem a concentração suficiente de KCl (50 mM), ATP (1 mM) e MgCl₂ (1mM).

III.4.4 – Efeito do peroxinitrito nas Metioninas da G-actina

Estudos realizados por Mornet e Ue (1984) permitiram compreender a acção de nove proteases diferentes na G-actina, entre elas a α -quimiotripsina e a subtilisina. Verificou-se que a G-actina consiste numa região maior de 33 kDa e numa menor de 9 kDa que é facilmente degradada. Ao clivarem a G-actina com a α -quimiotripsina verificaram a existência de um fragmento de 33 kDa que surgia após a degradação de um fragmento precursor de 35 kDa. Na digestão com a subtilisina obtiveram apenas um fragmento de 35 kDa.

No presente trabalho verificou-se a oxidação, por peroxinitrito, das metioninas 44 e 47. Estas metioninas são descritas por serem as mais expostas ao solvente e consequentemente as mais susceptíveis à oxidação (Dalle-donne et al, 2002).

Para verificar a oxidação entre os resíduos Met44 e Val45 e entre Met47 e Gly48 aproveitou-se o conhecimento sobre a susceptibilidade proteolítica da G-actina à α -quimiotripsina e a subtilisina, respectivamente.

III.4.4.A – Efeito do peroxinitrito na metionina 44 de G-actina

Na figura 25 pode verificar-se que na amostra controlo (sem SIN-1) (Poço c) ocorre corte na metionina 44, com o desaparecimento da banda de 42 kDa (massa molecular da G-actina) e outra a 33 kDa. Conforme se aumenta a concentração de SIN-1 a banda de 42 kDa torna-se mais evidente e a banda de 33 kDa fica menos visível. A diminuição do corte da G-actina pela α -quimiotripsina entre a metionina 44 e a valina

45 com o aumento de SIN-1, pode estar relacionado com a oxidação da metionina 44, com formação do grupo sulfóxido.

Para concentrações de SIN-1 superiores a 100 μM é de notar ainda o aparecimento muito ténue de uma banda de 35 kDa, correspondente ao fragmento precursor descrito anteriormente. Tal aparecimento consolida o facto de que a α -quimiotripsina não consegue clivar correcta e eficazmente.

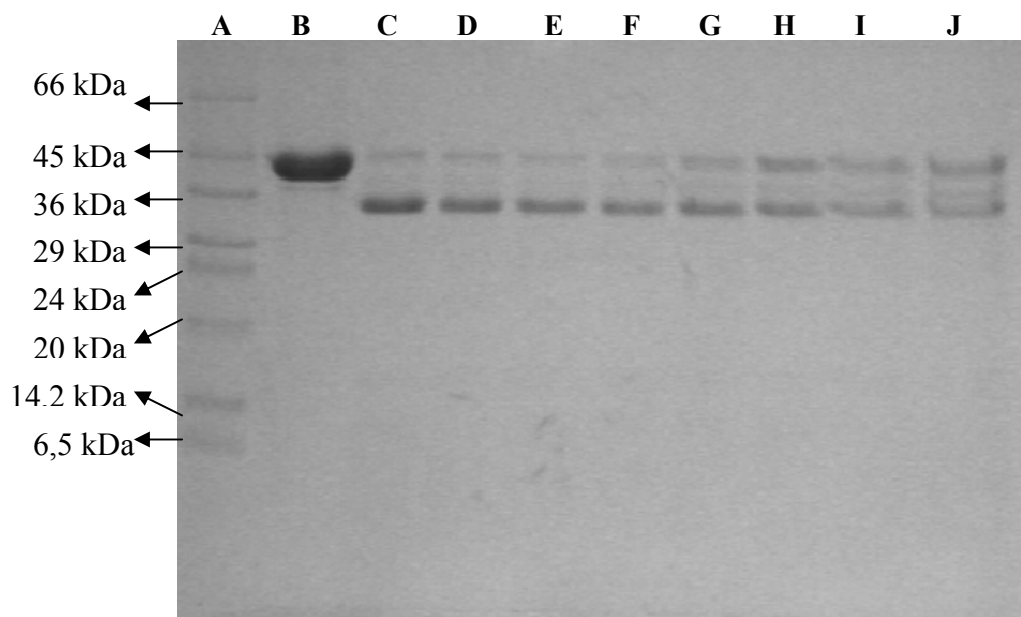


Figura 25 – Padrão electroforético de amostras de G-actina digeridas durante 90 minutos com α -quimiotripsina (1:40) após a incubação em solução G (pH 8,0), durante 5 horas a 25 °C na ausência de SIN-1 e de α -quimiotripsina (poço B) ou na presença de α -quimiotripsina com 0 μM SIN-1 (poço C), 25 μM de SIN-1 (poço D), 50 μM de SIN-1 (poço E), 100 μM de SIN-1 (poço F), 200 μM de SIN-1 (poço G), 400 μM de SIN-1 (poço H), 600 μM de SIN-1 (poço I) e 800 μM de SIN-1 (poço J). Poço (A): 5 μl de padrão de baixo peso molecular (6.6 – 66 kDa); Nos poços de B a J foram aplicados 20 μl de amostra correspondente a 5 μg de G-actina em cada poço. O gel correu numa voltagem de 90 V durante cerca de 2,5 horas.

Através da análise da densidade das bandas presentes no gel construiu-se um gráfico da razão entre a banda de 33 e a de 42 kDa em função da concentração de SIN-1 com que a G-actina foi incubada (Fig. 26). O IC_{50} foi calculado com base numa equação hiperbólica do tipo de Michaelis-Menten como explicado na secção III.4.2. Da análise da diminuição da razão entre as duas bandas (33 e 42 kDa), representado na figura 26, o IC_{50} obtido para a diminuição do corte na metionina 44 é de $58,7 \pm 19,2 \mu\text{M}$ de SIN-1.

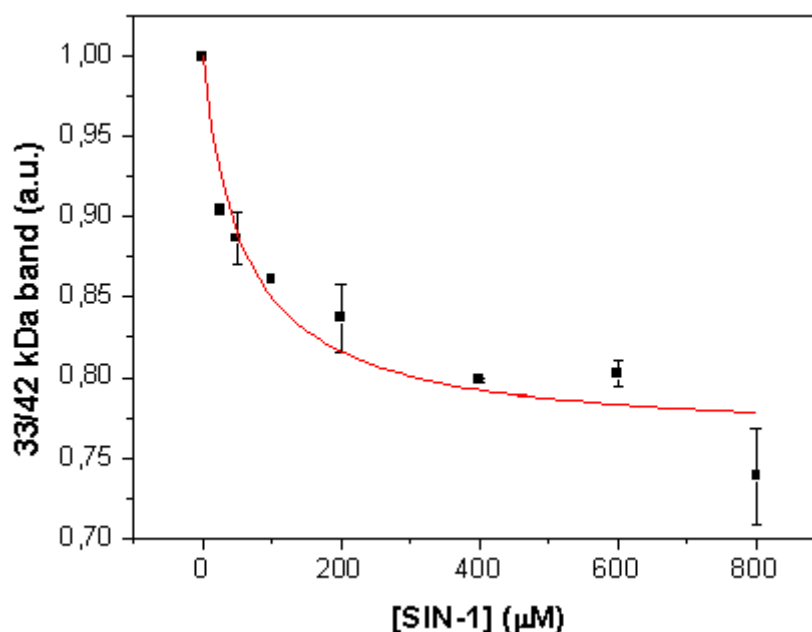


Figura 26 – Razão entre a densidade da banda 33 kDa e a de 42 kDa em função da concentração de SIN-1 (μM) no tratamento realizado com a G-actina ($8 \mu\text{M}$) durante 5 horas a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, em solução G e pH 8,0. A razão das amostras tratadas com SIN-1 foram normalizadas relativamente à amostra controlo, que se considerou como sendo de 1,0.

III.4.4.B – Efeito do peroxinitrito na metionina 47 de G-actina

Tal como foi referido anteriormente, a diminuição do corte da G-actina pela subtilisina entre a metionina 47 (Met47) e a glicina 48 (Gly) pode significar a oxidação desta metionina, com igual formação do grupo sulfóxido. A subtilisina cliva a G-actina resultando apenas num fragmento de 35 kDa. Observou-se que o corte entre a Met47 e a

Gly48 diminuía com o aumento da concentração de SIN-1 no tratamento da G-actina (Fig. 27). Pode-se observar, que na amostra controlo (sem SIN-1) (Poço c) o corte na Met47 é total, uma vez que a banda de 42 kDa (massa molecular da G-actina) é muito ténue e existe o aparecimento bem visível da banda de 35 kDa (Fig. 27). Estes dois factos indicam a boa eficácia da clivagem pela subtilisina e uma boa conservação da Met47. Ao aumentar a concentração de SIN-1 a banda de 42 kDa torna-se mais evidente e a de 35 kDa fica menos visível. Este facto resulta da menor clivagem pela subtilisina, como consequência de um possível aumento da oxidação da Met47 devido ao aumento da concentração de SIN-1.

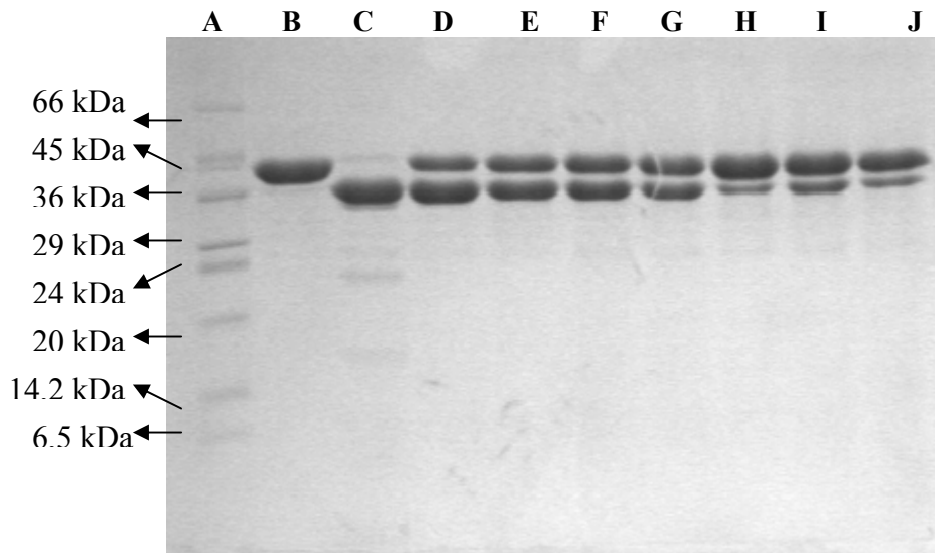


Figura 27 – Padrão electroforético de amostras de G-actina digeridas durante 10 minutos com subtilisina (1:1500) após a incubação em solução G (pH 8,0), durante 5 horas a 25 °C na ausência de SIN-1 e de subtilisina (poço B) ou na presença de subtilisina com 0 μM SIN-1 (poço C), 25 μM de SIN-1 (poço D), 50 μM de SIN-1 (poço E), 100 μM de SIN-1 (poço F), 200 μM de SIN-1 (poço G), 400 μM de SIN-1 (poço H), 600 μM de SIN-1 (poço I) e 800 μM de SIN-1 (poço J). Poço (A): 5 μl de padrão de baixo peso molecular (6.6 – 66 kDa); Nos poços de B a J foram aplicados 20 μl de amostra correspondente a 5 μg de G-actina em cada poço. O gel correu numa voltagem de 90 V durante cerca de 2,5 horas.

Pela análise do gel e da densidade das bandas construiu-se um gráfico com a razão entre a banda de 35 e a de 42 kDa em função da concentração de SIN-1 utilizada na incubação de G-actina (Fig. 28). Da análise da figura 28 obteve-se um IC_{50} para a diminuição do corte na metionina de $30,8 \pm 8,8 \mu\text{M}$ de SIN-1, significando que esta metionina é mais susceptível do que a metionina 44 e que pode estar mais exposta. Mais uma vez este IC_{50} foi calculado com base numa equação hiperbólica do tipo de Michaelis-Menten como explicado na secção III.4.2.

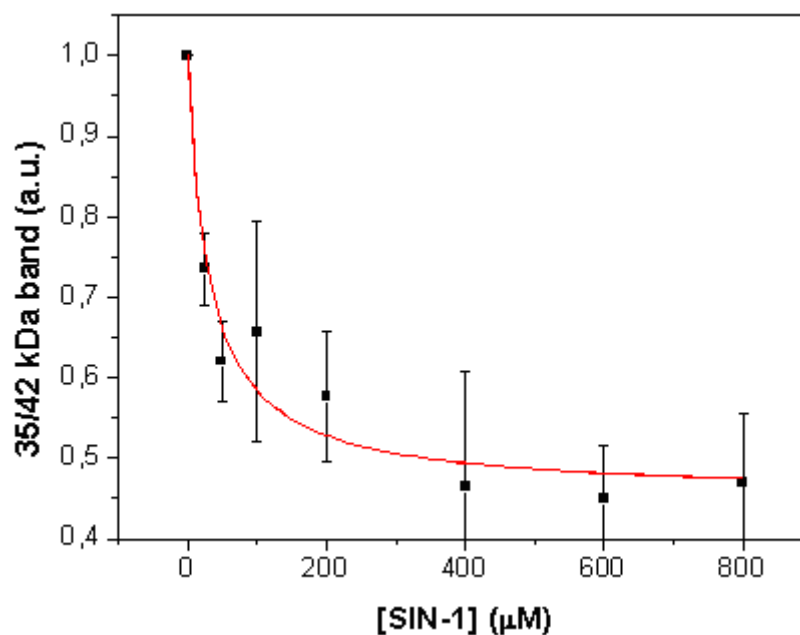


Figura 28 – Diminuição do corte realizado pela subtilisina, observado por uma diminuição da banda 35 de kDa e por um aumento da banda de 42 kDa, com o aumento da concentração de SIN-1. A G-actina ($8 \mu\text{M}$) foi incubada a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 horas com SIN-1, em solução G, pH 8,0. Considerou-se a razão na amostra controlo como 1,0 e posteriormente as razões das restantes amostras foram comparadas com esta.

Neste trabalho apenas se sugere a oxidação destas metioninas, no entanto, não se confirmou este facto. É possível que, em vez da oxidação das metioninas, esteja a ocorrer uma alteração estrutural da G-actina e que a acessibilidade, das enzimas de corte, ao local de clivagem seja diminuída. Para confirmar qual o acontecimento que

realmente ocorre sugere-se que antes da digestão com as enzimas (α -quimiotripsina e subtilisina) haja uma desnaturação da proteína, com SDS, por exemplo. A proteína num estado desnaturado tem todos os resíduos expostos ao solvente e acessíveis à clivagem pelas enzimas. Se o resultado for idêntico ao que se obteve neste trabalho (diminuição igual do corte pelas enzimas), pode-se então concluir que o que acontece de facto é a oxidação destes resíduos de metioninas e que não existe nenhuma alteração estrutural que impede estas enzimas de clivarem a G-actina. Se no entanto o corte for idêntico para as várias concentrações de SIN-1 com que a proteína foi incubada, então isso significa que o que acontece é uma alteração da estrutura da G-actina que torna menos acessíveis as metioninas alvo de corte pelas enzimas.

Dos resíduos de G-actina analisados pode-se concluir que os mais susceptíveis à oxidação pela acção do peroxinitrito são as cisteínas e as metioninas, uma vez que não houve formação de 3-nitro-L-tirosinas. Ambos os resíduos de cisteína e de metionina possuem um átomo de enxofre (S) que facilmente se liga a mais um par de electrões resultante do ambiente oxidante da incubação com SIN-1. As cisteínas são, no entanto, mais susceptíveis ao peroxinitrito do que as metioninas, sendo a Cys374 o primeiro alvo de oxidação, uma vez que é o resíduo com menor IC_{50} para a sua oxidação ($10,9 \pm 2,5 \mu\text{M}$ de SIN-1).

Tal como já foi discutido por Dalle-Donne (2002), existe claramente uma gradual oxidação de resíduos da G-actina que posteriormente mostram ser factores importantes na polimerização. Assim sendo, numa sequência de acontecimentos, na G-actina, a Cys374 é o primeiro resíduo a sofrer oxidação (IC_{50} de $10,9 \pm 2,5 \mu\text{M}$ de SIN-1), seguida das restantes cisteínas ($IC_{50} = 24,4 \pm 0,8 \mu\text{M}$ SIN-1), segue-se a diminuição do corte pela subtilisina (sugestão de oxidação da Met47) e por último o corte com a α -quimiotripsina (sugestão de oxidação da Met44), IC_{50} de $30,8 \pm 8,8 \mu\text{M}$ de SIN-1 e de

58,7 ± 19,2 µM de SIN-1, respectivamente. Na polimerização o IC₅₀ (58,46 ± 10,39 µM SIN-1) é bem maior que o correspondente à oxidação da Cys374 (10,9 ± 2,5 µM de SIN-1), maior que o da oxidação das cisteínas totais (IC₅₀ = 24,4 ± 0,8 µM SIN-1) e que o da oxidação da Met47 (30,8 ± 8,8 µM de SIN-1) sugerida anteriormente. No entanto é um valor muito semelhante ao da oxidação da metionina 44, sugerindo que esta metionina pode ser importante na polimerização dos monómeros. Esta metionina encontra-se no subdomínio 2 da actina, no “loop” 38-52 e esta região da actina foi sugerida, por Kim e Reisler (1996), por interagir com o C-terminal na F-actina. Assim sendo, em condições oxidantes, se esta metionina estiver oxidada, como é proposto, não vai estar totalmente funcional. Deste modo a interacção entre o “loop” 38-52 e o C-terminal da F-actina não se realiza nas condições ideais e conseqüentemente a extensão de polimerização da G-actina vai diminuir.

CONCLUSÃO

A exposição da actina ao peroxinitrito, resultante da decomposição do SIN-1, provoca uma inibição da polimerização da G-actina em F.actina. Esta inibição da polimerização vai induzir, *in vivo*, um desequilíbrio entre a forma monomérica e a forma filamentosa da actina. O valor de IC₅₀ encontrado para o t_{1/2} da polimerização, da actina tratada com SIN-1, foi de 58,46 ± 10,39 μM de SIN-1.

De modo a determinar quais as alterações nos resíduos de actina que conduzem à inibição da polimerização e conseqüente inibição da sua função analisou-se a nitração de tirosinas e a oxidação das cisteínas e das metioninas. Verificou-se que não há nitração de tirosinas com formação de 3-nitro-L-tirosinas na G-actina exposta ao peroxinitrito, significando que a oxidação deste resíduo não afecta a polimerização da actina. Pelo contrário, as cisteínas da G-actina foram oxidadas, sendo a Cys374 a mais susceptível ao peroxinitrito, uma vez, que é completamente oxidada para concentrações de SIN-1 iguais ou superiores a 50 μM. De referir ainda uma possível oxidação das metioninas 44 e 47 com IC₅₀ de 58,7 ± 19,2 μM de SIN-1 e de 30,8 ± 8,8 μM de SIN-1, respectivamente. Se esta oxidação for confirmada sugere-se que a modificação oxidativa da Met44 pode contribuir para a inibição da polimerização, uma vez que ambos apresentam IC₅₀ muito semelhantes.

É de relevar a importância deste trabalho uma vez que esta proteína desempenha um papel importante em vários mecanismos biológicos e é um potencial alvo do peroxinitrito, como se observou no presente estudo em que a G-actina é bastante susceptível ao peroxinitrito, resultante da decomposição do SIN-1.

ESTUDOS FUTUROS

No sentido de esclarecer melhor a inibição da dinâmica de polimerização da G-actina em F-actina pela exposição ao peroxinitrito (ONOO-) resultante da decomposição do SIN-1, sugere-se como estudos futuros: 1) Confirmar a oxidação da Met44 e da Met47 pela desnaturação, com SDS, da actina tratada com SIN-1, antes da digestão com α -quimiotripsina e subtilisina, respectivamente; 2) Estudar a mutagénese da Cys374, da Met44 e da Met47 para clarificar quais destes resíduos é relevante para a polimerização da actina; 3) Estudar o efeito de agentes anti-oxidantes na actina tratada com SIN-1 na polimerização da actina e na oxidação de cisteínas e metioninas; 4) Propõem-se ainda realizar os mesmos estudos do efeito do peroxinitrito, na F-actina, assim como também se sugere a análise, do efeito do peroxinitrito, na despolimerização de F-actina.

REFERÊNCIAS

Alvarez, B. e Radi, R.; “*Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins*”, Amino Acids, **25**:295-311, 2003.

Azevedo, C., “*Biologia Celular e Molecular*”, 3ª edição, LIDEL, 1999.

Beal, F. M., “*Oxidatively modified proteins in aging and disease*”, Free Radical Biology and Medicine, **32**: 797-803, 2002.

Cadenas, E. e Forman , H. J., “*Oxidative Stresse and Signal Transduction*”, Chapman & Hall, 1997.

Carvalho, F. O., Ferreira, J. J., et al., “*Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho*”, Jornal Brasileiro de Patologia e Medicinal Laboratorial, **38**: 33-38, 2002.

Clements, M. K., Siemsen, D. W. et al., “*Inhibition of actin polymerization by peroxynitrite modulates neutrophil functional responses*, J. Leukocyte Biol., **73**:344-355, 2003.

Dalle-Donne, I., Milzani, A. et al., “*The tert-butyl hydroperoxide-induced oxidation of actin cys-374 is coupled with structural changes in distant regions of the protein*”, Biochemistry, **38**:12471-12480, 1999.

Dalle-Donne, I., Rossi, R. et al., “*Methionine oxidation as a major cause of the functional impairment of oxidized actin*”, Free Radical Biology and Medicine, **32**:927-937, 2002.

Elzinga, M., Collins, J. H. et al., “*Complete amino-acid sequence of actin of rabbit skeletal muscle*”, Proc. Nat. Acad. Sci., **70**:2687-2691, 1973.

Haycock, J. W., Jones, P. et al., “*Differential susceptibility of human skeletal muscle proteins to free radical induced oxidative damage: a histochemical,*

immunocytochemical and electron microscopical study in vitro", Act. Neuropathol., **92**:31-340, 1996.

Ischiropoulos, H., Al-Mehdi, B. A., "*Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications*", FEBS, **364**:279-282, 1995.

Jeong, J. K., Juedes, J. M., et al., "*Mutations induced in dupF gene of pSP189 by hydroxyl radical and singlet oxygen: relevance to peroxynitrite mutagenesis*", Chem. Res. Toxicol., **11**:550-556, 1998.

Kim, E., Reisler, E., "*Intermolecular coupling between loop 38-52 and the C-terminus in actin filaments*", Biophys. J., **71**:1914-1919, 1996.

Kirsch, M. e de Groot, H., "*Reaction of peroxynitrite with reduced nicotinamide nucleotides, the formation of hydrogen peroxide*", J. Biol. Chem., **274**:24664-24670, 1999.

Laemmli, U.K., "*Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4*", Nature, **227**:680-685, 1970.

Levine L. R., Berlett, S. B., "*Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage*", Mechanisms of Ageing and Development, **107**:323-332, 1999.

Li, X., De Sarno, P. et al., "*Peroxynitrite modulates tyrosine phosphorylation and phosphoinositide signalling in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: attenuated effects in human 1321NI astrocytoma cells*", Biochem. J., **331**:599-606, 1998.

Martin-Romero, F., Gutiérrez-Martin, Y. et al., "*Fluorescence measurements of steady state peroxynitrite production upon SIN-1 decomposition: NADH versus Dihydrodichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123*", Journal of Fluorescence, **14**:17-23, 2004.

Mihm, M. J., Yu, F. et al., "*Impaired myofibrillar energetics and oxidative injury during human atrial fibrillation*", Circulat., **104**:174-180, 2001.

Milzani, A., Dalle-Donne, I., et al., “*Prolonged oxidative stress on actin*”, Arch. Biochem. Biophys., **339**:267-274, 1997.

Mornet, D. e Ue, K., “*Proteolysis and structure of skeletal muscle actin*”, Proc. Natl. Acad.Sci., **81**:3680-3684, 1984.

Mossakowska, M., Moraczewska, J., et al., “*Proteolytic removal of three C-terminal residues of actin alters the monomer-monomer interactions*”, Biochem. J., **289**:897-902, 1993.

Oshima, H., Tatemichi M., et al., “*Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis*”, Arch. Biochem. Biophys., **417**:3-11, 2003.

Pardee, J. D., Spudis, J. A., “*Purification of muscle actin*”, Meth. Enzym., **85**:164-181, 1982.

Radi, R., Beckman, S. J., et al., “*Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls – The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide*”, J. Biol. Chem., **266**:4244-4250, 1991.

Robyt, J. F., White, B. J., “*Biochemical techniques theory and practice*”, Waveland Press Inc., 1990.

Scalios, J. G., “*Oxidative Stress responses – What have genome –scale studies taught us?*”, Genome Biology, **3**: 1019.1-1019.6, 2002.

Sellers, J. R., “*Myosins*”, 2nd edition, Oxford University Press, 1999.

Sheterline, P., Clayton J. et al., “*Actin*”, 4th edition, Oxford University Press, 1998.

Singh, J. R., Hogg, N. et al., “*The peroxynitrite generator, SIN-1, becomes a nitric oxide donor in the presence of electron acceptors*”, Arch. Biochem. Biophys., **361**:331-339, 1999.

Takashi, R., “*Fluorescence energy transfer between subfragment-1 and actin points in the rigor complex of actosubfragment-1*”, Biochemistry, **18**: 5164-5169, 1979.

Tiago, T., Ramos, S., et al., “*Peroxynitrite induces F-actin depolymerization and blockade of myosin ATPase stimulation*”, BBRC, **342**:44-49, 2006.

Vandekerckhove, J. e Webber, K., “*Actin amino-acid sequences. Comparison of actins from calf thymus, bovine brain, and SV40-transformed mouse 3T3 cells with rabbit skeletal muscle actin*”, Eur. J. Biochem., **90**:451-562, 1978.

Voet, D. e Voet, J. G., “*Biochemistry*”, 2nd edition, John Wiley and Sons, Inc., 1995.

Wang, Y. F., Fan, L. M., et al., “*Ca²⁺-Permeable channels in the plasma membrane of Arabidopsis pollen are regulated by actin microfilaments*”, Plant Physiology, **136**:3892-3904, 2004.

Weber, K., Osborn, M., “*The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulphate-polyacrilamide gel electroforesis*”, J. Biol. Chem., **244**:4406-4412, 1969.

Zimm, B. H., “*Apparatus and methods for measurement and interpretation of the angular variation of light scattering – preliminary results on polystyrene solutions*”, J. Chem. Phys., **16**:1099-1116, 1948.

- <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/actin>
- <http://www.bbri.org/faculty/dominguez/Movies>

ANEXO

Poster apresentado no XV Congresso Nacional de Bioquímica da SPB, Aveiro 2006

Peroxynitrite-mediated impairment of G-actin/F-actin equilibrium

Teresa Tiago¹, Dorinda Silva¹, Carlos Gutiérrez-Merino² and Manuel Aureliano¹

¹CCMar, Depto. de Química e Bioquímica, FCT, Universidade do Algarve, 8000-139 Faro, Portugal; ²Depto. Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, 06071-Badajoz, Spain. Email: a21563@ualg.pt

In recent years peroxynitrite (ONOO⁻) has been shown to play a major role in an increasing list of diseases including cardiac dysfunctions and neurodegenerative disorders. In aged skeletal muscle, actin is one of the proteins showing higher content of the commonly used fingerprint marker of peroxynitrite-reactivity to proteins, 3-nitrotyrosine [1]. Furthermore, we have recently shown that an exposure to submicromolar fluxes of ONOO⁻, produces an extensive depolymerization of the actin filaments (F-actin) leading to an almost complete blockade of myosin ATPase activity stimulation [2]. Nevertheless, the contribution of Cys oxidation and additional protein modifications, namely Met oxidations induced by ONOO⁻ to the alterations of the three dimensional structure of the actin monomer (G-actin) and consequently to the imbalance of F-actin/G-actin equilibrium have yet to be clarified. In this work, we report that in the monomeric form, actin is more susceptible to cysteines oxidation by the peroxynitrite-releasing agent 3-morpholinosydnonimine (SIN-1) than in the filamentous form. The IC₅₀ value for SIN-1-induced oxidation of the more exposed cysteine (Cys-374) was 10.9 ± 2.5 and 41.5 ± 8.2 , i.e., a ratio of approximately 1/1 and 1/5 mol SIN-1/mol protein, for G-actin and F-actin, respectively. Moreover, of the five cysteines present in the actin molecule, up to 2.5 Cys were found to be oxidized in G-actin (IC₅₀ = 24.4 ± 0.8 μM SIN-1) against only one (Cys-374) in F-actin. A decreased susceptibility to limited proteolysis by α-chymotrypsin and subtilisin of SIN-1 treated G-actin revealed that both Met-44 and Met-47 are oxidized to the sulfoxide derivative with IC₅₀ values of 58.7 ± 19.2 μM and 30.8 ± 8.8 μM de SIN-1, respectively. G-actin structural alterations upon SIN-1 exposure resulted in a decrease of the maximum rate of polymerization as monitored by light-scattering, meaning an increased of the half-life needed to reach the maximum polymerization extent upon SIN-1 concentration increase (IC₅₀ = 58.5 ± 10.4 μM SIN-1). Although the oxidation of Cys-374 precedes that of Met-44 and Met-47, the close IC₅₀ values obtained for the inhibition of G-actin polymerization and methionines oxidation suggests that these residues may play a relevant role in the functional impairment of peroxynitrite-induced actin oxidation.

[1] J. Kanski, S.J. Hong and C. Schoneich, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 24261-24266.

[2] T. Tiago, S. Ramos, M. Aureliano and C. Gutiérrez-Merino, *BBRC* 342 (2006) 44-49.

TT is supported by a post-doctoral grant (SFRH/BPD/20777/2004) from the Portuguese Foundation for Science and Technology (FCT).