

3. Proteínas

Faremos uma breve introdução sobre proteínas usando os livros textos que constam nas referências: Lehninger et al., 1993; Stryer, 1995 e Dose, 1982.

3.1 Estrutura de Proteínas

Em animais superiores, as proteínas são os compostos orgânicos mais abundantes, representam cerca de 50 % do peso seco dos tecidos. Do ponto de vista funcional, seu papel é fundamental, não existindo processo biológico que não dependa da presença ou da atividade deste tipo de biomolécula. As proteínas desempenham inúmeras funções distintas, como por exemplo: enzimas, hormônios, proteínas transportadoras, anticorpos e receptores de muitas células.

Todas as proteínas contêm carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio e muitas possuem enxofre. Há variações na composição de diferentes proteínas, porém a quantidade de nitrogênio, representa, em média, 16 % da massa total da molécula. Dessa forma pode-se calcular a quantidade aproximada de proteína em uma amostra medindo-se a quantidade de nitrogênio da mesma. As proteínas são moléculas poliméricas de grande tamanho, pertencendo à categoria das macromoléculas, constituídas por um grande número de unidades monoméricas estruturais – os aminoácidos – que formam grandes cadeias. Devido a esse grande tamanho, quando são dispersas em um solvente adequado, formam soluções coloidais, que possuem características especiais que as distinguem das soluções de moléculas pequenas. Por meio da hidrólise podemos clivá-las em seqüências menores de aminoácidos, pois centenas ou milhares de aminoácidos podem participar na formação de uma grande molécula polimérica de uma proteína.

As proteínas são formadas através de ligações peptídicas entre os diversos tipos de aminoácidos e podemos classificá-las em duas grandes categorias:

- Proteínas globulares: são proteínas em que as cadeias de aminoácidos se voltam sobre elas mesmas, formando um conjunto compacto que tem forma esférica ou elipsoidal, em que os três eixos da molécula tendem a ser de tamanhos similares. Em geral, são proteínas de grande atividade funcional, como por exemplo, as enzimas, os anticorpos, os hormônios, a hemoglobina; são solúveis em meios aquosos.
- Proteínas fibrosas: são proteínas em que as cadeias de aminoácidos se ordenam de maneira paralela, formando fibras ou lâminas estendidas, nas quais o eixo longitudinal predomina sobre os transversais. Em geral, são pouco solúveis em água e participam na formação de estruturas de sustentação, como as fibras do tecido conjuntivo e outras formações de tecidos de grande resistência mecânica.

A estrutura molecular das proteínas é muito complexa, por essa razão é conveniente dividi-la em níveis distintos de organização:

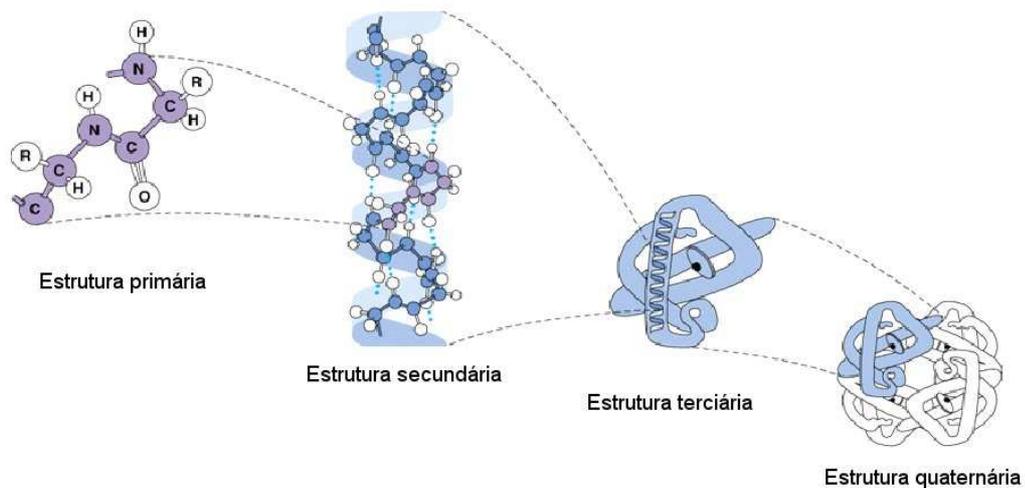


Figura 3.1 Níveis de organização da estrutura molecular de uma proteína.

- Estrutura primária: refere-se ao número e identidade dos aminoácidos que compõem a molécula e ao ordenamento ou seqüência dessas unidades na cadeia polipeptídica. A união peptídica somente permite a formação de estruturas lineares e por isso, as cadeias não apresentam ramificações.

- Estrutura secundária: a medida que o comprimento das cadeias vai aumentando e em função das condições físico-químicas do meio, se cria a estrutura secundária, que é a disposição espacial regular, repetitiva, que a cadeia polipeptídica pode adotar, geralmente mantida por ligações de hidrogênio. Podemos ter:
 - a) Hélice-alfa: as cadeias de aminoácidos têm vários centros polares e, devido a isto, a fibra enrola-se dando lugar a uma hélice que se estabiliza formando ligações intramoleculares com pontes de hidrogênio.

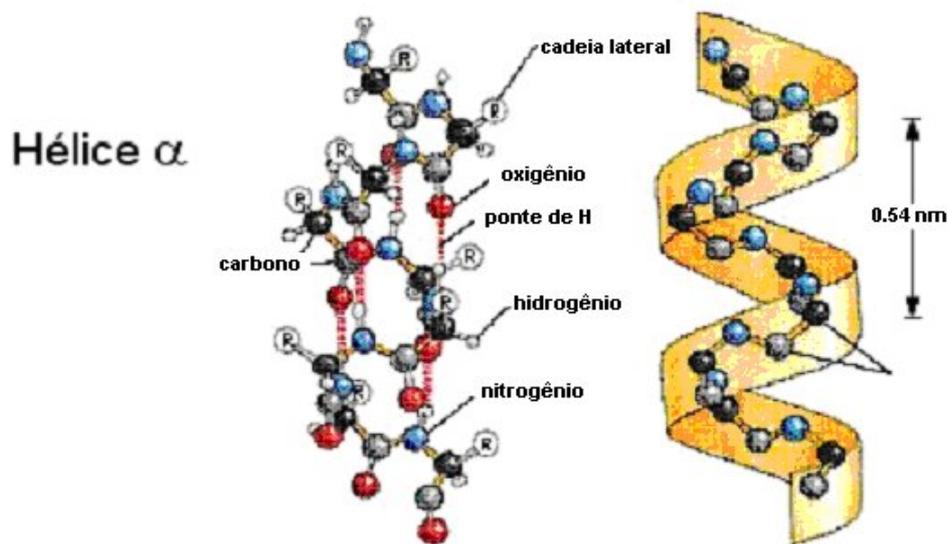


Figura 3.2 Exemplo de uma estrutura do tipo hélice-alfa.

- b) Folha-beta: as cadeias de peptídeos se unem formando filas paralelas que se estabilizam de maneira intermolecular mediante pontes de hidrogênio.

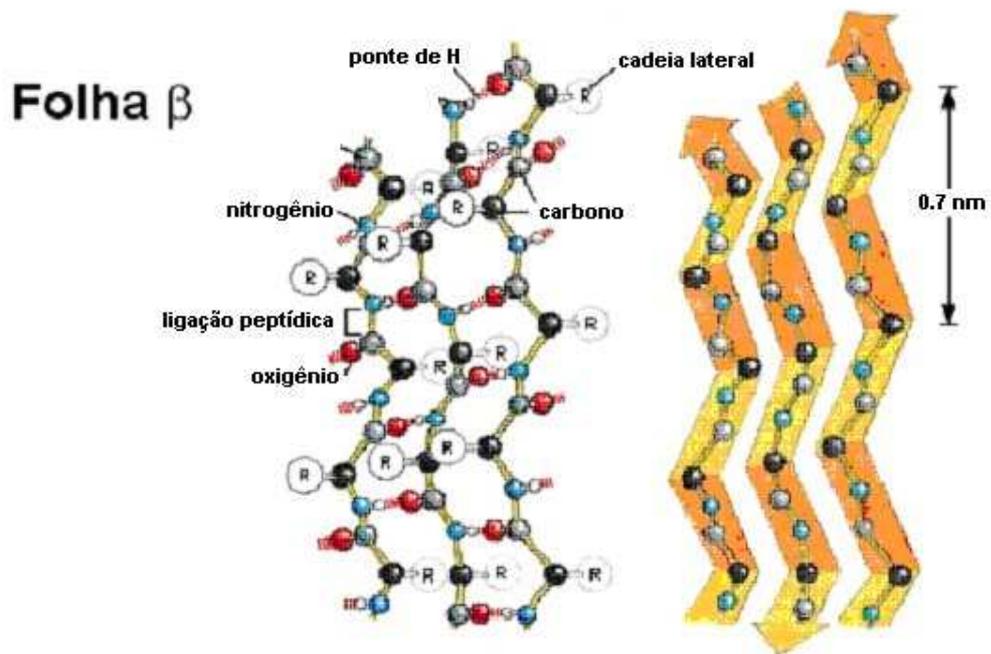


Figura 3.3 Exemplo de uma estrutura do tipo folha-beta.

- Estrutura terciária: é a estrutura da maioria das proteínas globulares, aparece a partir das hélices, que voltam a enrolar-se. É uma estrutura tridimensional completa que forma-se a partir das forças de atração ou repulsão eletrostática, das pontes de hidrogênio, das forças de Van der Waals e das pontes dissulfeto existentes entre os resíduos de aminoácidos que formam as cadeias.

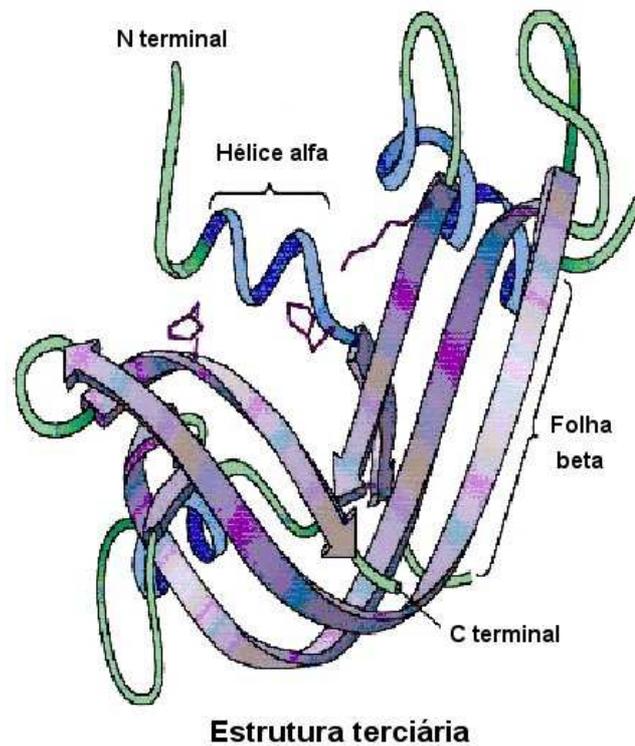


Figura 3.4 Exemplo de estrutura terciária de uma proteína.

- Estrutura quaternária: são estruturas de caráter oligomérico, que estão compostas por várias moléculas separadas, mas entrelaçadas em estrutura terciária. Se aplica somente a proteínas constituídas por duas ou mais cadeias polipeptídicas e se refere a disposição espacial dessas cadeias e as ligações que se estabelecem entre elas – pontes de hidrogênio, atrações eletrostáticas, interações hidrofóbicas, pontes dissulfeto entre cisteínas de cadeias diferentes. Um exemplo deste tipo de estrutura é a hemoglobina que é composta por quatro subunidades semelhantes à mioglobina.

3.2 Albumina e Insulina

Albumina sérica é uma das proteínas mais estudadas e é a mais abundante no plasma com uma concentração típica de 5g / 100ml. Muitos pesquisadores têm estudado a estrutura e as propriedades da albumina sérica e suas interações com

outras proteínas com o intuito de compreender todas as suas funções no organismo (Friedli, 2005).

A albumina sérica é a mais abundante proteína no sistema circulatório e contribui em 80% para a manutenção da pressão osmótica do sangue. É também um dos principais responsáveis pela manutenção do pH do sangue. Nos mamíferos, a albumina é sintetizada inicialmente como preproalbumina pelo fígado. Após a remoção do peptídeo sinal, tem-se a proalbumina que será modificada pela remoção de seis resíduos de propeptídeo do novo terminal N. A albumina enviada para a circulação sanguínea possui uma meia-vida de 19 dias. Como a albumina é sintetizada no fígado, a diminuição de sua quantidade no plasma pode ser produto de uma doença hepática, mas também pode ser o resultado de uma doença renal que permita que a albumina escape pela urina. Sua diminuição pode também estar relacionada a desnutrição ou uma dieta pobre em proteínas.

Existem resultados contraditórios e muitas discussões sobre a determinação da estrutura da albumina, porém com base em experimentos de hidrodinâmica e espalhamento de raios-X, a albumina sérica aproxima-se de um elipsóide de 140 x 40 Angstroms com três domínios homólogos. Albuminas são caracterizadas por conterem um número pequeno de resíduos de triptofano e metionina e um alto número de cistina e aminoácidos carregados, ácidos aspártico e glutâmico, lisina e arginina. O conteúdo de glicina e isoleucina é menor que a média encontrada em proteínas. Tanto a albumina bovina (BSA) quanto a humana (HSA) possuem apenas um resíduo de cisteína livre, Cys34. Os outros formam 17 pontes dissulfeto ajudando a manter a estrutura terciária. A albumina bovina (BSA) possui 2 resíduos de triptofano, Trp134 e Trp212 e a humana (HSA) apenas um, Trp214. A Fig. 3.5 abaixo mostra a estrutura de cadeias de duas moléculas de HSA (PDB, 1BM0), onde os resíduos Cys34 e Trp214 aparecem como esferas.

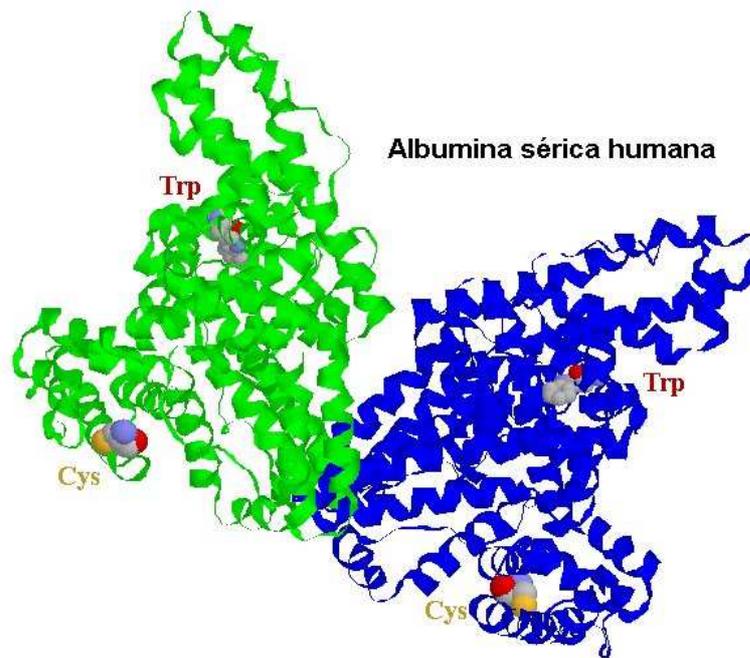


Figura 3.5 Estrutura quaternária da HSA com os resíduos de cisteína e triptofano em destaque. (Construída a partir das coordenadas 1BM0, disponíveis no PDB, Protein Data Bank)

Talvez, a mais interessante propriedade da albumina seja sua capacidade de ligar-se reversivelmente a uma grande variedade de ligantes. A albumina é a principal transportadora de ácidos graxos, que são insolúveis no plasma sanguíneo. Também possui muitas outras funções, como seqüestrar radicais livres de oxigênio e inativar vários metabólitos lipofílicos tóxicos como a bilirrubina. A albumina tem uma grande afinidade por ácidos graxos, hematina, bilirrubina e por pequenos compostos aromáticos negativamente carregados. Forma ligações covalentes com fosfato piridoxil, cisteína, glutathione e vários metais como cobre, níquel, mercúrio, prata e ouro. No plasma circulante, aproximadamente 30 % dos grupos $-SH$ livres, Cys34, são oxidados por cisteína e glutathione. Como a albumina é uma proteína transportadora multifuncional, acredita-se que ela possa ser uma transportadora ou reservatório de óxido nítrico, e possa estar relacionada com importantes processos fisiológicos ainda não compreendidos envolvendo o NO.

A insulina é uma proteína composta de duas cadeias polipeptídicas, chamadas de cadeia A e cadeia B. As cadeias A e B são mantidas unidas por duas pontes dissulfeto; há uma outra ponte dissulfeto no interior da cadeia A. Não há

cisteína livre. Na maioria das espécies, a cadeia A consiste de 21 resíduos de aminoácidos e a cadeia B, de 30. Na molécula de insulina não há resíduos de triptofano. A Fig. 3.6 mostra a estrutura de cadeias de duas moléculas de insulina (PDB, 1GUJ), onde os resíduos de cisteína formam pontes dissulfeto, estão apresentados na estrutura esfera-bastão.

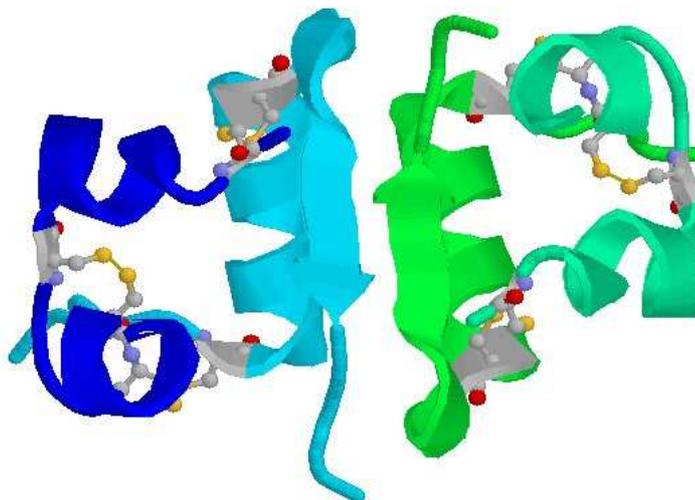


Figura 3.6 Duas moléculas de insulina com as pontes dissulfeto em destaque. (Construída a partir das coordenadas 1GUJ, disponíveis no PDB, Protein Data Bank)

Apesar da seqüência de aminoácidos da insulina variar entre espécies, certos segmentos da molécula são altamente conservados, incluindo as posições das três pontes dissulfeto, os finais da cadeia A e os resíduos C-terminal da cadeia B. Estas similaridades na seqüência de aminoácidos da insulina levam a uma conformação tridimensional que é muito parecida entre as espécies. Dessa forma uma molécula de insulina de um animal tem uma atividade biológica muito semelhante quando inoculada em outro animal de espécie diferente. Por isso, a insulina do porco foi muito usada no tratamento de pacientes humanos diabéticos.

O nível de glicose sangüínea nos mamíferos é controlado principalmente por dois hormônios protéicos produzidos no pâncreas pelas ilhotas de Langerhans: a insulina e o glucagon. A função da insulina é estimular a entrada de glicose do sangue para o interior das células sempre que houver hiperglicemia, como após as refeições. A ligação da insulina aos seus receptores na membrana da célula, desencadeia uma série de reações bioquímicas em cascata, fosforilações e desfosforilações a partir do receptor de tirosina cinase, que aumentarão o número

de receptores de glicose na membrana da célula, conhecidos como receptores GLUT. Já o glucagon estimula a liberação de glicose especialmente no fígado e no tecido adiposo em casos de hipoglicemia, como nos intervalos entre as refeições. Os indivíduos que não produzem insulina suficiente para o controle da glicemia sanguínea são portadores de diabetes do tipo 1 – juvenil – e dependem da administração de insulina. Os portadores de diabetes tipo 2 em geral são adultos que produzem insulina em quantidade suficiente ou aumentada, mas suas células não são sensíveis a ela. Através do trabalho de Frederick Sanger, a insulina foi o primeiro hormônio peptídico a ter sua seqüência de aminoácidos conhecida (Miranda e Loffredo, 2005).

3.3

Modificação de Proteínas por Óxidos de Nitrogênio

Em células, os principais alvos de espécies reativas derivadas de óxido nítrico são proteínas e resíduos de aminoácidos que contém cisteína e tirosina. Stamler et al. (1992) demonstraram que proteínas S-nitrosiladas são formadas sob condições fisiológicas e possuem efeitos de vasodilatação e inibição plaquetária. Essas observações sugeriram que grupos S-nitrosotíóis pertencentes a proteínas podem servir como intermediários no metabolismo celular do NO e apresentam a possibilidade de um mecanismo celular adicional regulatório. Usando BSA e NaNO₂ em meio ácido e espectroscopia de absorção, esses autores obtiveram a confirmação da formação de S-nitrosotíóis em proteínas.

Nitrito de sódio (NaNO₂) em meio ácido (HCl) produz HNO₂ e pequenas quantidades de N₂O₃ e NOCl, todos agentes de nitrosação. S-nitrosothiols podem ser facilmente sintetizados em laboratório pela reação entre tíóis e ácido nitroso (formado por nitrito em HCl, por exemplo).



Esse caminho não ocorre em pH fisiológico e é relevante em condições de acidez extrema (pH < 3). No laboratório este método é adequado para tíóis de pequena massa molecular, como glutatona e cisteína, mas não proteínas por causa da desnaturação ácida e porque outros grupos funcionais, como aminas, álcoois e aromáticos, são susceptíveis a modificações por nitrito acidificado (Hogg, 2002). Para síntese de S-nitrosotíóis de proteínas, um método mais adequado envolve a

transferência espontânea do grupo nitroso de um S-nitrosotiol de baixa massa molecular. No entanto, essa reação é reversível, sendo a constante de equilíbrio ~ 1 .

S-nitrosotióis possuem dois picos de absorção máxima, um na região de 320-360 nm e outro muito menor em ~ 550 nm. Para S-nitroso BSA, foram obtidos picos em 335 e 545 nm com coeficientes de absorção molar de $3869 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e $47 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, respectivamente (Stamler et al., 1992).

Zhang et al. (1996) estudaram a nitrosação da BSA com NaNO_2 em meio ácido em comparação com a nitrosação de carboximetil-BSA, em que o grupo tiol está covalentemente ligado. Obtiveram resultados que indicaram que outros grupos além de cisteína estavam reagindo com HNO_2 e formavam cromóforos com espectro de absorção semelhante ao de S-nitrosotióis. Através de medidas espectrofotométricas de 16 modelos de dipeptídeos, que continham o resíduo de glicina e mais um resíduo variável, mostraram que o dipeptídeo glicina-triptofano era o único que apresentava significativa nitrosação nestas condições e que o grupo NO ligava-se ao nitrogênio do anel indol do triptofano. Comparando estes resultados com os obtidos para BSA nativa e bloqueada concluíram que resíduos de triptofano eram nitrosados nesta proteína, e não apenas resíduos de cisteína.

Rassaf et al. (2002) mostraram a presença concomitante de proteínas do tipo N-nitroso e S-nitroso no plasma humano. Usando quimioluminescência em fase gasosa e cromatografia líquida, mediram os níveis basais no plasma de metabólitos relacionados ao NO em 18 voluntários saudáveis. Eles descobriram que em adição aos produtos oxidativos do metabolismo do NO, nitrito ($0,20 \pm 0,02 \mu\text{M}$) e nitrato ($14,4 \pm 1,7 \mu\text{M}$), o plasma humano médio contém aproximadamente 5 vezes mais concentrações de espécies de N-nitroso ($32,3 \pm 5,0 \text{ nM}$) que S-nitrosotióis ($7,2 \pm 1,1 \text{ nM}$). As quantidades de N-nitroso e S-nitroso aparecem associadas com frações de albumina, mostrando a presença de um composto formado por uma molécula de alto peso molecular do tipo N-nitroso na circulação humana, levantando a questão sobre sua origem e potencial papel fisiológico.

Harohalli et al. (2002) estudaram os padrões de liberação de NO em BSA e HSA nitrosadas e os compararam a várias formas de HSA mutantes recombinantes nitrosadas. Todas as espécies de albuminas foram nitrosadas com

NO_2^- em meio ácido. Eles encontraram padrões de liberação de NO a partir de BSA nitrosada de acordo com artigos anteriores que indicam que Cys-34 é o principal alvo de nitrosação, porém em HSA nitrosada o principal alvo de nitrosação foi um resíduo de aminoácido diferente de Cys-34. Utilizando as diferentes espécies recombinantes de HSA nitrosadas produzidas concluíram que o Trp-214 é o principal alvo de nitrosação em HSA. Mutações em Trp-214 levaram a um aumento na nitrosação de Cys-34, indicando uma possível competição entre estes dois resíduos para reação com N_2O_3 , a espécie reativa de nitrosação formada em soluções aquosas ácidas de NO_2^- . Os valores médios de tempo para triptofano nitrosado foram determinados a partir das medidas de NO liberado na ausência de Hg^{2+} . Os autores encontraram 141 ± 3 min para a BSA e 127 ± 3 min para HSA, ambas comerciais (Sigma).

Kirsch et al. (2003) estudaram a N-nitrosação de derivados de triptofano com o N terminal bloqueado na presença de sistemas geradores de N_2O_3 , como os doadores de NO na presença de oxigênio em pH 7,4. Nessas condições, a N-nitrosação de N-acetil-triptofano e lisina-triptofano-lisina foi provada, respectivamente, por espectroscopia UV-vis e por espectrometria ^{15}N NMR. Os dados dos autores mostraram conclusivamente que N_2O_3 provoca a nitrosação da função amina secundária (N_{indol}) do anel indol do triptofano N-bloqueado com alta reatividade em valores de pH fisiológicos.

Noble e Williams (2000) estudaram a formação e as reações de proteínas do tipo S-nitroso. A nitrosação da BSA por ácido nitroso ocorre em dois estágios: um rápido, consistente com uma reação de S-nitrosação da unidade de cisteína livre, seguido de um lento, que é consistente com uma reação de N-nitrosação de um resíduo de triptofano. Os autores obtiveram resultados de cinética química para ambos estágios que sugerem, em teoria, que proteínas do tipo S-nitroso podem atuar como reservatório de NO.

Suzuki et al. (2004) realizaram experimentos sobre reações de peroxinitrito e outras espécies reativas de nitrogênio com N-acetil-L-triptofano sobre várias condições e mostraram que resíduos de triptofano podem ser nitrados, nitrosados e oxidados por espécies reativas de nitrogênio, necessitando de estudos posteriores para correlacionar perda de função de proteínas e tipo de modificações sofridas nos resíduos de triptofano.

