1. Introdução

1.1 Introdução

Nas duas últimas décadas tem-se dado enorme atenção aos processos envolvendo óxido nítrico e espécies reativas a ele associadas, devido às descobertas que associaram esse pequeno radical livre a importantes mecanismos fisiológicos como vasodilatação, neurotransmissão e reações imunológicas (Rang et al., 2001 e Feldman et al., 1993). Endogenamente, óxido nítrico é sintetizado pelas enzimas óxido nítrico sintetases (NOS). O descontrole do seu delicado equilíbrio leva a situações fisiopatológicas. Substâncias capazes de liberar óxido nítrico e participar dos processos de sinalização associados a seu metabolismo têm sido investigadas para utilização em terapias (Rassaf et al., 2002) e (Foster et al., 2003). A mais antiga dessas substâncias é a nitroglicerina, utilizada por quase um século no tratamento de angina pectoris para diminuir a pressão sanguínea e facilitar a vascularização. Só no final da década de 1980 o mecanismo farmacológico desse fármaco foi associado à liberação de óxido nítrico.

As reações de nitrosação (ligações entre grupos nitrosos e moléculas orgânicas), com formação de compostos C-nitroso, N-nitroso, O-nitroso e S-nitroso a partir das moléculas originais, são bastante conhecidas (Zhang et al., 1996). Compostos formados são capazes de atuar em processos ativados por óxido nítrico. Já no final da década de 1990 foram detectados S-nitrosotióis *in vivo*, em pequenas concentrações. Tióis reativos das proteínas (da cadeia lateral do amino ácido cisteína) passaram a ser vistos como importantes alvos no metabolismo de óxido nítrico (Stamler et al., 1992).

Proteínas são modificadas, *in vivo* e *in vitro*, pela interação com espécies reativas derivadas de óxidos de nitrogênio, podendo ter suas funções alteradas. Algumas proteínas são ativadas por essas reações e outras inativadas. Acredita-se que algumas proteínas podem ser convertidas em carreadores de óxido nítrico a

alvos biológicos específicos. Os mecanismos de nitrosação de proteínas e de liberação ou transferência de NO para a solução ou para outras moléculas ainda não estão totalmente compreendidos (Zhang et al., 1996; Stamler et al., 1992). Por isso, neste trabalho investigamos uma das importantes reações amplamente utilizadas para produção de S-nitrosotiois, o tratamento com nitrito em meio ácido.

A albumina sérica é a proteína mais abundante do soro sanguíneo. Talvez, a sua propriedade mais interessante seja a sua capacidade de ligar-se reversivelmente a uma grande variedade de ligantes e fármacos, transportando inúmeras substâncias para diversos órgãos através do sistema circulatório. A S-nitrosação *in vivo* dessa proteína é comumente observada e o processo de S-nitrosação *in vitro* por nitrito em meio ácido tem sido utilizado por diversos pesquisadores. Apesar disso, mais recentemente tem sido observado que esse não é um método adequado para muitas proteínas, por causa da desnaturação ácida, que pode ser irreversível, e porque outros grupos funcionais, como aminas, álcoois e aromáticos, são susceptíveis de modificação por nitrito acidificado. Em albumina, sugeriu-se que além de S-nitrosilação da única cisteína da molécula, resíduos de triptofano (um em albumina humana e dois em albumina bovina) também seriam modificados. Encontrou-se também que albuminas com grupo SH bloqueados provocavam dilatação de vasos sanguíneos *in vitro* quando modificadas por nitrito acidificado. Isso sugeriu que a nitrosação de outros sítios poderia ser importante para a distribuição de óxido nítrico no sistema vascular (Zhang et al., 1996). Para esclarecer a influência dos resíduos de triptofano nesse processo de nitrosação em meio ácido, investigamos o processo em três proteínas. A albumina sérica bovina (BSA), que possui uma cisteína livre e dois resíduos de triptofano, a albumina sérica humana (HSA), com a cisteína livre na mesma posição da cadeia que a BSA mas com apenas um resíduo de triptofano, e a insulina, que não possui resíduos de triptofano nem de cisteína livre.

Em nosso trabalho, utilizamos espectrofotometria diferencial de absorção para acompanhar a cinética de formação dos novos cromóforos produzidos pela reação das proteínas mencionadas acima com nitrito acidificado. Comparamos os espectros de absorção e a cinética de formação dos cromóforos em BSA nativa e em BSA previamente tratada com N-etil-maleimida, para bloquear o grupo SH da

cisteína. Em seguida, comparamos os resultados obtidos com BSA nativa e modificada com os obtidos com insulina.

Uma vez confirmado o envolvimento de resíduos de triptofano nas reações que levaram aos novos cromóforos, realizamos experimentos comparando albumina bovina e humana em função do tempo de reação, devido à relação de dois para um existente no número de resíduos de triptofano entre essas espécies.

Os espectros de absorção de compostos S-nitroso e N-nitroso se superpõem e são muito semelhantes na região do ultravioleta. Já a fluorescência intrínseca de proteínas é devida principalmente aos resíduos de triptofano e sofre influência da N-nitrosação no anel aromático. Assim, com o intuito de confirmar modificações nos resíduos de triptofano, realizamos uma série de experimentos em que a fluorescência intrínseca das albuminas foi observada em função do tempo de reação em meio ácido. Para investigar a provável cinética de liberação de óxido nítrico, em pH neutro, pelas albuminas previamente tratadas com nitrito acidificado, utilizamos a evolução temporal da fluorescência intrínseca em pH fisiológico.

1.2 Objetivos

Esse trabalho tem como objetivos principais:

- i. Estudar espectroscopicamente os possíveis produtos da reação ácida de nitrito com os resíduos de aminoácidos em albumina sérica humana e bovina.
- ii. Estudar se além dos resíduos de cisteína, os resíduos de triptofano também sofrem nitrosação. Em caso afirmativo, obter as diferenças entre taxas de nitrosação de cisteína, do único resíduo de triptofano da albumina humana e dos dois resíduos de triptofano da albumina bovina.

- iii. Examinar a modificação da fluorescência de triptofano nessas albuminas tratadas com nitrito em meio ácido. Verificar a reversibilidade em pH fisiológico.
- iv. Verificar a possibilidade de que albuminas modificadas participem de processos de transporte de NO no sistema circulatório e de sua liberação para alvos biológicos específicos.

1.3 Estrutura dos capítulos

Apresentamos nesse Capítulo 1, introdutório, a motivação para o presente trabalho.

No Capítulo 2 fazemos uma breve apresentação do óxido nítrico e suas funções em seres vivos, sem pretensão de esgotar o assunto.

No Capítulo 3 apresentamos a estrutura de proteínas, em geral, e das proteínas utilizadas em nossos experimentos, albuminas e insulina, em particular. Fazemos uma breve revisão de diversos mecanismos dos quais essas proteínas participam e de modificações que espécies reativas derivadas de óxidos de nitrogênio produzem em proteínas.

No Capítulo 4 descrevemos os princípios das técnicas experimentais utilizadas para investigar o sistema biológico em estudo: a espectroscopia de absorção e de fluorescência.

No Capítulo 5 descrevemos os materiais e procedimentos experimentais utilizados no trabalho.

No Capítulo 6 apresentamos e analisamos nossos resultados, discutindo-os em comparação com outros resultados da literatura.

No Capítulo 7 apresentamos as conclusões do trabalho e sugestões para futuras linhas de investigação.