

## 6. Resultados e Discussão

### 6.1 Espectros de absorção ótica de S-nitrosotióis

Apresentamos, inicialmente, o espectro de absorção ótica de dois S-nitrosotióis, na faixa de 250 a 500 nm (Fig. 6.1). Os S-nitrosotióis possuem uma absorção característica no ultravioleta próximo (330-350nm) com coeficientes de absorção molar  $\sim 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

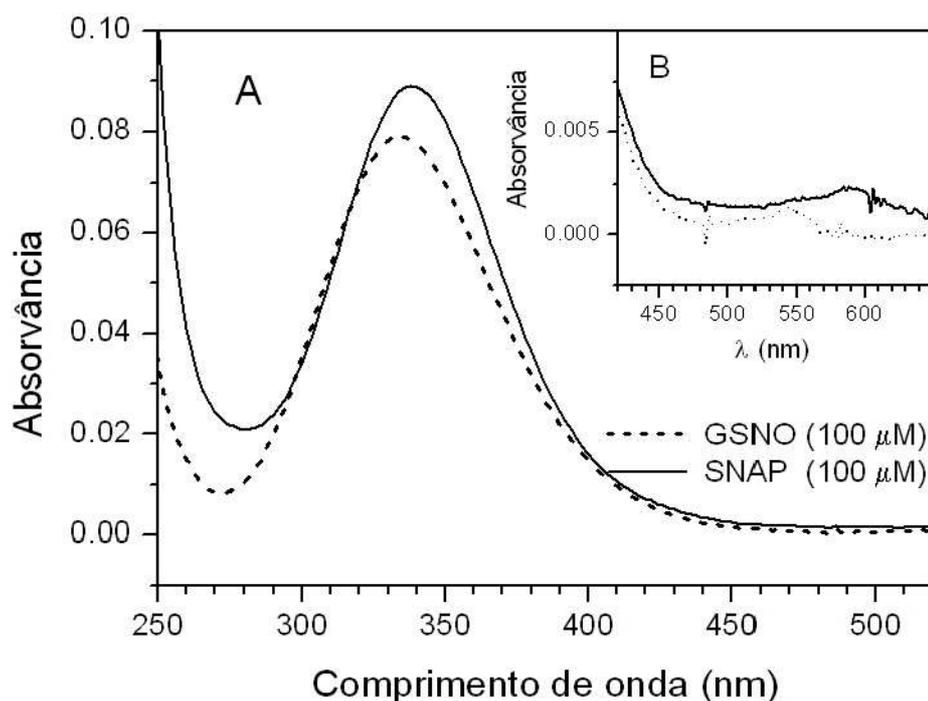


Figura 6.1 Espectro de absorção dos S-nitrosotióis GSNO e SNAP 100  $\mu\text{M}$ , em tampão Tris pH 7.4, EDTA 0,2 mM. (A) Banda na região do uv-próximo; (B) região visível. Em pH ácido o espectro não sofre modificação.

O derivado S-nitrosilado da glutathiona GSNO apresenta um pico em 334 nm com  $\epsilon_{334} = 0,90 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (DeMaster et al., 1995) enquanto que para o

SNAP o pico aparece em 338 nm com  $\epsilon_{338} = 0,89 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Cook et al., 1996). Os valores desses coeficientes variam bastante (até ~ 30%), de autor para autor.

Em comprimentos de onda abaixo de 270 nm (GSNO), ou 280 nm (SNAP), cresce uma banda com pico em torno de 190-230 nm e coeficiente de absorção molar uma ordem de grandeza maior. No visível, as bandas de absorção dos S-nitrosotióis apresentam coeficientes de absorção molar duas ordens de grandeza menores.

## 6.2

### Nitrosação da albumina bovina em meio ácido

Para observar a evolução dos espectros de absorção de BSA devido ao tratamento com nitrito em meio ácido, seguimos o procedimento descrito na Seção 5.3. É importante ter em mente que o tratamento em meio ácido desnatura irreversivelmente a BSA. No espectrofotômetro registramos o branco com a solução de BSA (0,5 mM) em 0,5 M HCl. Separadamente, em outra cubeta, preparamos BSA nas mesmas condições, mas adicionando nitrito na proporção de 1 para 1 em relação a BSA (0,5 mM). Imediatamente após adicionarmos o nitrito iniciamos as medidas da absorvância. O primeiro espectro diferencial foi registrado logo após adição de nitrito e espectros subsequentes foram tomados em intervalos de tempo de cinco minutos. A Fig. 6.2 mostra alguns dos espectros de absorção obtidos nesse experimento.

A queda abrupta dos espectros para comprimentos de onda abaixo de 300 nm não é resultado confiável, pois a absorvância da BSA, usada como branco, já é muito grande na região (saturação).

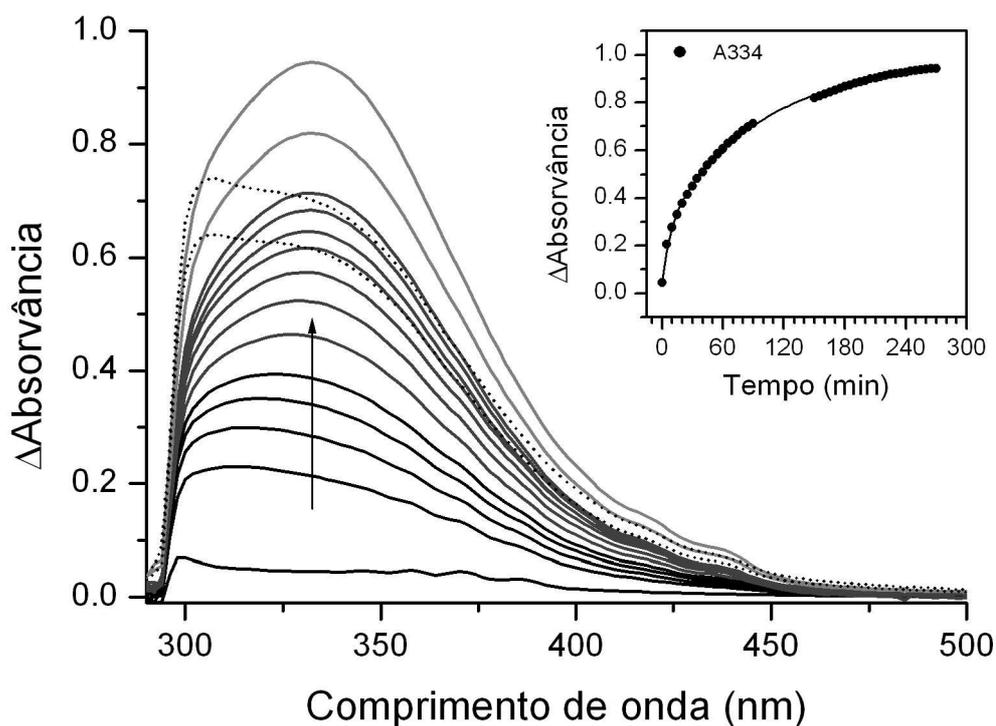


Figura 6.2 Evolução temporal do espectro diferencial de absorção de novos cromóforos gerados durante a reação de albumina bovina (0,5 mM) com  $\text{NaNO}_2/\text{HCl}$ .  $\text{HCl}$  0.5M e nitrito na proporção de 1 : 1 em relação a BSA. Em preto, espectros tomados de cinco em cinco minutos; em cinza escuro, de 10 em 10 minutos; em cinza claro, em 150 e 210 minutos; pontilhados, espectros tomados depois de 24h, com 2h de diferença (amostra armazenada a 4°C). Inserido acima, à direita, encontra-se o gráfico da absorvância em 334 nm em função do tempo.

Observa-se o crescimento da absorvância, entre 300 e 400 nm, com o pico deslocando-se em direção a comprimentos de onda maiores, até estabilizar-se em 336 nm. Há, portanto, formação de mais de uma espécie.

O espectro que se desenvolve mais rapidamente é, provavelmente, devido à já bastante conhecida albumina S-nitrosilada em seu único resíduo de cisteína, Cys 34. Reações de nitroação em outros resíduos de aminoácidos, que são de nosso interesse neste trabalho, estão ocorrendo. Zhang et al. (1996) sugeriram que o espectro com formação lenta era proveniente de N-nitroação dos resíduos de triptofano da albumina.

Para analisar as espécies formadas nos diferentes intervalos de tempo da reação, fizemos subtrações entre espectros da Fig. 6.2. Os resultados são apresentados na Fig. 6.3.

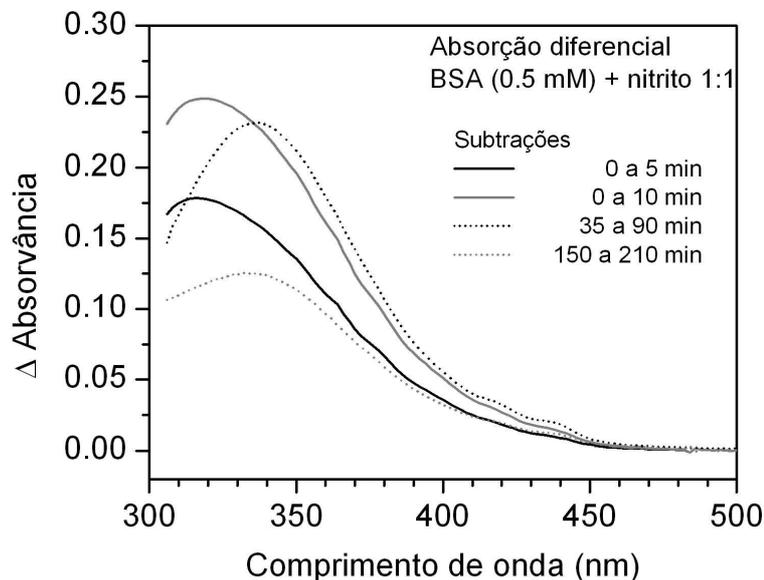


Figura 6.3 Subtração entre os espectros diferenciais de absorção da Fig. 6.2, de BSA (0.5 mM) com nitrito na proporção de 1 para 1, entre os tempos indicados no gráfico.

A(s) espécie(s) formada(s) inicialmente, nos primeiros 5 a 10 min apresenta(m) pico em 316 nm. Surpreendentemente esses espectros não se parecem ao de espécies S-nitrosiladas, que deveriam estar se formando rapidamente. Uma indicação de que a S-nitrosilação está realmente ocorrendo é obtida pela ampliação da região visível do espectro (Fig. 6.4), onde aparece a banda em 545 nm característica de S-nitroso cisteína. A(s) espécie(s) formada(s) após aproximadamente quarenta minutos apresenta(m) pico em 336 nm. Nessas espécies, observam-se pequenas ondulações em 420 e 438 nm, que acompanham o crescimento do pico de 336 nm, e portanto parecem estar associados às espécies com formação lenta.

Como tanto os S-nitrosotióis como os resíduos de N-nitroso-triptofano apresentam pico de absorção em  $\sim 330$  a 340 nm, amplificamos a absorvância na região visível para tentar observar a banda de baixa densidade ótica característica dos S-nitrosotióis. De fato, observa-se na Fig. 6.4 o pico em 542 nm,

característico de GSNO e CysNO, cujo crescimento em função do tempo aparece no gráfico inserido à direita, nessa figura. Ajustando os dados à seguinte função:

$$A = A_0 \left( 1 - \exp \frac{-t}{\tau_1} \right)$$

obtivemos a constante de tempo  $\tau_1 = 25$  min, associada ao crescimento da absorção, com  $A_0 = 0,0075$ .

Stamler et al. (1992) encontraram  $\varepsilon_{545} = 47 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para S-nitroso BSA, enquanto Holmes e Williams (2000) encontraram  $\varepsilon_{545} = 20 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para GSNO. Lembrando que  $A = \varepsilon c \ell$  e utilizando os coeficientes de absorção da literatura acima, calculam-se concentrações  $[\text{SNO-BSA}] = 0.16 \text{ mM}$  e  $0.37 \text{ mM}$ , respectivamente, a partir de  $A_0 = 0.0075$ . Isso nos diz que de 32 a 74% de BSA foi S-nitrosilada.

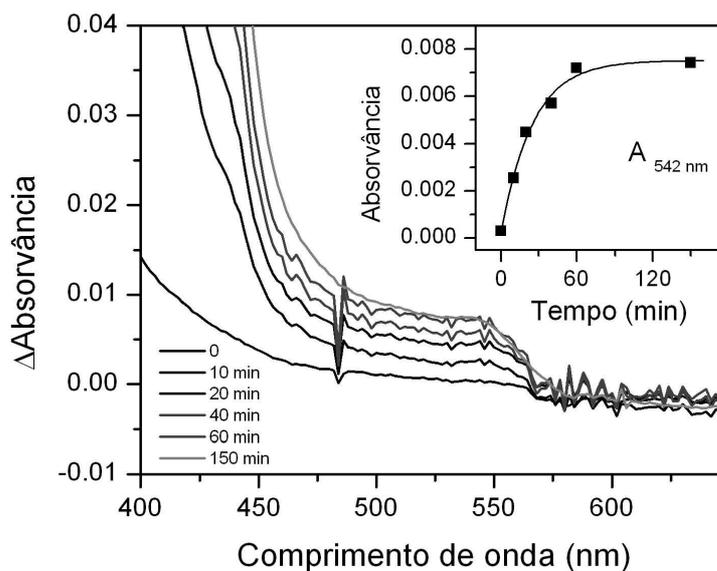


Figura 6.4 Região visível de alguns dos espectros da Fig. 6.2, com o gráfico da absorvância em 542 nm em função do tempo.

Utilizando o  $\tau_1 = 25$  min, para S-nitrosilação, ajustamos o gráfico de  $A_{334}$  em função do tempo, da Fig. 6.2, usando a função:

$$A = A_1 \left( 1 - \exp \frac{-t}{\tau_1} \right) + A_2 \left( 1 - \exp \frac{-t}{\tau_2} \right)$$

Os parâmetros de ajuste obtidos mantendo fixo  $\tau_1 = 25$  min foram:  $A_1 = 0,3$ ;  $A_2 = 0,6$ ;  $\tau_2 = 120$  min. De acordo com esse ajuste, a absorvância  $A_1 = 0.3$  seria a

contribuição de BSA S-nitrosilada enquanto  $A_2 = 0,6$  seria a contribuição de triptofano nitrosado. Tomando  $A_1$ , e as concentrações estimadas acima, podemos calcular que o coeficiente de absorção molar em 334 nm para a BSA S-nitrosilada encontra-se na faixa de  $\epsilon_{334} = 0,81 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a  $1,9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Essa faixa está mais de acordo com os coeficientes encontrados para diversos S-nitrosotióis do que o valor encontrado por Stamler et al. (1992)  $\epsilon_{335} = 3,9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Dos nossos experimentos fica claro que o valor superestimado por Stamler et al. deveu-se à nitrosação de triptofano da BSA que ocorreu concomitantemente à S-nitrosilação e não foi levada em conta pelos autores.

### **Estabilidade das espécies e controle da amostra**

No dia seguinte ao experimento que levou aos resultados da Fig. 6.2 (mais ou menos 24h após o encerramento da experiência), tomamos a cubeta contendo a amostra, que foi guardada no refrigerador, e medimos sua absorvância. O espectro sofreu significativa mudança em sua forma e houve uma redução no pico em 336 nm (ver na Fig. 6.2 os espectros pontilhados). Após duas horas medimos novamente o espectro de absorção, que apresentou aumento, sem modificação da forma.

Ainda nesse dia, diluímos 20 vezes tanto a amostra controle como a amostra tratada com nitrito, para observar a região do espectro abaixo de 300 nm.

A Fig. 6.5 apresenta os espectros dessas amostras diluídas BSA (25  $\mu\text{M}$ ). Estas medidas nos mostram o pico de absorção dos resíduos aromáticos da molécula de BSA, em 278 nm. A partir do espectro contínuo pudemos conferir a concentração de BSA. Utilizando  $\epsilon_{278} = 4.43 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para BSA (Peters, 1960) encontra-se  $[\text{BSA}] = 23 \mu\text{M}$ , o que concorda bastante bem com os 25  $\mu\text{M}$  preparados a partir de pesagem seguida de diluição.

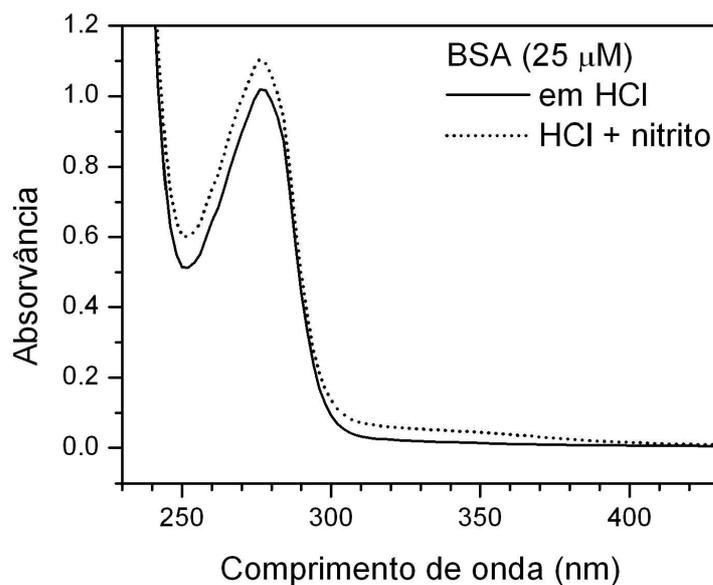


Figura 6.5 Espectros das amostras de BSA (branco e com nitrito 1:1) correspondentes aos resultados da Fig. 6.2 diluídas 20 vezes ( $25\mu\text{M}$ ) em 0.5 M HCl. Esse experimento foi feito no dia seguinte ao tratamento com nitrito.

Na Fig. 6.5 notam-se as alterações nos espectros, devido ao tratamento com nitrito, entre 300 e 450 nm. Estas são bastante pequenas quando comparadas com o pico de BSA em 278 nm, justificando o uso de absorção diferencial para observar nitroação/nitrosilação. Verificamos também que, acima de 300 a 310 nm, pode-se trabalhar adequadamente com espectros diferenciais, pois nessa região, mesmo em concentrações 10 a 20 vezes maiores, a absorvância da proteína é suficientemente baixa para não distorcer esses espectros. Abaixo de 300 nm, os valores altos da absorvância da albumina tornam os espectros diferenciais não confiáveis. Há uma queda abrupta e o ruído predomina, como se observa na Fig. 6.2.

### 6.3

#### Comparação entre nitroação de BSA nativa e BSA Cys-bloqueada

Com o intuito de pesquisar os espectros de absorção de outros resíduos de aminoácidos que sofrem nitroação além da Cys 34 da albumina bovina (BSA), realizamos dois experimentos para comparar a evolução temporal da cinética de reação de nitroação em BSA nativa e em BSA com o grupo SH bloqueado através de tratamento com N-etil-maleimida.

Utilizamos o mesmo procedimento experimental realizado na seção anterior, 6.2, porém usamos a concentração de BSA (nativa e bloqueada) em 0.25 mM e aumentamos a concentração de nitrito usando a relação nitrito/BSA de 16:1. Assim, garantimos excesso de nitrito em relação aos sítios de nitrosilação e obtivemos uma evolução temporal dos espectros bem mais rápida.

A Fig. 6.6 mostra a evolução temporal dos espectros de absorção UV-Vis dos novos cromóforos gerados em BSA nativa e BSA-NEM durante o curso da reação com nitrito/HCl.

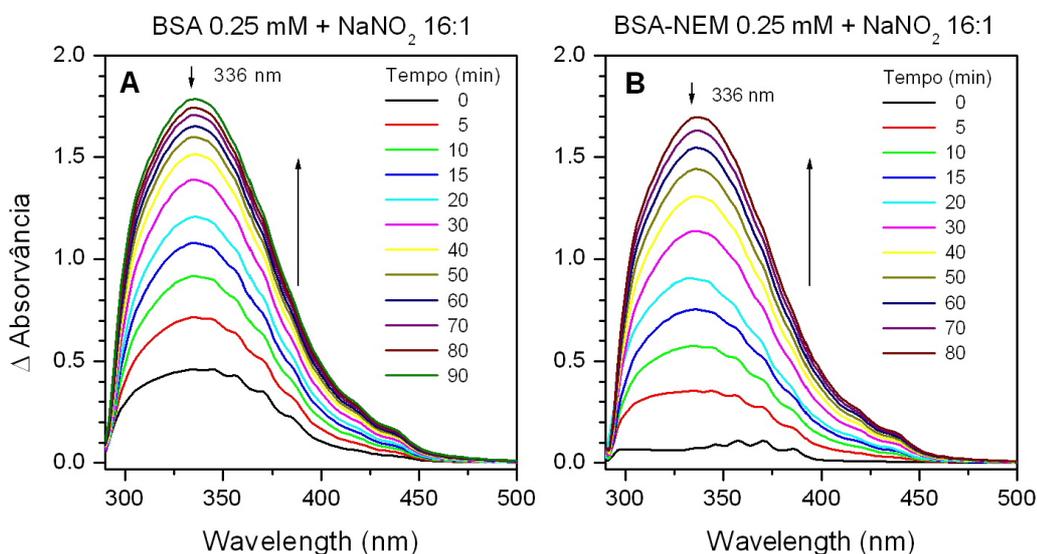


Figura 6.6 Espectros de absorvância diferencial dos novos cromóforos gerados durante a reação com nitrito (4 mM) em meio ácido (HCl 0,25 M) de BSA (0.25 mM) nativa (A) e BSA tratada com NEM para bloquear a Cys 34 (B). A legenda de tempo na figura indica a evolução temporal dos espectros, com máximo de absorvância no comprimento de onda de 336 nm.

A absorvância aumentou gradualmente durante todo o tempo de observação, tanto na BSA nativa quanto na BSA bloqueada, como podemos ver na Fig. 6.6. Sabe-se que o grupo SH da BSA é rapidamente nitrosado após a adição de nitrito em meio ácido. Os cromóforos produzidos no decorrer da reação com esta alta concentração de nitrito foram, então, derivados de outros resíduos de aminoácido, pois se assim não fosse não obteríamos o aumento da absorvância na BSA com a Cys covalentemente bloqueada.

Vemos, pela comparação dos espectros das Fig. 6.6 A e B, que a forma e os picos são bem similares. Observa-se que, devido à alta concentração de nitrito/BSA, ultrapassou-se a faixa de linearidade para a absorvância (1,0; lei de Beer-Lambert), chegando a valores de até 1,8. Estes resultados, porém, não foram descartados. O gráfico da Fig. 6.7 mostra a absorvância em 336 nm, tirada dos espectros de BSA nativa e bloqueada, em função do tempo de reação. Os valores de absorvância acima da unidade foram corrigidos através de fatores obtidos experimentalmente (Tumang, 2005).

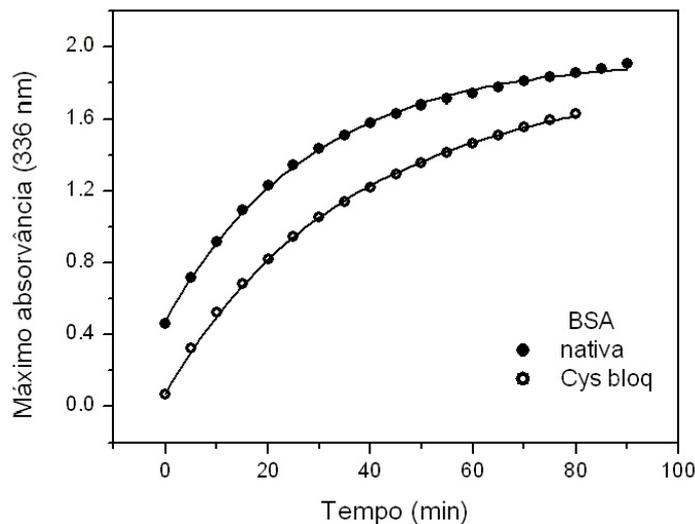


Figura 6.7 Comparação entre a evolução temporal dos máximos de absorção, em 336 nm, entre a BSA nativa e a bloqueada com NEM.

Os dados da Fig. 6.7 foram ajustados através da expressão

$$A = A_0 + A_1 [1 - \exp(-t/\tau)] .$$

A partir dos ajustes dos dados de BSA-NEM e usando  $A = \epsilon c \ell$ , estimamos o coeficiente de absorção molar das espécies não relacionadas à CysSNO ( $A_0 = 0,09$ ;  $A_1 = 1,71$ ;  $\tau = 36$  min:  $\epsilon_{336} = A_1/c = 6,8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Estimamos também o coeficiente de absorção molar da espécie formada rapidamente na BSA nativa, ( $A_{0\text{nat}} - A_{0\text{bloq}} = 0,40$ ;  $\epsilon_{336} = (A_{0\text{nat}} - A_{0\text{bloq}}) / c = 1,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , com  $\tau = 28$  min). Observa-se que esse último está dentro da faixa estimada para SNO-BSA na Seção 6.2, acima.

## 6.4

### Nitrosação da insulina para comparação com a albumina bovina

Com o intuito de pesquisar as reações de nitrosação em resíduos de aminoácidos diferentes dos resíduos de cisteína e triptofano, para comparação com os resultados anteriores, escolhemos a insulina bovina para reagir com o nitrito/HCl. Nossa escolha foi baseada no fato de a insulina bovina não possuir resíduos de triptofano em sua estrutura e, também, não possuir grupo SH livre nos resíduos de cisteína, pois todos formam pontes dissulfeto. Esta proteína possui seis resíduos de cisteína, formando duas pontes dissulfeto intercadeias e uma intracadeia.

Para obter os espectros diferenciais de absorção mostrados na Fig. 6.8, utilizamos como branco insulina em concentração de 0,25 mM e HCl em concentração de 0,25 M e para a amostra foi acrescentado nitrito em concentração de 1,0 mM, proporção de 4 para 1 em relação a insulina. Imediatamente após a adição do nitrito foram levantados os espectros de absorção de 10 em 10 minutos, como mostrado na Fig. 6.8.

A absorvância teve aumento gradual e pequeno durante o tempo de observação do experimento. Essa variação muito pequena mostra que os cromóforos observados nas seções anteriores 6.2 e 6.3, na reação de nitrito com BSA, estão realmente associados às reações de nitrosação dos resíduos de cisteína e triptofano.

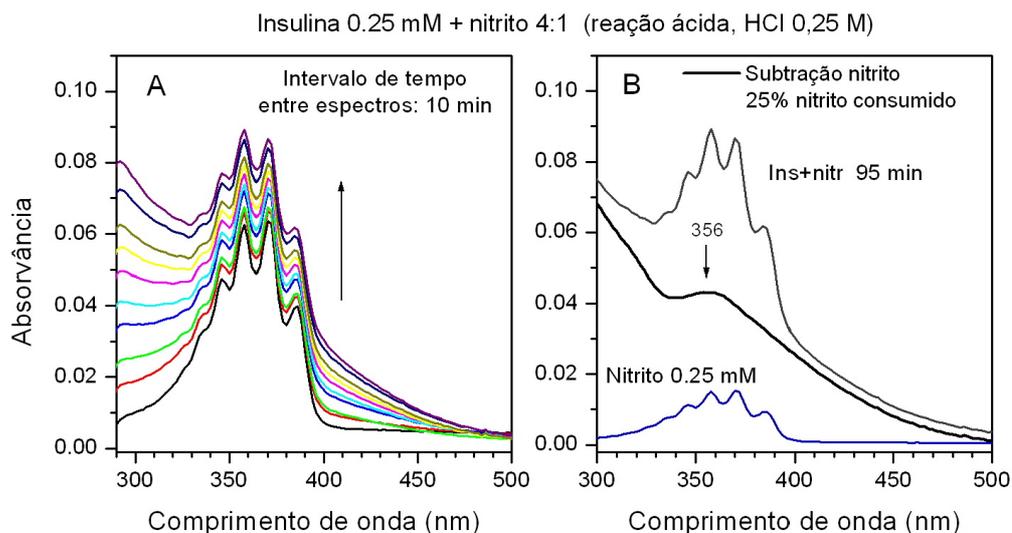


Figura 6.8 (A) Espectros de absorvância diferencial de novos cromóforos gerados durante a reação de insulina bovina (0.25 mM), HCl (0.25 M) e nitrito (1 mM). Evolução temporal da reação com nitrito: espectros obtidos com intervalos de tempo de 10 min. (B) Espectro inferior: nitrito 0.25 mM. Espectro superior: insulina com nitrito, registrado depois de 95 min de reação. Espectro intermediário, subtração: espectro superior menos espectro de nitrito 0.75 mM. A subtração mostra que durante o tempo de observação do experimento foi consumido aproximadamente 25% do nitrito adicionado em  $t = 0$ .

Analisando os espectros da Fig. 6.8 A vemos que nessa concentração de nitrito (1 mM) o espectro de absorção do nitrito sobressai. A absorção de nitrito/HCl é caracterizada por seis picos entre 300 e 400 nm, sendo os mais resolvidos em  $\lambda_{\text{máx}}$  de 347, 358, 371, e 386 nm; pequenas ondulações 336 e 326 nm também aparecem. A Fig. 6.8 B, que mostra a subtração do espectro devido a nitrito para observar apenas o espectro da espécie resultante da reação, permite inferir que 25% do nitrito adicionado foram consumidos na reação, durante os 95 minutos de observação. A velocidade da reação é baixa se comparada à da BSA.

Comparamos os resultados obtidos com insulina com os obtidos por Zhang et al. (1996), em que os autores registraram os espectros de absorção UV-Vis de cromóforos gerados durante a reação do dipeptídeo Gly-Tyr (glicil-tirosina) com nitrito/HCl. Os espectros são muito semelhantes, o que nos permite sugerir que as reações de nitrosação na insulina bovina envolvem resíduos de tirosina. De fato, essa proteína possui quatro resíduos de tirosina, dois em cada cadeia.

## 6.5 Comparação entre nitroação de albumina bovina e humana

Para comparar os efeitos de nitroação da albumina bovina (BSA – 2 Trp nas posições 134 e 212 da cadeia) com a humana (HSA – 1 Trp na posição 214 da cadeia), repetimos os experimentos já descritos na Seção 6.2, com BSA e com HSA. Utilizamos concentração de proteína 4 vezes menor, para não sair da faixa de linearidade dos espectros. Com amostra de BSA ou HSA 0,125 mM e HCl na concentração de 0,5 M, fizemos a medição do branco. Após, foi adicionada alíquota de uma solução de  $\text{NaNO}_2$  de modo que a concentração na cubeta tivesse proporção molar de 1:1 ou 4:1 em relação a albumina. A partir do início da reação, acompanhamos a evolução temporal dos espectros de absorção em intervalos de 5 min. Os resultados aparecem na Fig. 6.9.

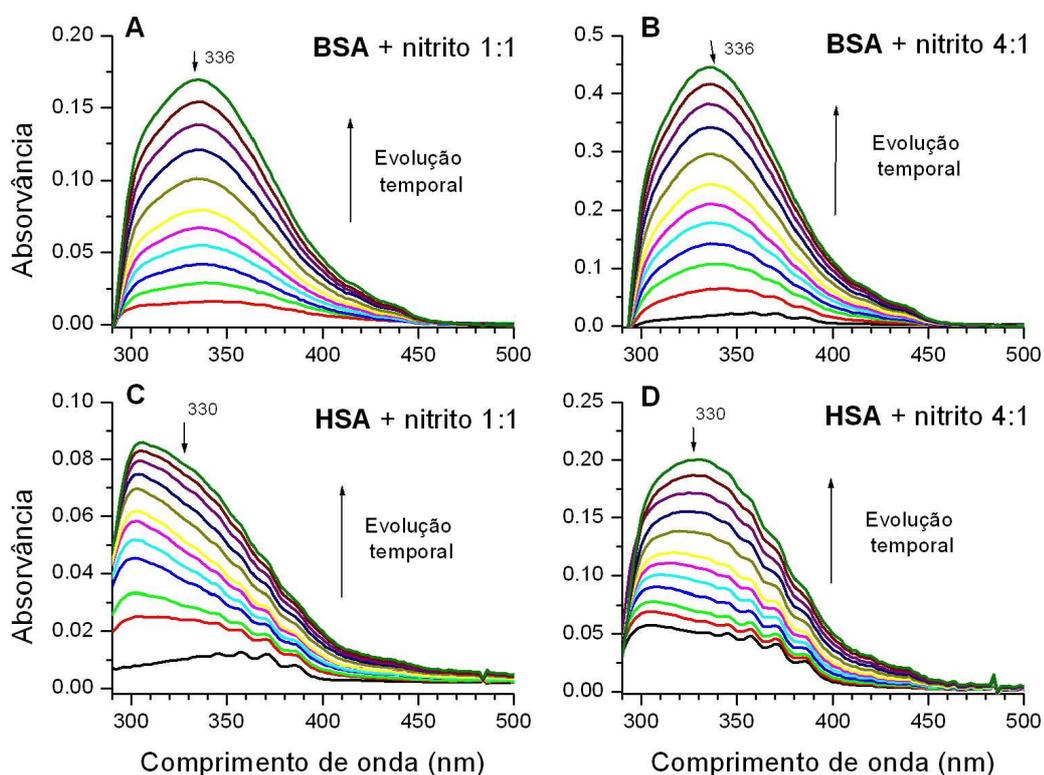


Figura 6.9 Evolução temporal dos espectros de absorção diferencial de albumina bovina (BSA) e albumina humana (HSA) em concentração de 0,125 mM, tratadas com nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) em concentrações de 0,125 mM (1:1) e 0,5 mM, (4:1), em meio ácido. Os espectros iniciais (7 primeiros) correspondem a intervalos de tempo de 5 min; os seguintes correspondem a intervalos de 10 min.

Houve o crescimento da absorvância com máximo entre 335 e 340 nm, característica tanto de S-nitrosilação de resíduos de Cys quanto de N-nitrosação de resíduos de Trp, conforme já esperado face aos resultados dos experimentos anteriores. Para comparação, é importante observar que as escalas de absorvância para BSA (A e B) têm limite superior duas vezes maior do que para HSA (C e D). Isso já sugere que em BSA há formação de mais espécies nitrosiladas do que em HSA. Com base nos resultados com insulina, acredita-se que, com referência à reação ácida com nitrito, a diferença entre BSA e HSA seja nitrosação do Trp 134 de BSA, já que Trp 212 de BSA deve ser muito semelhante ao Trp 214 de HSA em termos de vizinhança.

Em BSA, Cys 34, Trp 134 e Trp 212, devem sofrer nitrosação, enquanto em HSA, Cys 34 e Trp 214 são nitrosados. Se, estruturalmente Trp 212 e Cys34 (BSA) e Trp 214 e Cys 34 (HSA) se equivalem, nossa atenção fica voltada para o Trp 134 da BSA como o elemento causador das diferenças registradas.

Deve-se ter em mente que, com nitrito na proporção de 1:1, temos 1 nitrito para 3 resíduos que podem sofrer nitrosação em BSA e apenas 2 resíduos em HSA. Comparando os gráficos da Fig. 6.9 A (BSA) e C (HSA) notamos um máximo de absorção em 336 nm para BSA, o qual aparece deslocado para comprimentos de onda menores em HSA, causando uma diferença significativa na forma dos espectros. Na reação com HSA o consumo de nitrito parece ser bem mais lento. Pensamos que a principal causa desta diferença seja a ausência do Trp 134 na HSA.

Com nitrito na proporção de 4:1 em relação a albumina, temos tanto em HSA como em BSA, um excesso de nitrito em relação aos resíduos reativos. Comparando os gráficos da Fig. 6.9 B (BSA) e D (HSA), observa-se também que a intensidade dos espectros em D é aproximadamente duas vezes menor do que os correspondentes em B. Novamente, atribuímos essa diferença à presença do Trp 134 de BSA. Esses resultados, mais uma vez, confirmam os dados das seções anteriores: além da cisteína, o triptofano é o aminoácido responsável pelo pico de absorvância crescente ao longo do tempo de observação, sendo portanto o que sofre nitrosação. A diferença bastante significativa na intensidade dos espectros de BSA em relação aos de HSA nos leva a pensar que o Trp 134, ausente na HSA, sofre mais nitrosação do que o Trp 212 (BSA) ou 214 (HSA).

A Fig. 6.10 mostra o crescimento da absorvância dos espectros da Fig. 6.9 em função do tempo. Os dados experimentais relativos a HSA (Fig. 6.10 B) foram ajustados com a função exponencial:

$$A = A_0 + A_1 [1 - \exp(-t/\tau)],$$

onde os parâmetros  $A_0$ ,  $A_1$  e a constante de tempo  $\tau$  encontram-se na Tabela 6.1. Conclui-se que o tratamento de HSA com nitrito 1:1 faz surgir uma espécie com absorvância pouco intensa ( $A_1 = 0.071$ ), com constante de tempo  $\sim 46$  min (constante cinética aparente  $k_1 \approx (\tau [\text{nitrito}])^{-1} \sim 2,9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ).

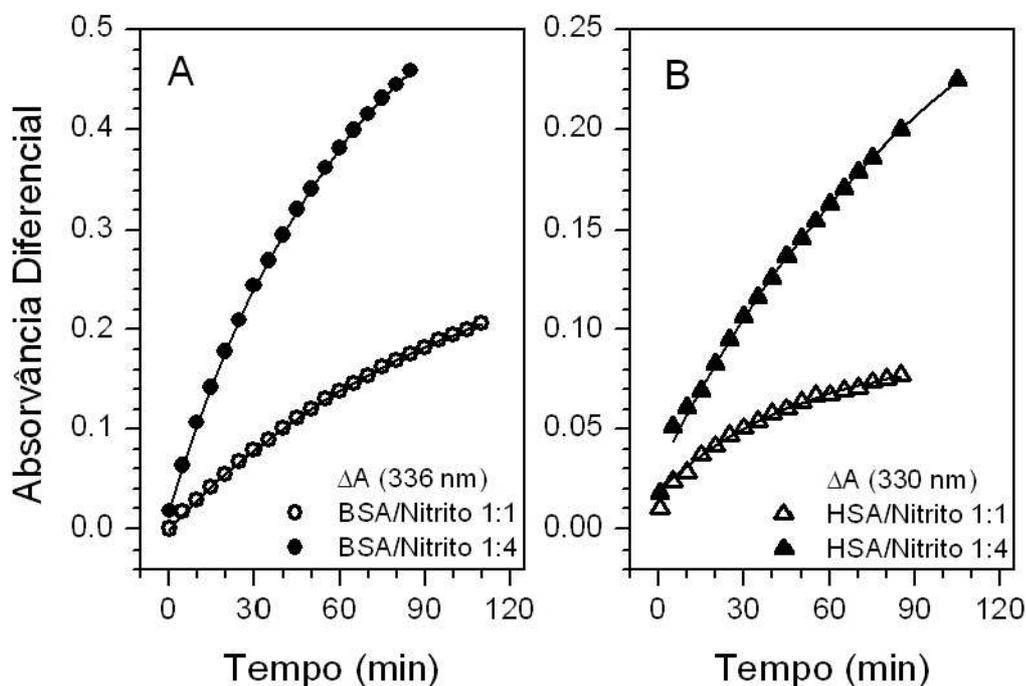


Figura 6.10 Evolução temporal da absorvância medida em 336 nm para BSA (A) e em 330 nm para HSA (B), durante a reação ácida com nitrito na proporção molar de 1:1 e 4:1 em relação a albumina.

O tratamento com nitrito na razão de 4:1 aceleraria a reação cerca de 4 vezes, fazendo reduzir a constante de tempo por um fator 4, ou seja,  $\sim 12$  min. De fato, observa-se na Fig. 6.10 B um salto inicial na absorvância (2 primeiros pontos,  $\blacktriangle$ ); os dados seguintes foram ajustados com uma constante de tempo maior ( $\sim 115$  min, ver Tabela 6.1). Essa constante de tempo é, provavelmente, de uma segunda espécie, com absorvância maior ( $A_1 = 0.32$ ) e constante cinética

aparente dez vezes menor ( $k_2 \approx \tau \text{ [nitr]}^{-1} \sim 0,3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Sugerimos que essas espécies 1 e 2 sejam NO-Cys 34 e NO-Trp 214.

Tabela 6.1 Parâmetros do ajuste das curvas da Fig. 6.10 B com a função

$$A = A_0 + A_1 [1 - \exp(-t/\tau)].$$

	HSA		
	$A_0$	$A_1$	$\tau$ (min)
Nitrito 1:1	0.016	0.071	46
Nitrito 4:1	0.032	0.32	115

Os dados experimentais relativos a BSA (Fig. 6.10 A) foram ajustados com a função exponencial:

$$A = A_0 + A_1 [1 - \exp(-t/\tau_1)] + A_2 [1 - \exp(-t/\tau_2)],$$

onde os parâmetros  $A_1$  e  $\tau_1$  foram mantidos fixos, com os valores obtidos para HSA na Tabela 6.1. Os parâmetros  $A_0$ ,  $A_2$  e  $\tau_2$  ajustados por mínimos quadrados encontram-se na Tabela 6.2.

A análise desses parâmetros indica que o tratamento de BSA com nitrito 1:1 faz surgir outra espécie, com absorvância final ( $A_2 = 0,36$ ) semelhante à da espécie 2 de HSA (trp214,  $A_2 = 0,32$ ) constante de tempo  $\sim 216$  min (constante cinética aparente  $k_3 \sim 0.62 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Essa terceira espécie é, provavelmente, o NO-Trp 134. Isso nos levaria a concluir que a constante cinética aparente de Trp 134 é duas vezes maior do que a do Trp 212 ( $k_2 \approx 0,3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), o que está de acordo com a maior acessibilidade do Trp 134 ao solvente.

Tabela 6.2 Parâmetros do ajuste das curvas da Fig. 6.10 A com a função

$$A = A_0 + A_1 [1 - \exp(-t/\tau_1)] + A_2 [1 - \exp(-t/\tau_2)].$$

	BSA				
	$A_0$	$A_1$	$\tau_1$ (min)	$A_2$	$\tau_2$ (min)
Nitrito 1:1	0.00	0.071	46	0.36	216
Nitrito 4:1	0.019	0.32	115	0.34	51

O tratamento com nitrito na razão de 4:1 acelera a reação cerca de 4 vezes. Portanto, a constante de tempo  $\tau_2$ , esperada para os dados de BSA na Fig. 6.10 A, círculos cheios, seria de 54 min (216/4). De fato, mantendo fixo  $\tau_1$  em 115 min, o ajuste forneceu  $\tau_2 = 51$  min (Tabela 6.2), o que concorda com o valor esperado. A absorvância ajustada,  $A_2 = 0,34$  também é muito semelhante à anterior. A coerência entre resultados desses ajustes fortalece a atribuição das diferentes espécies espectroscópicas aos resíduos de Cys 34, Trp 212/214 e Trp 134.

Ainda da Tabela 6.2, para BSA tratada com nitrito na razão de 1:1, fazendo-se ( $A_1 + A_2 = 0,43$ ) obtém-se a absorvância total das espécies nitrosiladas. Para cálculo do coeficiente de absorção molar, na suposição de que só uma espécie estaria sendo formada, teríamos  $\epsilon_{336} = 0,43/(0,125 \text{ mM} \cdot \text{cm}) = 3,4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ , o que é bastante próximo do resultado de Stamler et al. (1992)  $\epsilon_{335} = 3,87 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ . Concluímos que esse resultado, utilizado na literatura, não se refere à S-nitroso-BSA, mas à mistura de BSA S-nitrosilada e N-nitrosada.

## 6.6 Fluorescência de BSA submetida a nitroação

A fluorescência intrínseca de proteínas deve-se, principalmente, a resíduos de triptofano. Com o objetivo de verificar a extensão dos efeitos de tratamento com nitrito/HCl sobre os resíduos de Trp de BSA e HSA, realizamos experimentos de fluorescência intrínseca dessas proteínas, utilizando excitação em 280 nm.

Inicialmente, tomamos as amostras referentes à Seção 6.3, em que BSA (0,25 mM) nativa e tratada com NEM para bloquear Cys 34 foram submetidas a tratamento ácido com nitrito na razão molar de 16:1. No dia seguinte ao tratamento (amostras mantidas a 4°C) realizamos diluições de 100 vezes em HCl 0,25 M, imediatamente antes de registrar o espectro de fluorescência, tanto nas amostras que sofreram tratamento com nitrito quanto nas amostras controle. Essa diluição foi necessária para evitar efeitos de filtro interno. Os espectros de fluorescência, apresentados na Fig. 6.11, foram tomados, portanto, em amostras de BSA em concentração de 2,5  $\mu\text{M}$ .

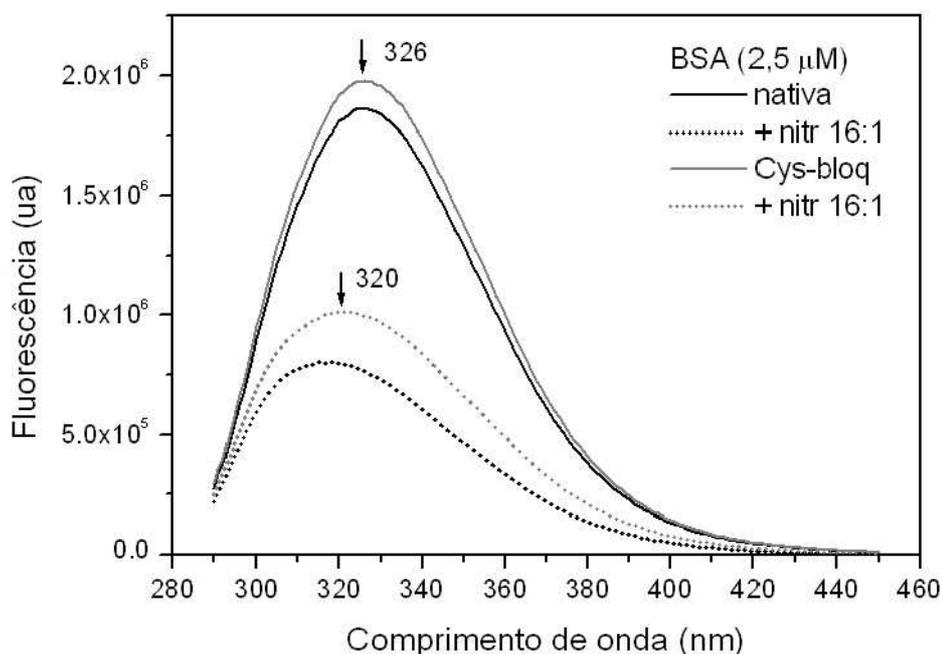


Figura 6.11 Espectros de fluorescência obtidos a partir das amostras utilizadas na medida de absorção da Seção 6.3, diluídas 100 vezes imediatamente antes da obtenção dos espectros.

Os espectros obtidos no espectrofluorímetro foram muito interessantes pois apresentaram variações marcantes. A Fig. 6.11 mostra que após as reações de nitração ocorreu redução da fluorescência e deslocamento do pico para o azul. A BSA nativa (linhas pretas) apresentou uma redução de 57% na intensidade e um deslocamento do pico de 326 para 318 nm. Uma modificação similar ocorreu com BSA tratada com NEM (linhas cinzentas) com uma redução de 49% em intensidade e deslocamento de 326 para 320 nm. Essas modificações nos espectros, devido principalmente à emissão de triptofano, vêm confirmar que os resíduos de triptofano – Trp 134 e Trp 212 – sofrem modificação no anel indol, responsável pela fluorescência.

As diluições e medidas de fluorescência foram repetidas no dia seguinte, não tendo sido observadas alterações significativas, mostrando que as alterações nos resíduos de Trp já tinham atingido o equilíbrio.

## 6.7 Cinética de modificação de resíduos de triptofano por fluorescência

Seguindo nosso objetivo, de pesquisar as modificações nos resíduos de triptofano causadas pela reação ácida com nitrito, delineamos outros experimentos em busca de novos dados de fluorescência.

Inicialmente obtivemos os espectros de emissão de fluorescência de BSA e de HSA em pH 7.4 e em HCl 0,25 M. Os resultados são apresentados na Fig. 6.12.

Como BSA tem dois resíduos de triptofano (Trp 134 e Trp 212) e HSA tem apenas um (Trp 214), um fator 2 entre as intensidades de fluorescência seria previsível caso os resíduos tivessem rendimento quântico semelhantes. A Fig. 6.12 mostra que isso realmente ocorre em HCl, mas que em pH 7,4 o pico de BSA é mais que o dobro do de HSA ( $F_{\max\text{BSA}}/F_{\max\text{HSA}} \approx 3$ ). Isso indica que em pH neutro o rendimento quântico do Trp 134 de BSA é bem maior do que o dos Trp equivalentes nas duas albuminas (214 em HSA e 212 em BSA).

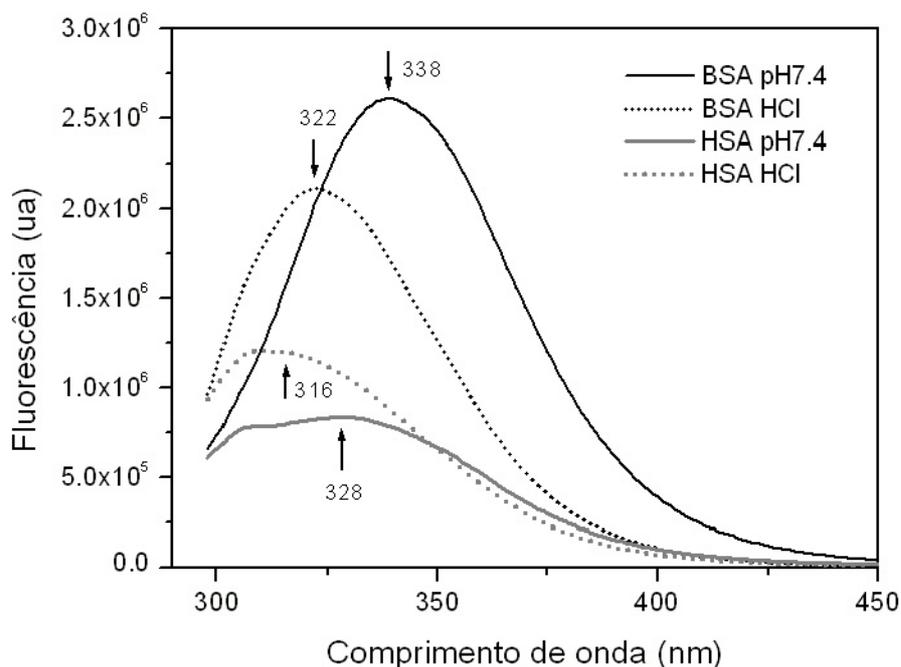


Figura 6.12 Espectros de fluorescência de BSA (pretos) e HSA (cinzentos), ambas em concentração 2,0  $\mu\text{M}$ , em pH 7,4 (curvas contínuas) e em solução de HCl 0,25 M (curvas pontilhadas).

Quanto à posição dos picos, indicadas na Fig. 6.12, tanto em pH 7,4 (linhas contínuas) quanto em HCl (linhas pontilhadas) o pico de HSA encontra-se deslocado para comprimentos de onda menores, em relação ao de BSA, por cerca de 10 nm.

Em seguida, amostras de BSA e HSA com concentrações de 0,25 mM em meio ácido (HCl 0,25 M) foram tratadas com nitrito (1,0 mM, relação 4:1), da mesma forma que na Seção 6.5. Para medidas de fluorescência, alíquotas das soluções, antes da adição de nitrito e em diferentes tempos de reação, iam sendo retiradas e diluídas 100 vezes em tampão TRIS 50 mM, pH 7,4. Logo após a diluição (~ 20 s), iniciava-se a varredura temporal da fluorescência excitada em 280 nm e detectada em 338 nm, não só para observar a dependência da fluorescência com o tempo de reação com nitrito como também para verificar a estabilidade em pH neutro dos resíduos de triptofano modificados durante a reação.

A Fig. 6.13 mostra alguns dos gráficos de fluorescência em função do tempo para BSA (A) e para HSA (B). É importante lembrar que a iluminação contínua das amostras com a luz de excitação produz foto-degradação e portanto redução de fluorescência do triptofano. Nos gráficos da Fig. 6.13 esse efeito aparece superposto a outros que passamos a analisar.

A fluorescência do triptofano diminui com o tempo de reação em ambas albuminas. No entanto, em função do tempo em pH neutro, após diluição, a BSA apresenta uma fase inicial de recuperação parcial da fluorescência. Essa fase não é observada na primeira alíquota de BSA (não tratada com nitrito), indicando que não é um efeito retardado da variação brusca de pH. Essa fase de recuperação da fluorescência está ausente em HSA, indicando que está associada à fluorescência do Trp134 da BSA. O fato da fluorescência de BSA ser parcialmente recuperada quando a proteína volta a pH fisiológico, etapa que não ocorre com HSA, sugere que NO pode, em pH neutro, estar sendo liberado do resíduo Trp134, inexistente na HSA.

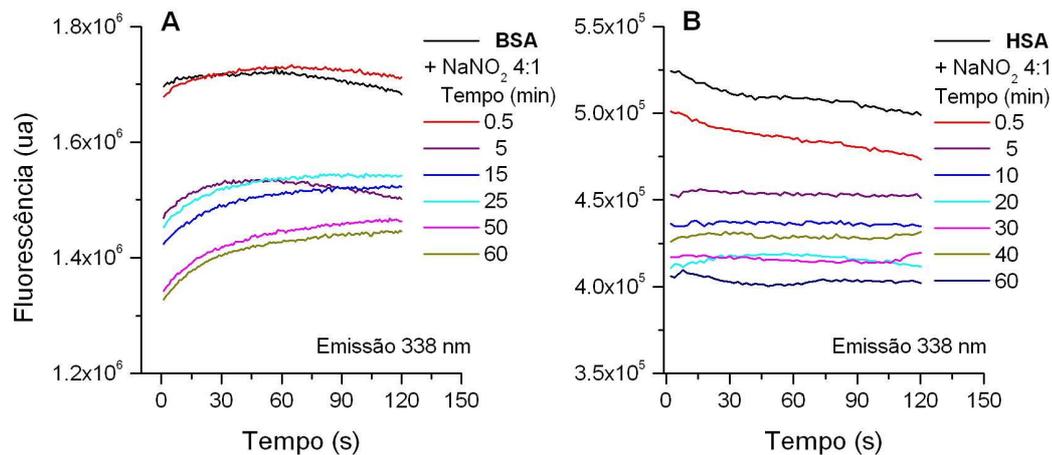


Figura 6.13 Fluorescência de BSA e HSA em função do tempo, com início imediatamente após diluição em pH 7,4. São apresentadas curvas obtidas após diferentes períodos de tratamento com nitrito.

Para analisar os dados de decréscimo da fluorescência, fizemos o gráfico da intensidade de fluorescência, logo após a diluição, em função do tempo de reação ácida com nitrito. O resultado aparece na Fig. 6.14 A. Analisando os dados concluímos que está ocorrendo redução de fluorescência dos resíduos de triptofano da albumina, ~ 20% para BSA e ~ 25% para HSA, causados pelo tratamento com nitrito, durante a primeira meia hora de tratamento.

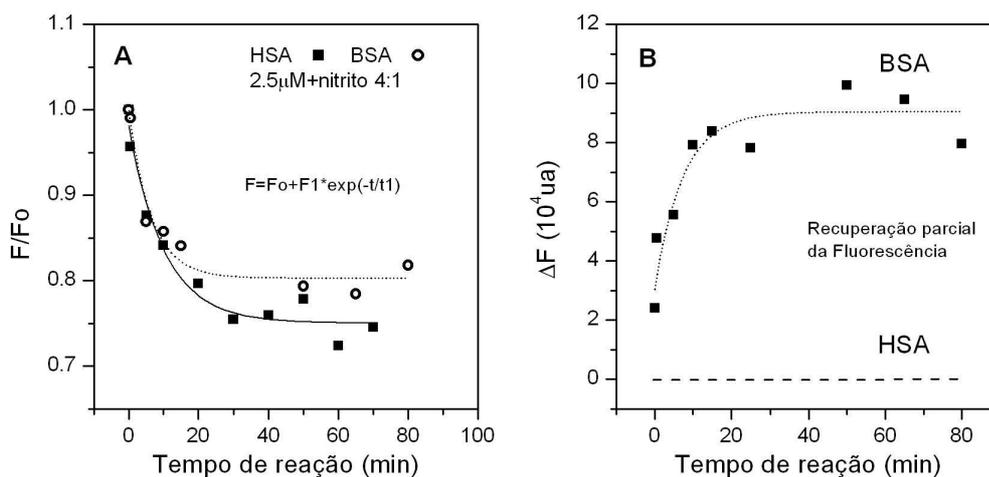


Figura 6.14 Fluorescência de HSA e de BSA em função do tempo, com início imediatamente após diluição em pH 7,4. São apresentadas curvas obtidas após diferentes períodos de tratamento com nitrito.

A Fig. 6.14 B mostra a recuperação parcial da fluorescência de BSA em função do tempo de reação com nitrito. A linha pontilhada indica que para HSA não há essa fase de recuperação. No caso dessa recuperação estar associada à liberação de NO, verifica-se que depois de cerca de 20 a 30 min de reação não há mais incremento na liberação.

Os resultados da Fig. 6.14 A apresentam uma cinética mais rápida do que os obtidos através de absorção ótica, na Seção 6.5, em que se observou uma cinética bem mais lenta de aparecimento do espectro atribuído à nitrosilação de resíduos de triptofano. É importante lembrar os procedimentos para as medidas de fluorescência foram bem diferentes dos de absorção ótica. As medidas de fluorescência foram feitas em pH neutro, apesar da reação ter sido desenvolvida em pH ácido. Pode ter havido, portanto, renaturação parcial das albuminas. Como desdobramento deste trabalho, fica a sugestão de observar o decaimento do sinal de absorção em pH neutro.

