

7. Conclusão

7.1 Conclusões

Nossos experimentos demonstraram que o tratamento com nitrito acidificado além de produzir S-nitrosilação da única cisteína das albuminas séricas humana e bovina, produzem N-nitrosação dos resíduos de triptofano dessas albuminas. Em BSA sofrem nitrosação: Cys 34, Trp 134 e Trp 212 e em HSA são nitrosados os resíduos Cys 34 e Trp 214. Admitindo que estruturalmente Cys 34 e Trp 212 (BSA) correspondem a Cys 34 e Trp 214 (HSA), o resíduo Trp 134 é o elemento causador das diferenças encontradas entre BSA e HSA. Esse resíduo apresentou constante cinética de nitrosação duas vezes maior do que os resíduos de Trp 212 e Trp 214 de BSA e HSA, respectivamente.

O espectro de absorção das espécies com triptofano N-nitrosado é muito semelhante ao de espécies S-nitrosiladas na região entre 300 e 400 nm. Sua densidade ótica, no entanto é muito maior, o que pode induzir a cálculos superestimados de concentrações de espécies S-nitrosiladas.

A reação de albumina com nitrito acidificado, mesmo na proporção molar de 1:1, durante 10 min não produz apenas albumina S-nitrosilada. Apesar da taxa de formação de espécies TrpNO-BSA ser 5 vezes menor do que de CysNO-BSA, esta taxa deve ser levada em consideração no cálculo dos coeficientes de absorção molar das albuminas. Utilizando a banda visível de compostos S-nitrosilados, encontramos que o valor do coeficiente de absorção molar em 334 nm para a BSA S-nitrosilada deve estar na faixa de $0,81 \cdot 10^3$ a $1,9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Essa faixa está mais de acordo com os valores encontrados para diversos S-nitrosotióis ($\sim 1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) do que o valor de $3,9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, encontrado por Stamler et al. (1992). Este valor superestimado por Stamler et al. deveu-se à nitrosação de triptofano da BSA que ocorreu concomitantemente à S-nitrosilação e não foi levado em conta. Utilizando os resultados obtidos na Seção 6.5 (relacionados na Tabela 6.2), em

que obtemos a absorvância total das espécies nitros(il)adas, e considerando que somente uma espécie estaria sendo formada, chegamos a $3,4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para coeficiente de absorção molar da BSA tratada com nitrito na proporção de 1:1, o que é bastante próximo do valor obtido por Stamler et al. ($3,87 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Concluimos, então, que este valor se refere a mistura de BSA S-nitrosilada e N-nitrosada.

Na Seção 6.6, utilizando a fluorescência intrínseca, devida aos resíduos de Trp, de BSA nativa e BSA com resíduo de cisteína bloqueado, confirmamos que os resíduos de Trp 134 e Trp 212 sofrem modificação no anel indol, pois este é o responsável pela fluorescência.

Para finalizar estudamos a cinética de modificação de resíduos de Trp através de fluorescência. Investigamos a possível liberação de NO em pH 7,4. De acordo com os resultados apresentados na Seção 6.7, a fluorescência de BSA foi parcialmente recuperada quando a proteína retornou a pH fisiológico, o que não aconteceu a HSA, sugerindo que NO pode ser liberado do resíduo de Trp 134 (em pH neutro), ausente em HSA. Estes resultados chamam a atenção para uma possível nova função para a BSA: transportadora de NO, com liberação dependente do pH, o que pode variar nos diversos microambientes dos vários tecidos presentes nos seres vivos. Dessa forma a BSA conduziria o NO para locais afastados de onde foi produzido, acarretando novas respostas fisiológicas, que precisariam de comprovação *in vivo* para validar tal hipótese.

5.2 Desdobramentos

Uma vez confirmado que os resíduos de triptofano são modificados por N-nitrosação do indol, pretende-se submeter à N-nitrosação albumina e outras moléculas menores, como N-acetil-triptofano e pequenos peptídios, para observar a possível liberação ou transferência de NO para outras moléculas biologicamente relevantes em pH fisiológico. As mesmas técnicas de espectrofotometria de absorção e fluorescência no estado estacionário são adequadas, mas podem ser complementadas por medidas de tempo de vida de fluorescência e espectrometria de massa.

Pretende-se investigar a influência de oxigênio nos processos estudados. Pretende-se investigar modelos *in vitro* que permitam nos aproximar mais dos processos *in vivo* envolvendo NO, verificando, por exemplo, a influência de membranas nas reações e interações.

Deseja-se também tentar relacionar as modificações em proteínas e membranas com os efeitos citotóxicos do NO que é liberado em grandes quantidades por macrófagos.

