



LUIZ DA SILVA GÓES FILHO

**CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS CINÉTICOS DE ALBUMINA
TRATADA COM ESPÉCIES REATIVAS DERIVADAS DE
ÓXIDOS DE NITROGÊNIO: ESPECTROSCOPIA DE
ABSORÇÃO E FLUORESCÊNCIA**

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Física do Departamento de Física da PUC-Rio.

Orientadora: Sônia Renaux Wanderley Louro

Rio de Janeiro
Setembro de 2005



Luiz da Silva Góes Filho

**CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS CINÉTICOS DE ALBUMINA
TRATADA COM ESPÉCIES REATIVAS DERIVADAS DE
ÓXIDOS DE NITROGÊNIO: ESPECTROSCOPIA DE
ABSORÇÃO E FLUORESCÊNCIA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Física pelo Programa de Pós-Graduação em Física do Centro Técnico Científico da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo assinada.

Prof. Sônia Renaux Wanderley Louro

Orientadora

Departamento de Física – PUC-Rio

Prof. Iouri Borissevitch

Depto. de Física e Matemática – FFCLRP – USP

Prof. Eliane Wajnberg

Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas – CBPF

Prof. Welles Antonio Martinez Morgado

Departamento de Física – PUC-Rio

Prof. José Eugenio Leal

Coordenador Setorial de Pós-Graduação

Centro Técnico Científico – PUC-Rio

Rio de Janeiro, 12 de setembro de 2005

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, do autor e da orientadora.

Luiz da Silva Góes Filho

Graduou-se em Bacharelado em Ciências Náuticas especialidade Máquinas (2º oficial de máquinas) na EFOMM-RJ em 1987 e em Bacharelado em Física na UERJ em 1997 e completou o mestrado em Física da Matéria Condensada Experimental (Biofísica Molecular) na PUC-Rio em 2005.

Ficha Catalográfica

Góes Filho, Luiz da Silva

Caracterização e estudos cinéticos de albumina tratada com espécies reativas derivadas de óxidos de nitrogênio: espectroscopia de absorção e fluorescência / Luiz da Silva Góes Filho; orientadora: Sônia Renaux Wanderley Louro. – Rio de Janeiro PUC, Departamento de Física, 2005.

84 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Física.

Inclui referências bibliográficas.

1. Física – Teses. 2. Biofísica molecular. 3. Absorvância proteínas. 4. Fluorescência proteínas. I. Louro, Sônia Renaux Wanderley. II. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Física. III. Título.

CDD: 530

DEDICO

À memória de meu pai, Luiz da Silva Góes.

À minha mãe, Marlene Ribeiro Góes.

A meu tio, Osvaldo Monteiro Ribeiro.

Agradecimentos

A minha mulher Rita, pela companhia e incentivo nas lutas diárias e contínuas, por todos esses anos.

As minhas filhas: Gabriela, 14 anos, e Carolina, 12 anos, pelo extremo carinho e paciência para comigo e pela dualidade de serem minhas alunas e minhas professoras.

A todos os meus familiares e todos os meus amigos, pelo aprendizado dos mais variados conhecimentos, em todos esses anos de relacionamentos.

Aos professores e funcionários do Departamento de Física da PUC-Rio, pela elevação da ciência nacional, produzindo e ensinando ciência de qualidade.

Aos companheiros do Grupo de Biofísica Molecular: Tiago, Fernando, Elmer e Lourdes pela amizade e aprendizado nas nossas reuniões.

Agradecimento especial

À Professora Sônia Renaux Wanderley Louro, exemplo de professora, exemplo de cientista e exemplo de formadora de cientistas.

“O Professor se liga à eternidade; ele nunca sabe onde cessa a sua influência.”

Henry Adams

Resumo

Góes Filho, Luiz da Silva; Louro, Sônia Renaux Wanderley. **Caracterização e estudos cinéticos de albumina tratada com espécies reativas derivadas de óxidos de nitrogênio: espectroscopia de absorção e fluorescência.** Rio de Janeiro, 2005, 84p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Física, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

A descoberta da importância do óxido nítrico na fisiologia humana expandiu a investigação dos mecanismos de interação das espécies reativas derivadas de óxidos de nitrogênio com biomoléculas. S-nitrosotiois são uma fonte conveniente de óxido nítrico para utilização *in vivo*. Um dos métodos largamente utilizados para S-nitrosilação de compostos contendo o grupo -SH, incluindo proteínas contendo o aminoácido cisteína, é a reação com nitrito em meio ácido. Nesse trabalho investigaram-se as espécies derivadas da reação de albumina sérica, humana e bovina, e de insulina com nitrito, através de espectrofotometria de absorção e de fluorescência. Além da modificação dos resíduos de cisteína, demonstrou-se que resíduos do aminoácido triptofano também sofrem modificação, podendo participar dos processos *in vivo*. A partir da comparação entre os espectros de absorção dos cromóforos formados em albumina humana e bovina, bem como em insulina, demonstrou-se que a banda de absorção no ultravioleta, descrita na literatura como característica de S-nitrosilação de cisteína, é dominada pelos resíduos de triptofano N-nitrosados. Experimentos de fluorescência confirmaram a modificação dos resíduos de triptofano, já que os espectros apresentaram redução do rendimento quântico e também deslocamento do pico característico desses resíduos. Acompanhou-se a cinética de formação de novos cromóforos, comparando as albuminas nativas e bloqueadas no resíduo de cisteína. Investigou-se a cinética de modificação dos resíduos de triptofano em pH fisiológico através de fluorescência.

Palavras-chave

Óxido nítrico, albumina, triptofano, nitrosação, absorção ótica, fluorescência.

Abstract

Góes Filho, Luiz da Silva; Louro, Sônia Renaux Wanderley. **Characterization and kinetic studies of albumin treated with nitrogen oxide derived reactive species: absorption spectroscopy and fluorescence.** Rio de Janeiro, 2005, 84p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Física, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

The discovery of the importance of nitric oxide to the human physiology expanded the investigation of mechanisms involved in the interactions of nitrogen oxide reactive species with biomolecules. S-nitrosothiols are a convenient source of nitric oxide for *in vivo* applications. Acid treatment with nitrite of compounds containing the –SH group, including proteins containing cysteine residues, is a widely used method to synthesize S-nitrosothiols. In this work, several species derived from the nitrite acid treatment of human and serum albumins as well as insulin were investigated using optical absorption and fluorescence. It was demonstrated that, besides cysteine, tryptophan residues are modified and can participate in processes *in vivo*. Comparing the absorption spectra from human and bovine serum albumin with that from insulin, it was demonstrated that the ultraviolet absorption band, described in the literature as coming from S-nitrosylation, was mainly due to N-nitrosation of tryptophan residues. Fluorescence experiments confirmed the modification of tryptophan residues, since the characteristic fluorescence peak exhibited a reduction and a blue shift. The kinetics of the new chromophores was followed by comparison of native and cysteine-blocked albumins. The kinetics of tryptophan modifications was investigated at the physiological pH using fluorescence.

Keywords

Nitric oxide, albumin, tryptophan, nitrosation, optical absorbance, fluorescence.

Sumário

1.	Introdução	13
1.1	Introdução	13
1.2	Objetivos	15
1.3	Estrutura dos capítulos	16
2.	O Óxido Nítrico	17
2.1	Introdução	17
2.2	Biossíntese do óxido nítrico	18
2.3	Transporte de óxido nítrico	24
3.	Proteínas	25
3.1	Estrutura de Proteínas	25
3.2	Albumina e Insulina	29
3.3	Modificação de Proteínas por Óxidos de Nitrogênio	33
4.	Técnicas Espectroscópicas	37
4.1	Espectroscopia de Absorção	37
4.2	Fluorescência no Estado Estacionário	45
5.	Procedimentos experimentais	53
5.1	Materiais	53
5.2	Técnicas espectroscópicas	53
5.3	Métodos	55
6.	Resultados e Discussão	57
6.1	Espectros de absorção ótica de S-nitrosotióis	57
6.2	Nitrosação da albumina bovina em meio ácido	58
6.3	Comparação entre nitrosação de BSA nativa e BSA Cys-bloqueada	64
6.4	Nitrosação da insulina para comparação com a albumina bovina	66
6.5	Comparação entre nitrosação de albumina bovina e humana	68
6.6	Fluorescência de BSA submetida a nitrosação	72
6.7	Cinética de modificação de resíduos de triptofano por fluorescência	74
7.	Conclusão	79
7.1	Conclusões	79
7.2	Desdobramentos	80
	Referências Bibliográficas	83

Índice de Figuras

Figura 2.1	Relaxação Vascular mediada por óxido nítrico (Moncada e Higgs, 1993).	20
Figura 2.2	O papel do óxido nítrico na potencialização de longo prazo da atividade neuronal (Moncada e Higgs, 1993).	21
Figura 2.3	Mecanismo de citostase e citotoxicidade induzido por óxido nítrico (Moncada e Higgs, 1993).	22
Figura 2.4	Mudanças Vasculares durante o choque séptico e o efeito de N^G - Monometil-L-Arginina (Moncada e Higgs, 1993).	23
Figura 3.1	Níveis de organização da estrutura molecular de uma proteína.	26
Figura 3.2	Exemplo de uma estrutura do tipo hélice-alfa.	27
Figura 3.3	Exemplo de uma estrutura do tipo folha-beta.	28
Figura 3.4	Exemplo de estrutura terciária de uma proteína.	29
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)	31
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)	32
Figura 4.1	Propagação de uma onda eletromagnética, mostrando que o campo elétrico (E) e o campo magnético (B) são mutuamente perpendiculares.	37
Figura 4.2	Típico diagrama de níveis de energia mostrando o estado fundamental e o primeiro estado excitado. Os níveis vibracionais são mostrados como linhas horizontais mais finas (www.chemkeys.com).	39
Figura 4.3	Parte do espectro eletromagnético com destaque para os comprimentos de onda da luz visível.	40
Figura 4.4	Esquema do espectrofotômetro HP-8452A. A luz da lâmpada passa através da amostra e solvente contidos em uma cubeta. Em seguida passa pela rede de difração, para seleção do comprimento de onda, e atinge o arranjo de diodos para a detecção (da Silva, Tese de mestrado, PUC-Rio).	42

- Figura 4.5 Exemplos de espectros de absorção. A partir de diferenças entre espectros de amostras, freqüentemente é possível identificar seus componentes moleculares (www.chemkeys.com). 42
- Figura 4.6 Diagrama de níveis de energia de um cromóforo. G e S1 indicam o estado fundamental e o primeiro estado excitado, respectivamente. Os estados vibracionais são representados pelas linhas finas horizontais. Esta molécula absorve luz pelas transições indicadas no diagrama. Depois da excitação, há perdas vibracionais para o nível mais baixo do primeiro estado excitado e então é capaz de emitir luz por fluorescência a partir desse estado (www.chemkeys.com). 46
- Figura 4.7 Espectros típicos de absorção (tracejado), excitação (pontilhado) e emissão (contínuo) de fluorescência (A), bem como espectros de excitação e emissão de fluorescência do triptofano (B) (www.chemkeys.com). 47
- Figura 4.8 Esquema de um sistema de fluorescência semelhante ao utilizado no presente trabalho. A fluorescência é emitida em todas as direções pela amostra, mas a maioria dos sistemas analisa somente a que é emitida a 90° em relação à luz de excitação (www.chemkeys.com). 49
- Figura 5.1 Fotografia do Espectrofotômetro HP-8452A, Hewlett-Packard. 54
- Figura 5.2 Fotografia do Sistema de Fluorescência QM-1 da PTI - Photon Technology International. 55
- 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. 57
- Figura 6.2 Evolução temporal do espectro diferencial de absorção de novos cromóforos gerados durante a reação de albumina bovina (0,5 mM) com NaNO_2/HCl . HCl 0.5M e nitrito na proporção de 1 : 1 em relação a BSA. Inserido acima, à direita, encontra-se o gráfico da absorvância em 334 nm em função do tempo. 59
- 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.... 60
- 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. 61
- 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. 63

- 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). 64
- Figura 6.7 Comparação entre a evolução temporal dos máximos de absorção, em 336 nm, entre a BSA nativa e a bloqueada com NEM. 65
- 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..... 67
- 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 (NaNO_2) em concentrações de 0,125 mM (1:1) e 0,5 mM, (4:1), em meio ácido. 68
- 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. 70
- 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. 73
- Figura 6.12 Espectros de fluorescência de BSA (pretos) e HSA (cinzentos), ambas em concentração 2,0 μM , em pH 7,4 (curvas contínuas) e em solução de HCl 0,25 M (curvas pontilhadas). 74
- 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..... 76
- 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..... 76

Abreviações

ATP	adenosina trifosfato
BSA	albumina sérica bovina
Cys	cisteína
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
GSNO	S-nitroso glutationa
HSA	albumina sérica humana
NADH	N-Nicotinamida Adeninadinucleotídeo
NEM	N-etil-maleimida
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintetase
SNAP	S-nitroso-N-acetilpenicilamina
Trp	triptofano
UV	ultravioleta