

Universidade Federal do ABC
Centro de Ciências Naturais e Humanas

***Estudos sobre a PrP^C e a PrP^C deletada em sua cadeia
octarepetida na atividade superóxido dismutásica***

Fernanda Rodrigues Bertuchi

*Relatório submetido à UFABC, como
avaliação do trabalho de conclusão
de curso em química (TCC).*

Orientadora: Profa. Dra. Giselle Cerchiaro
Professores convidados: Dr. Erick Leite Bastos,
Dr. Vani Xavier de Oliveira Junior

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas	3
Figuras	4
Resumo	5
1. Introdução	6
2. Objetivo	8
3. Parte Experimental	8
3.1 Materiais	8
3.1.1 Reagentes e Equipamentos	8
3.2 Métodos	8
3.2.1 Atividade superóxido dismutase da PrP ^C wt e PrP ^C del[51-91]	8
3.2.2 Tratamento de células de astrócitos nocautes (Wko) para PrP ^C e células de astrócitos normais (Wwt) com sistemas oxidantes e verificação de geração de ROS por sonda	10
4. Resultados e Discussão	11
5. Conclusões	18
6. Bibliografia	20

Lista de Abreviaturas e Siglas

Abs - Absorbância

BSA – Albumina Soro Bovina

Citc Fe³⁺ - Ferricitocromo c ou Citocromo C

DCFDA - 2,7-diacetato de diclorofluoresceína – (C₂₄H₁₆Cl₂O₇) em CH₃CN (estoque)

DTPA – Ácido dietilenotriaminopentaacético – (C₁₄H₂₃N₃O₁₀)

EDTA - Etilenodiaminotetraacetato dissódico diidratado –(C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈ · 2H₂O)

PAR - 4-(2-piridilazo)-resorcinol – (C₁₁H₉N₃O₂)

PBS – Tampão fosfato salino

PrP^C - del[51-91] - Proteína príon celular mutante com deleção na região octarepetida [51-91] de camundongo.

PrP^C wt - Proteína príon celular normal de camundongo

ROS – Espécies reativas de oxigênio

Sod1/ sod1/ SOD- Superóxido dismutase ou superóxido dismutase de cobre e zinco.

t.a - Temperatura ambiente

X - Xantina

XO – Xantina Oxidase

Wko – astrócito nocaute, sem PrP^C, extraído de camundongo e cultivado em laboratório (Instituto Ludwig de pesquisa contra o Cancer, São Paulo, SP, Profa. Vilma R. Martins).

Wwt – astrócito normal, extraído de camundongo e cultivado em laboratório (Instituto Ludwig de pesquisa contra o Cancer, São Paulo, SP, Profa. Vilma R. Martins).

Figuras

- Figura 1:** Curva de Calibração para quantificação de Cu^{2+} . Ensaio com quelante, proteínas BSA, PrP^C wt e PrP^C del[51-91] após ensaio de retirada do cobre ■, e não tratadas ■..... 11
- Gráfico 1:** Ensaio de atividade superóxido dismutase referente às proteínas BSA, PrP^C wt e PrP^C del[51-91] sem receber o tratamento para a retirada do cobre. 13
- Gráfico 2:** Ensaio com DTPA - Ensaio de atividade superóxido dismutase referente às proteínas BSA, PrP^C wt e PrP^C del[51-91] após tratamento para retirada do cobre, onde se obteve a retirada do metal. 14
- Figura 2:** Curva de Calibração para quantificação de Cu^{2+} . Proteínas BSA, PrP^C wt e PrP^C del[51-91] submetidas ao tratamento sem quelante para retirada dos íons cobre (II). 15
- Gráfico 3:** Células Wwt e Wko após receberem os seguintes tratamentos: 16

Resumo

Estudos sobre a PrP^C e a PrP^C deletada em sua cadeia octarepetida na atividade superóxido dismutásica

Bertuchi, F.R;

A proteína príon celular (PrP^C) está presente na superfície de todas as células, em especial nas do sistema nervoso, ancorada por uma glicoproteína. Estudos conduzidos na última década têm atribuído atividade de superóxido dismutase à PrP^C devido ao fato desta se complexar com até 5 íons de cobre na sua região N-terminal (chamada região octarepetida, resíduos 51-91). Porém, paradoxalmente, tem sido proposto que a PrP^C possui atividade pró-oxidante.

Dessa forma, neste projeto o intuito foi avaliar a extensão da atividade anti-radicalar, como a atividade tipo superóxido dismutásica da PrP^C wt e PrP^C del[51-91], cuja deleção nestes resíduos é justamente na região de domínio octarepetido onde os íons cobre complexam-se, já que até o momento ambas as funções antioxidante e pró-oxidante tem sido propostas na literatura a PrP^C.

Para avaliar a atividade superóxido dismutase da PrP^C wt e PrP^C del[51-91], o método utilizado foi o de redução do Citocromo C através do sistema Xantina/Xantina Oxidase. O superóxido (O₂⁻) gerado no sistema reduz o Fe(III) do Citocromo C à Fe(II), e é possível acompanhar espectrofotometricamente. Caso a SOD esteja presente esta redução é diminuída, pois tem-se menos radicais (O₂⁻) presentes.

Neste trabalho demonstrou-se que a ambas PrP^C wt e PrP^C del[51-91] não apresentaram atividade de superóxido dismutase significativa, uma vez que a atividade foi praticamente igual a apresentada pela BSA (soro albumina bovina) que utilizamos como parâmetro protéico de alteração do meio. Foi utilizado como controle positivo a própria enzima superóxido dismutase.

Palavras chave: Cobre, SOD, PrP^C

1. Introdução

As doenças neurodegenerativas implicam na presença de um excesso de proteínas mal enoveladas causando danos neuronais (Taylor et al, 2002), e acredita-se que são entre outras causas originadas pelo enfraquecimento do controle homeostático de radicais livres e dos metais de transição, em especial do cobre (Gaggeli et al, 2006). Estas proteínas alteradas têm a tendência de se agregarem e formarem depósitos sólidos diversos, como na ALS (formação de corpos de Bunina), as placas amilóides na doença de Alzheimer (AD) e nas doenças por príons (PrPD), dentre outras (Gaggeli et al, 2006, e referencias citadas). Além disso, patologias relacionadas com o envelhecimento caracterizam-se pelo acúmulo de proteínas oxidadas (Stadtman, 2000).

Doenças causadas por príons são um grupo de desordens neurodegenerativas fatais, incluindo a doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD) em humanos e a encefalopatia espongiforme (BSE) em bovinos. Os príons são compostos por uma isoforma alterada da sialoglicoproteína normal chamada PrP^C (proteína príon celular) (Ross et al, 2005; Weissmannm 2005; Aguzzi e Polymenidou, 2004; Martins et al, 2001). Ao contrário da atenção dada a doenças causadas pelas proteínas auto-propagantes, a função normal de PrP^C é parcialmente conhecida. Por exemplo, PrP^C pode ser convertido na forma infecciosa, ou auto propagante denominada PrP^{Sc} (de “scrapie”) em animais infectados (Gaggeli et al, 2006). Acredita-se que PrP^{Sc} é citotóxico especialmente em células que expressam mais ativamente PrP^C na superfície, como as células neuronais. Não há alterações na seqüência de aminoácidos na proteína PrP^{Sc} se comparada a PrP^C, entretanto a primeira adquire uma mudança conformacional onde predominam folhas β , conseqüentemente uma proteína mais insolúvel e com maior capacidade de agregação.

As doenças causadas por príons em humanos podem ainda ter origem genética, devido a mutações no gene que codifica PrP^C, *PRNP*, que está localizado no cromossomo 20. Em algumas delas há sinais característicos de *danos oxidativos* na área afetada do cérebro. Assim, em um primeiro momento, a infecção por príons em tecidos cerebrais foi relacionada com a homeostase defeituosa de muitos metais de transição com elevada atividade redox, incluindo além do cobre, o ferro e o manganês, capazes de produzir radicais hidroxila por reações do tipo Fenton (Gaggeli et al, 2006, e referencias citadas). Por exemplo, níveis de marcadores do estresse oxidativo, como o malonaldeído (MDA) e heme-oxigenase1, estão significativamente elevados nos cérebros de ratos infectados

por príons, sugerindo uma perda de defesa anti-oxidante (Lee et al, 1999; Choi et al, 2000). Deste então, doenças causadas por príons têm sido ligadas a estresse oxidativo induzido por metais, embora ainda não se saiba se esta alteração na homeostase dos metais é a causa ou o efeito da propagação do príon.

Pesquisas recentes conduzidas na última década, entretanto, demonstraram que PrP^C complexa cobre seletivamente, demonstrando este metal estar intimamente ligado a função e a estrutura da proteína (Gaggeli et al, 2006; Walter et al, 2006; Millhauser, 2004; Tsirolnikov et al, 2006; Stanczak et al, 2006; Choi et al, 2006; Chattopadhyay et al, 2005; Cereghetti et al, 2004; Qin et al, 2003; Viles et al, 1999; Stockel et al, 1998). A afinidade da PrP^C por Cu(II) é alvo de intensos debates, onde constantes de dissociação proteína-metal mostraram variações entre 10⁷ a 10¹⁵ (Thompsett et al, 2005; Kramer et al, 2001; Jackson et al, 2001).

Funcionalmente, foi sugerido que a ligação de íons de cobre no resíduo octarepetido da PrP^C previne sua conversão em PrP^{Sc}, embora catalise a dimerização da PrP^C, enquanto o manganês exibe forte atividade agregatória na proteína. As diferenças químicas de coordenação destes dois metais pode ser a explicação do porquê a PrP^C liga-se ao cobre e ao manganês diferentemente – o Cu²⁺ é mais mole e prefere sítios de ligação nitrogenados, enquanto Mn²⁺ é mais duro e é altamente oxofílico.

Deste modo, o cobre parece ter um papel fundamental tanto na função normal de PrP^C como nos mecanismos de infecção por príons, talvez pela atuação da proteína como superóxido dismutase ou como carreadora de cobre por endocitose, interferindo ativamente na homeostase e no metabolismo deste metal no cérebro, e conseqüentemente na produção de ROS (Nadal et al, 2007; Toni et al, 2005; Deloncle et al, 2006; Watt et al, 2005). Foi atribuída uma atividade superóxido dismutase à PrP^C ao se complexar com cobre na sua região N-terminal, aumentando a defesa antioxidante da célula e os níveis de glutatona (Rachidi et al, 2003).

Até o momento, as funções anti-oxidante (Wong et al, 2000; Brown et al, 2001, 1999 e 1998; Choi et al, 2000; Shiraishi et al 2000; Ruiz et al, 2000; Lee et al, 1999) e pró-oxidante (Miura et al, 2005; Tambull et al, 2003) têm sido propostas para a PrP^C, com bastante controvérsia entre os pesquisadores da área.

2. Objetivo

Avaliar qual a atividade anti-radicalar, como a atividade tipo superóxido dismutásica da PrP^C wt e PrP^C del [51-91], em função da presença ou ausência de íons cobre(II) complexados as mesmas, utilizando a Sod1 e BSA como padrões para comparação, padrões positivos e negativos respectivamente. Com isso, o objetivo é comparar nossos resultados com resultados controversos da literatura.

3. Parte Experimental

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes e Equipamentos

Todos os reagentes utilizados possuíam qualidade Merck, Sigma-Aldrich ou similar e pureza acima de 98%.

As proteínas foram expressas no Instituto Ludwig de Pesquisa Contra o Câncer e cedidas pela professora Dra. Vilma Martins. As células também foram obtidas e cedidas pelo grupo de pesquisa da Profa. Vilma, e cultivadas no laboratório da UFABC.

Espectrofotômetro UV-Visível, marca HACH, modelo DR 5000.

Espectrofotômetro de Fluorescência, marca Varian, modelo Cary Eclipse.

3.2 Métodos

3.2.1 Atividade superóxido dismutase da PrP^C wt e PrP^C del[51-91]

Inicialmente foi feita a adaptação do sistema de geração ($O_2^{\cdot-}$), para isso todas as soluções foram preparadas em quantidades suficientes para a realização do trabalho, e seguiu-se para a determinação de alguns parâmetros experimentais, concentração de XO e Sod1, para avaliar a redução do Citocromo C através do sistema Xantina/ Xantina Oxidase (Fridovich, 1969). O superóxido ($O_2^{\cdot-}$) gerado no sistema reduz o Fe(III) do Citc à Fe(II), e é possível acompanhar espectrofotometricamente.

Utilizou-se como partida as concentrações sugeridas pelo método descrito por Fridovich em 1969. Uma solução contendo Citc Fe^{3+} , Xantina, Tampão fosfato, EDTA e XO foi preparada e agitada em vórtex, por 15 segundos, então, realizou-se uma varredura de comprimento de onda, entre 540 e 560 nm, no espectrofotômetro para esta solução, por três vezes em intervalos de um minuto.

Sabendo-se que o máximo de absorção ocorre em aproximadamente 550 nm, a velocidade de redução do Citocromo C para esse sistema foi avaliada em 550 nm, e quando obteve-se uma taxa de redução de aproximadamente 0,025 Abs/min, foi adicionado Sod1 ao sistema, para que a taxa de redução diminuísse para aproximadamente 0,0125 Abs/min, ou seja, a Sod1 dismutou o O_2^- (à H_2O_2 e H_2O) e ele não fica disponível para reduzir o Citc Fe^{3+} .

Findada a obtenção dos controles positivo com Sod1 e negativo com BSA, apenas substituindo a Sod1 por BSA, a verificação da atividade superóxido dismutase da PrP^C wt e PrP^C del[51-91] foi realizada, utilizando-se os parâmetros encontrados na fase adaptação do sistema de geração (O_2^-); entretanto, um ensaio com Sod1 como descrito anteriormente era realizado antes do início dos ensaios com a PrP^C wt e PrP^C del[51-91], para que a integridade das soluções pudesse ser verificada.

A metodologia utilizada foi à mesma utilizada para a obtenção dos parâmetros, entretanto a adição de Sod1, foi substituída por BSA, PrP^C wt e PrP^C del[51-91] para avaliação dos seus potenciais de dismutação do radical O_2^- gerado no sistema X/XO.

Com o intuito de retirar íons cobre (II) complexados às proteínas BSA, PrP^C wt e PrP^C del[51-91], os procedimentos descritos a seguir foram realizados, baseados no método sugerido por Shiraishi, 2005.

O procedimento é composto por duas etapas: incubação e diálise.

Incubação: As proteínas BSA, PrP^C wt e PrP^C del[51-91] foram incubadas na presença de CuSO_4 e uréia por 30 minutos a 37 °C, esta etapa visa promover a desnaturação da proteína na presença dos íons cobre (II).

Diálise: Após incubação as mesmas foram submetidas à diálise primeiramente em solução de CuSO_4 por 18h a 4 °C, para remover a uréia promovendo assim a reestruturação das proteínas BSA, PrP^C wt e PrP^C del[51-91]. Seguido de diálise em

solução de tampão fosfato, pH 7,5 e DTPA por 18h a 4 °C, para remover os íons cobre (II) livre.

Para verificar a presença de íons cobre (II) o método complexométrico em 500 nm foi utilizado nas proteínas BSA, PrP^C wt e PrP^C del[51-91]. As proteínas foram adicionadas à tampão borato + guanidina com posterior adição de PAR e EDTA. A medida foi feita realizando a diferença de absorbância entre a adição de PAR e EDTA.

3.2.2 Tratamento de células de astrócitos nocautes (Wko) para PrP^C e células de astrócitos normais (Wwt) com sistemas oxidantes e verificação de geração de ROS por sonda

Após obtenção dos resultados para as proteínas PrP^C wt e PrP^C del[51-91] em vitro, um ensaio em vivo foi realizado. Células de astrócitos nocautes (Wko) para PrP^C, ou seja, carentes de proteína príon celular e células de astrócitos normais (Wwt) foram cultivadas e submetidas a diferentes tratamentos, com Cu(II), H₂O₂ e superóxido (O₂^{•-}) gerado através do sistema X/XO.

Para avaliar a produção de ROS nas células após os tratamentos, um método espectrofluorimétrico para quantificação com a sonda DCFDA foi utilizado, tais procedimentos são descritos a seguir:

As células de astrócitos Wko e Wwt foram obtidas através de linhagens selecionadas de camundongos (no Instituto Ludwig de Pesquisa Contra o Câncer, em São Paulo, SP) e cultivadas em estufa 37°C com meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) complementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) sob condições de esterilidade. Depois 2x10⁴ células/cm² foram plaqueadas em placas de 96 poços e levadas para estufa a 37 °C por 24 horas, então o meio foi trocado pelos tratamentos com Cu(II), H₂O₂ e superóxido (O₂^{•-}) em diferentes concentrações e esperou-se pelo tempo necessário. Ao atingir o tempo necessário, o tratamento foi retirado e lavou-se 3 vezes com tampão fosfato salino (PBS) as placas receberam a sonda DCFDA 50 µM diluída em PBS (cuja solução estoque foi preparada em acetonitrila) e retornaram para a estufa a 37 °C por 30 minutos, então removeu-se a sonda DCFDA, lavou-se 3 vezes com

tampão fosfato salino (PBS) e realizou-se a leitura no fluorímetro. Parâmetros: excitação 490 nm, emissão 525 nm.

4. Resultados e Discussão

O ensaio para retirada dos íons de cobre (II) das proteínas BSA, PrP^C wt e PrP^C del[51-91] foi realizado duas vezes, uma com o quelante DTPA e outra sem o quelante.

Seguiu-se com a realização do ensaio por método complexométrico em 500nm para determinar se o cobre (II) havia sido retirado das proteínas BSA, PrP^C wt e PrP^C del[51-91], tal ensaio é mostrado na figura 1.

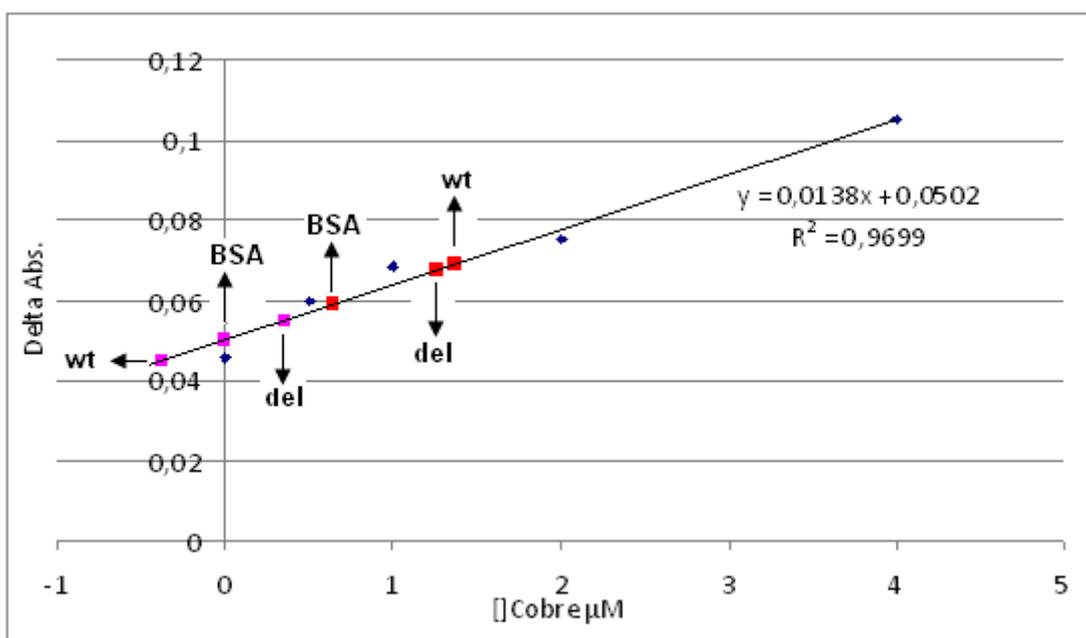


Figura 1: Curva de Calibração para quantificação de Cu²⁺ por método complexométrico. Ensaio para retirada de íons cobre (II) com quelante DTPA. Em uréia 6 M para um volume final de 1 mL, 2μM de proteína com CuSO₄ 10 μM foram incubados a 37 °C por 30 minutos; então submetidas a dois processos de diálise, primeiro em solução de CuSO₄ 10 μM por 18 horas a 4 °C, depois em tampão fosfato 5 mM pH 7,5 com DTPA 250 μM por 18 horas a 4 °C. Proteínas BSA, PrP^C wt e PrP^C del[51-91] após ensaio de retirada do cobre ■, e as mesmas proteínas sem receber o tratamento para a retirada dos íons cobre (II) ■

Os resultados demonstraram que houve a retirada dos íons cobre (II) das proteínas BSA, PrP^C wt e PrP^C del[51-91], uma vez que as não tratadas apresentam os íons cobre normais da proteína PrP^C wt e PrP^C del[51-91] (embora não possamos saber quantos são exatamente pois muitos não podem ser retirados por métodos pouco agressivos a proteína) e as que receberam o tratamento para retirada de íons cobre (II) apresentam menos íons cobre por unidade de proteína PrP^C wt e PrP^C del[51-91], comparativamente.

Um ensaio para verificar a atividade superóxido dismutase foi realizado. Entretanto algumas alterações foram feitas ao método utilizado em ensaios anteriores. Tais alterações são descritas a seguir:

Todos os reagentes foram adicionados, sendo a xantina adicionada por último seguida de varredura de 540 nm à 560 nm em espectrofotômetro, uma vez que a máxima absorção ocorre em 550 nm, a variação para esses valores obtidos, foi calculada realizando-se a diferença entre os tempos $t=1$ e $t=0$, resultando na variação de absorbância, chamado nos eixos das abscissas dos gráficos de “deltas de absorbância” que são os parâmetros utilizados na comparação entre as proteínas.

Para as proteínas ensaiadas com DTPA, BSA, PrP^C wt e PrP^C del[51-91] para retirada de íons cobre (II) e não tratadas, os parâmetros são os mesmos utilizados para o ensaio com a Sod1, apenas substituindo a Sod1 pelas respectivas proteínas.

Os resultados encontrados são mostrados nos gráficos 1 e 2. Todos os ensaios foram realizados em quintuplicata.

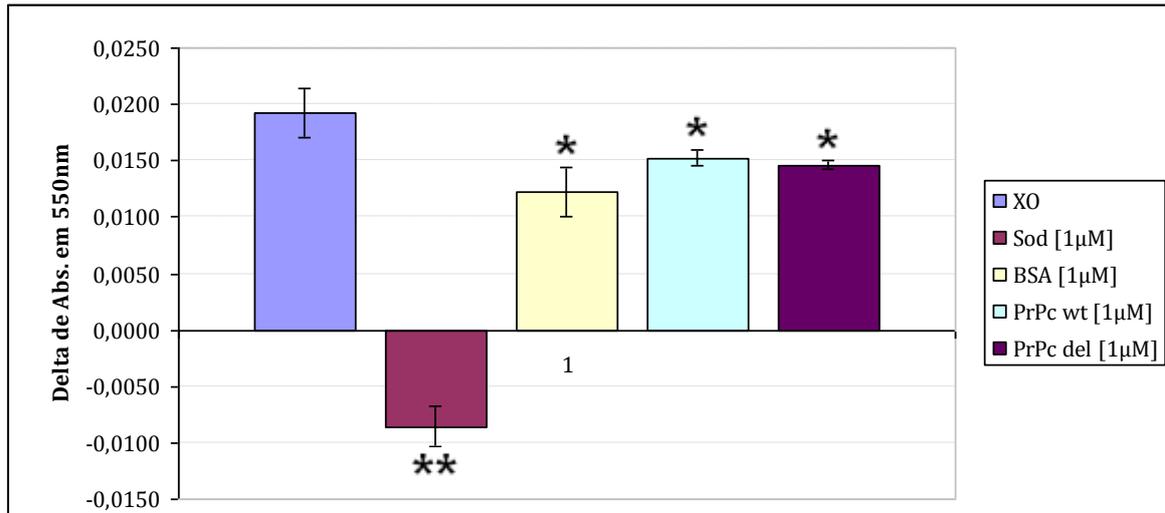


Gráfico 1: Ensaio de atividade superóxido dismutase referente às proteínas BSA (controle negativo), SOD (controle positivo), PrP^C wt e PrP^C del[51-91] sem tratamento para a retirada dos íons cobre(II). Delta de Abs. em 550 nm = absorvância do Citc Fe²⁺ gerado pelo consumo de O₂⁻. O superóxido (O₂⁻) gerado no sistema Xantina/Xantina Oxidase reduz o Fe³⁺ do Citocromo C à Fe²⁺. O ensaio foi feito em 1 mL de mistura reacional contendo tampão fosfato 50 mM pH 7,8 com EDTA 87 µM, ferricitocromo c 10 µM, Xantina Oxidase 1,8 µM e 5 µL de uma solução saturada de xantina com a mesma em suspensão, devido a sua baixa solubilidade em água. Para o ensaio na presença das proteínas SOD, BSA, PrP^C wt e PrP^C del[51-91], as mesmas condições citadas acima foram seguidas com o acréscimo das respectivas proteínas na concentração de 25 nM. Temperatura ambiente 22 °C. Barras de erros e teste ANOVA (n= 5), p = * <0,05 até 0,001; ** <0,001

O gráfico 1 reforça os resultados apresentado na segunda etapa do projeto, de que as proteínas BSA, PrP^C wt e PrP^C del[51-91] apresentam atividade superóxido dismutase que é inerente a qualquer proteína.

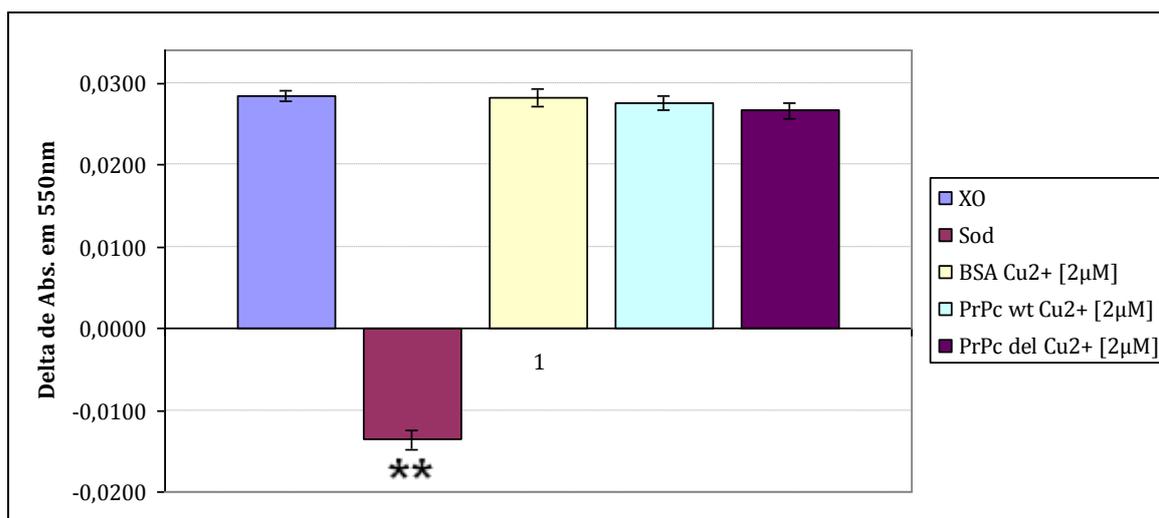


Gráfico 2: Ensaio com o quelante DTPA - Ensaio de atividade superóxido dismutase referente às proteínas BSA (controle negativo), SOD (controle positivo), PrP^C wt e PrP^C del[51-91] após tratamento para retirada do cobre, onde se obteve a retirada do metal. Delta de Abs. em 550 nm = absorvância do Citc Fe²⁺ gerado pelo consumo de O₂⁻. O superóxido (O₂⁻) gerado no sistema Xantina/Xantina Oxidase reduz o Fe³⁺ do Citocromo C à Fe²⁺. O ensaio foi feito em 1 mL de mistura reacional contendo tampão fosfato 50 mM pH 7,8 com EDTA 87 µM, ferricitocromo c 10 µM, Xantina Oxidase 1,8 µM e 5 µL de uma solução saturada de xantina com a mesma em suspensão, devido a sua baixa solubilidade em água. Para o ensaio na presença das proteínas SOD, BSA, PrP^C wt e PrP^C del[51-91], as mesmas condições citadas acima foram seguidas com o acréscimo das respectivas proteínas na concentração de 25 nM. Temperatura ambiente 22 °C. Barras de erros e teste ANOVA (n= 5), p = * <0,05 até 0,001; ** <0,001

Entretanto o gráfico 2 mostra que a atividade superóxido dismutase para as proteínas BSA (controle negativo), PrP^C wt e PrP^C del[51-91] submetidas ao tratamento para retirada do cobre é praticamente nula; uma vez que o cobre não está mais presente nas proteínas PrP^C wt e PrP^C del[51-91] e a atividade superóxido dismutase foi praticamente zero, pois apresenta o mesmo valor de quando o sistema possui somente X/XO, isso mostra que a complexação de íons cobre (II) a estas proteínas realmente é um fator possui grande importância.

Outro ensaio foi realizado para retirada de íons cobre (II) das proteínas BSA, PrP^C wt e PrP^C del[51-91], para verificar se o cobre seria retirado das proteínas se o tratamento não utilizasse o quelante DTPA, como já descrito anteriormente, eliminando apenas o quelante DTPA do procedimento, após realização do ensaio sem DTPA a etapa para a quantificação de íons cobre (II) complexados a estas proteínas foi realizada, observou-se

novamente a retirada dos íons cobre (II) das proteínas BSA, PrP^C wt e PrP^C del[51-91]. Entretanto um dado relevante foi obtido e é mostrada na figura 2. O tratamento das proteínas nestas condições mais brandas, uma vez que o DTPA não é utilizado, demonstra que o íon cobre (II) está mais fortemente ligado à PrP^C wt, resultado condizente com a literatura uma vez que a PrP^C del[51-91] possui deleção justamente na região no qual ocorre a coordenação do cobre preferencialmente, esta região não estando presente, é de se esperar que caso hajam íons cobre (II) coordenados a esta, os mesmos estejam mais fracamente ligado. Fato que é observado na figura 2, pois para a PrP^C wt o íon cobre (II) manteve-se complexado, já na PrP^C del[51-91] o íon cobre (II) foi retirado.

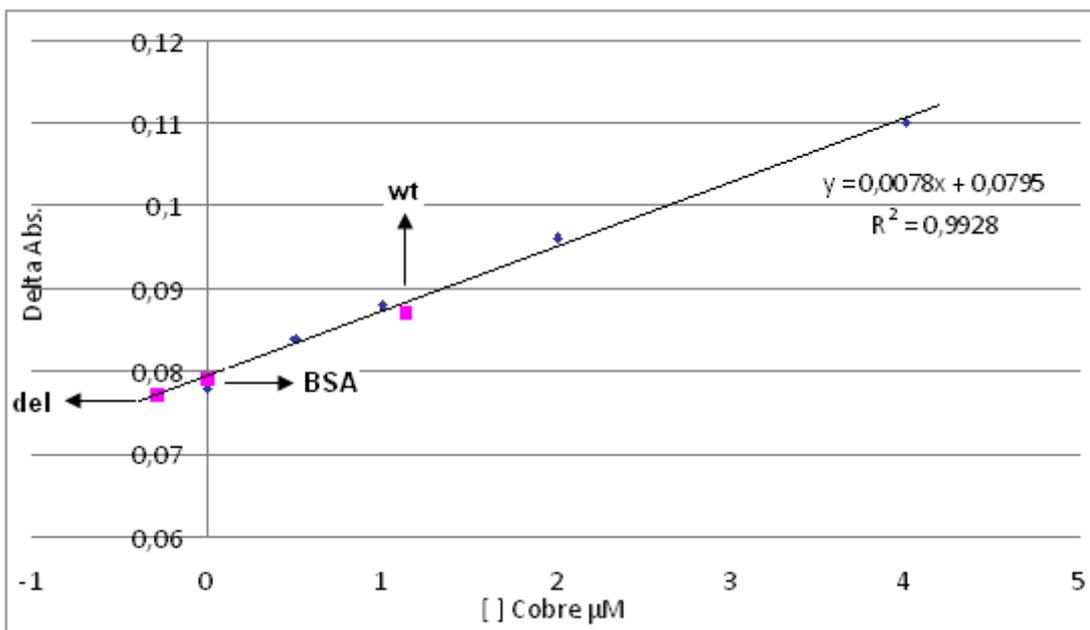


Figura 2: Curva de Calibração para quantificação de Cu²⁺. Proteínas BSA, PrP^C wt e PrP^C del[51-91] submetidas ao tratamento sem quelante para retirada dos íons cobre (II). Em uréia 6 M para um volume final de 1 mL, 2µM de proteína com CuSO₄ 10 µM foram incubados a 37 °C por 24 horas; então submetidas a dois processos de diálise, primeiro em solução de CuSO₄ 10 µM por 12 horas a 4 °C, sendo esta solução trocada 1 vez por CuSO₄ 10 µM e mantida por mais 12 horas a 4 °C; depois em tampão fosfato 5 mM pH 7,5 por 18 horas a 4 °C, sendo esta solução trocada 3 vezes por tampão fosfato 5 mM pH 7,5 e mantida por mais 18 horas a 4 °C até a próxima troca, totalizando nesta segunda diálise 72 horas.

Para complementar os resultados obtidos *in vitro*, foram feitos ensaios em astrócitos obtidos de camundongos, expressando ou não PrP^C (chamados aqui de Wwt ou Wko, respectivamente). Nos ensaios com as células Wko e Wwt, os tempos escolhidos para os tratamentos gerando oxidação e estresse oxidativo, foram 3h, 6h e 24h, os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados obtidos são mostrados no gráfico 3.

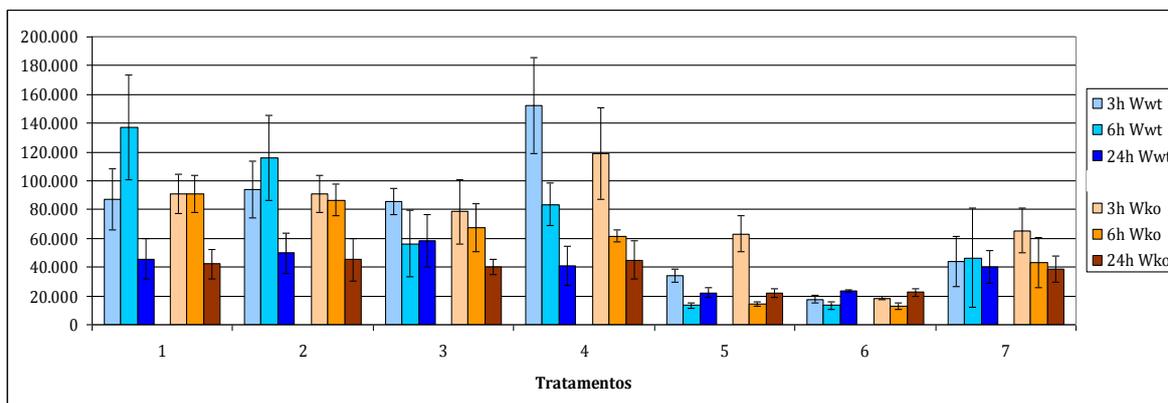


Gráfico 3: Células Wwt e Wko após receberem os seguintes tratamentos: 1- célula e sonda DCFDA; 2- célula, sonda DCFDA e cobre 10 μ M; 3- célula, sonda DCFDA e cobre 50 μ M; 4- célula, sonda DCFDA e cobre 200 μ M; 5- célula, sonda DCFDA e peróxido de hidrogênio 3mM; 6- célula, sonda DCFDA e peróxido de hidrogênio 20mM; 7- célula, sonda DCFDA e superóxido (O₂⁻) gerado pelo sistema Xantina/Xantina Oxidase. As células foram cultivadas em estufa 37 °C, após receberem os respectivos tratamentos esperou-se o tempo necessário, retirou-se o tratamento, lavou-se 3 vezes com PBS, estas receberam a sonda DCFDA 50 μ M e retornaram à estufa 37 °C por 30 minutos, então retirou-se a sonda DCFDA, lavou-se 3 vezes com PBS e realizou-se a leitura no fluorímetro. Excitação 490 nm e Emissão 525 nm. O eixo Y refere-se à quantidade de fluorescência em unidades absolutas medida, na mesma condição, para todos os ensaios.

Várias considerações podem ser feitas acerca dos resultados apresentados no gráfico 3, sendo elas divididas em três grupos para uma melhor compreensão: Controle gráfico 4, na presença de Cobre gráfico 5 e na presença de Tratamentos Oxidantes gráfico 6.

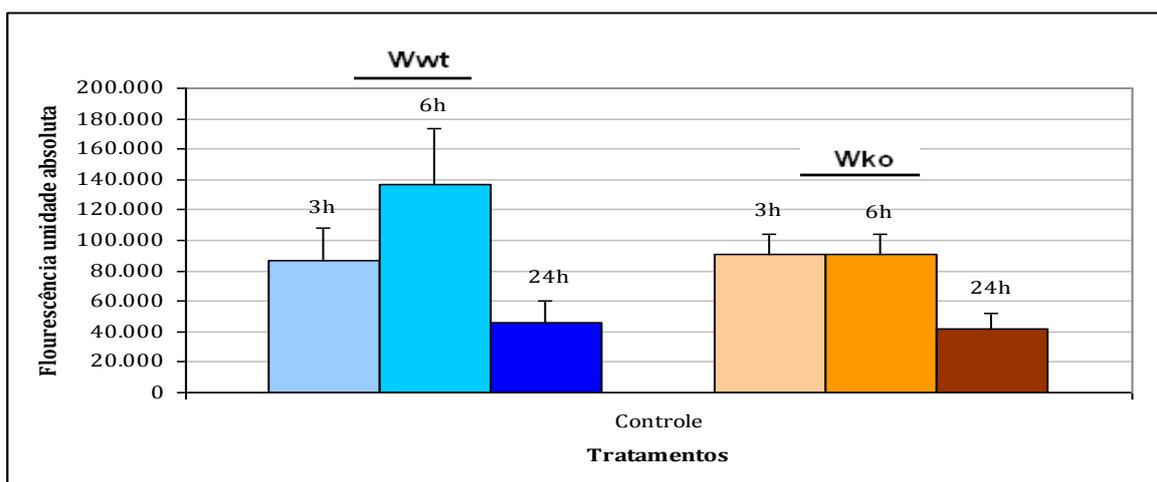


Gráfico 4: Células Wwt e Wko controle.

Embora a célula Wwt e a célula Wko pareçam possuir a mesma produção de ROS uma vez que em 3h e 24h praticamente não há diferença, como mostrado no controle. A presença da PrP^C no astrócito, parece ser essencial para o aumento da fluorescência da DCFDA e conseqüente aumento de ROS naturalmente, visto que em 6h tal aumento de população só é observado nas células de astrócitos Wwt.

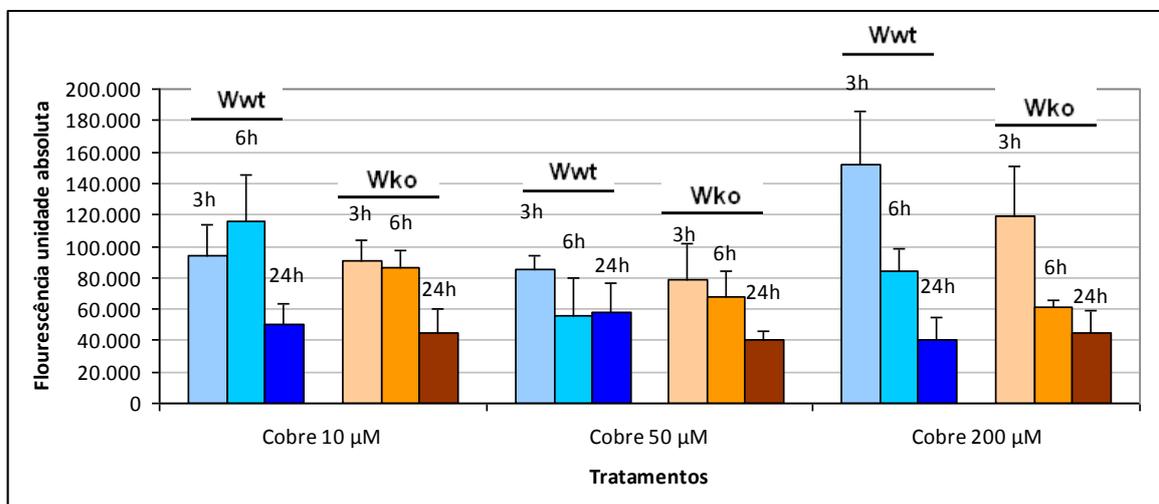


Gráfico 5: Células Wwt e Wko após receberem os tratamentos com cobre.

Quando as células são expostas a concentrações crescentes de cobre, temos no tratamento com cobre 200 µM, um notável aumento de fluorescência da sonda DCFDA no início, porém após tempo de exposição uma possível “atividade SOD-like” surge na célula em altas concentrações de cobre, dada a diminuição da fluorescência, verificada

no decréscimo ocorrido em 3h, 6h e 24h. Estes também podem ser observados nos tratamentos com cobre 10 μM e 50 μM , porém mais discretamente.

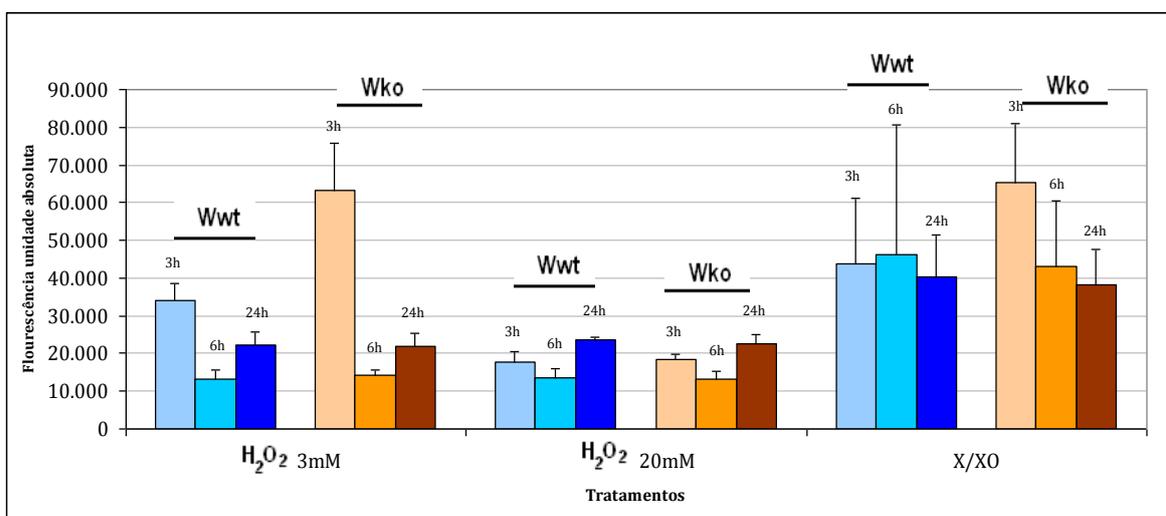


Gráfico 6: Células Wwt e Wko após receberem os tratamentos oxidantes.

Quando submetidas ao estresse oxidativo, tratamentos com peróxido de hidrogênio 3 mM e superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) gerado pelo sistema Xantina/Xantina Oxidase, a Wwt parece possuir uma “atividade SOD-like” maior do que o astrócito nocaute Wko. No tratamento com peróxido de hidrogênio 20 mM, mostrou que só o H_2O_2 não foi suficiente para causar ROS em alta concentração, pois em baixa concentração (peróxido de hidrogênio 3 mM), houve a detecção de ROS.

5. Conclusões

A partir dos resultados obtidos, apresentados nos gráfico 1 e 2, conclui-se que a atividade superóxido dismutase *in vitro* para a PrP^C wt e PrP^C del[51-91] isoladas é bastante baixa, visto que ficou muito próximo aos valores obtidos para a BSA, que serviu como o controle negativo do ensaio.

Além disso, como citado na introdução, é sabido que na presença do íon cobre estas proteínas (PrP^C wt, PrP^C del[51-91] e BSA), podem apresentar atividade superóxido dismutase. Entretanto esta condição foi parcialmente verificada, os resultados demonstram que o cobre influencia a atividade superóxido dismutase, uma vez que sua ausência nas proteínas (PrP^C wt, PrP^C del[51-91] e BSA), gerou uma diminuição significativa nesta atividade..

Um ensaio parecido, realizado por BROWN 1999, apresentou resultados aparentemente divergentes, uma vez que seu ensaio não utiliza como padrão negativo uma proteína qualquer, e sim a PrP^C e a PrP^C del [51-91] com a retirada do íon Cu²⁺ da proteína, que também utilizamos e verificamos que sua atividade é praticamente nula quando comparada à BSA, padrão negativo do ensaio. Outro fator é a concentração de proteína utilizada no ensaio, no caso, analisado somente até 10 µg/mL com tendência crescente pelo comportamento do gráfico apresentado, mas, mostrando que a PrP^C wt tem atividade superóxido dismutase um pouco maior que a atividade apresentada pela PrP^C del [51-90].

Assim, se extrapolarmos os valores obtidos por BROWN 1999, para as concentração das proteína PrP^C wt e a PrP^C del [51-91] utilizada neste projeto que é 27 µg/mL, pode-se inferir que, se esses resultados seguirem a tendência linear que apresentam, provavelmente atingiriam valores próximos aos obtidos neste projeto, entretanto, vale lembrar que neste projeto a análise se deu para a PrP^C wt e a PrP^C del [51-91], na forma como foram obtidas na expressão heteróloga bacteriana. Os ensaios tiveram um controle negativo, que foi a BSA, e um positivo, a própria Sod1, assim concluiu-se que a atividade apresentada por estas proteínas é praticamente nula, uma vez que a BSA (uma proteína que também complexa íons cobre(II)), apresentou praticamente a mesma atividade. Conclusão esta, que BROWN 1999 não obteve, uma vez que afirma que há uma atividade relativamente alta, para as proteínas em questão, provavelmente por não ter escolhido o padrão negativo e positivo mais adequado ao ensaio. É importante ressaltar que essas comparações são realizadas para parte dos ensaios de BROWN 1999, uma vez que a atividade da PrP^C wt e da PrP^C del [51-91] não foram avaliadas na presença do íon Cu²⁺, e sim na ausência.

Um ensaio realizado por JONES 2005, utilizando condições e proteínas diferentes das utilizadas neste projeto, mostram uma tendência sobre a atividade superóxido dismutase para várias proteínas, e demonstram que a atividade apresentada pela PrP^C é bastante baixa e inerente a praticamente qualquer proteína.

Observação parcialmente verificada neste projeto, uma vez que se demonstra que a atividade da BSA, PrP^C wt e PrP^C del [51-91] é praticamente a mesma.

Nos ensaios *in vivo* percebeu-se que aparentemente a PrP^C tem um importante papel na produção de ROS, visto que houve uma diferença significativa na produção de ROS das células de astrócitos Wwt e Wko. A célula Wwt teve um aumento de fluorescência, conseqüentemente aumento de ROS maior do que a célula Wko em praticamente todos os tratamentos oxidantes e naturalmente, sem nenhum tratamento.

O cobre nesse estudo pode não ser totalmente compreendido, pois inicialmente parece contribuir para a produção de ROS uma vez que apresentou índices iguais ou maiores que o da população não tratada com cobre em 3h, porém, após 6h o decréscimo na fluorescência apresentou índices menores que os da população não tratada com cobre, indicando assim uma possível “atividade SOD-like” na célula, após certo tempo de exposição ao cobre(II), sendo aparentemente a “atividade SOD-like” da Wko um pouco mais efetiva na “eliminação” de ROS.

Apesar de diferentes, os estudos celulares não colaboraram para reforçar os resultados obtidos *in vitro*, de que a PrP^C não possui atividade antioxidante.

6. Bibliografia

- Aguzzi A, Polymenidou M, *Cell* **2004**, *116*, 313.
- Brown DR, Clive C, Haswell SJ, *J. Neurochem.* **2001**, *76*, 69.
- Brown DR, Schmidt B, Kretschmar HA, *J. Neurochem.* **1998**, *70*, 1686.
- Brown DR, Wong BS, Hafiz F, Clive C, Haswell SJ, Jones IM, *Biochem. J.* **1999**, *344*, 1.
- Choi YG, Kim JI, Lee HP, Jin JK, Choi EK, Carp RI, Kim YS, *Neurosci. Lett.* **2000**, *289*, 173.
- Gaggelli E, Kozlowski H, Valensin D, Valensin G, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1995. e referências citadas.
- Jones S, Batchelor M, Bhelt D, Clarke AR, Collinge J, Jackson GS, *Biochem. J.* **2005**, *392*, 309.
- Lee DW, Sohn HO, Lim HB, Lee YG, Kim YS, Carp RI, Wisniewski HM, *Free Rad. Res.* **1999**, *30*, 499.
- Martins VR, Mercadante AF, Cabral ALB, Freitas ARO, Castro RMRPS, *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2001**, *34*, 585.
- McCord JM, Fridovich I, *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 6049.

- Miura T, Sasaki S, Toyama A, Takeuchi H, *Biochemistry* **2005**, *44*, 8712.
- Ross ED, Milton A, Wickner RB, *Nature Cell Biol.* **2005**, *7(11)*, 1039; e referencias citadas.
- Ruiz FH, Silva E, Inestrosa NC, *Biochem. Bioph. Res. Comm.* **2000**, *269*, 491.
- Shiraishi N, Ohta Y, Nishikimi M, *Biochem. Bioph. Res. Comm.* **2000**, *267*, 398.
- Shiraishi N, Inai Y, Bi W and Nishikimi M, *Biochem. J.* **2005**, *387*, 247.
- Stadtman ER, *Free Radic Biol Med.* **2000**, *33(5)*, 597.
- Tambull S, Tabner BJ, Brown DR, Allsop D, *Neurosc. Lett.* **2003**, *336*, 159.
- Taylor JP, Hardy J, Fischbeck KH, *Science* **2002**, *296*, 1991.
- Weissmann C, *Cell* **2005**, *122*, 165.
- Wong BS, Pan T, Liu T, Li R, Petersen RB, Jones IM, Gambetti P, Brown DR, *Biochem. Bioph. Res. Comm.* **2000**, *275*, 249.