

13ª Mostra da Produção Universitária

Rio Grande/RS, Brasil, 14 a 17 de outubro de 2014.

PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICA PARA DOSAGEM DE PROTEÍNAS GLUTATIONILADAS

**ARTIGAS FLORES, Juliana
MONSERRAT, José Maria
juliana_artigas@hotmail.com**

**Evento: 13ª Mostra de Produção Universitária
Área do conhecimento: Biologia Bioquímica**

Palavras-chave: estresse oxidativo, glutationilação, proteínas oxidadas

1 INTRODUÇÃO

Diversos fatores exógenos e endógenos podem gerar estresse oxidativo, caracterizado como um excesso de espécies reativas de oxigênio (ou nitrogênio), com potencialidade de gerar dano em biomoléculas e alterar processos de sinalização celular (JONES, 2006). Dentre os danos oxidativo, podemos citar o dano proteico, incluindo o processo de glutationilação (HALLIWELL;GUTTERIDGE, 2007).

Este dano oxidativo surge de várias formas, incluindo pela interação de um produto de oxidação, dissulfeto de glutathione (GSSG) com grupos sulfidrilas de proteínas. A glutationilação das proteínas representa um evento de oxidação transitório destas moléculas, favorecido por um ambiente redox pró-oxidante. Acredita-se que a glutationilação possa também regular as atividades de diferentes enzimas como acontece com a fosforilação (DALLE-DONNE, 2007).

O presente trabalho tem como objetivo padronizar uma nova técnica de dosagem de proteínas glutationiladas. A padronização desta técnica será efetuada em soluções contendo dissulfeto de glutathione, avaliando a liberação de glutathione reduzida (GSH) através de técnicas fluorimétricas. A otimização desta técnica permitirá sua aplicação em diversas áreas que estudem estresse oxidativo e tenham como objetivo avaliar o impacto de dano oxidativo proteico.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Como referencial teórico podemos citar os trabalhos desenvolvidos por White et.al (2003) e Wei Chen et. al (2008). White et. al (2003) apresenta uma metodologia que nos permite dosar a atividade da enzima glutathione cisteína ligase e a concentração GSH em amostras. Wei Chen et. al (2008) desenvolveu uma técnica de detecção para os grupos tióis e as pontes dissulfeto. Sendo assim ambos fundamentais para a padronização desta nova técnica – dosagem de proteínas glutationiladas.

3.MATERIAIS E MÉTODOS

Preparação das amostras: As amostras foram preparadas a partir de uma solução contendo 6,1 mg de glutathione oxidada (L-Glutathione oxidized ≥98%, PM: 612.63) e tampão Tris-HCl (100 mM, pH 7.75) com adição de EDTA (2 mM) e Mg²⁺(5mM).

Metodologia: A técnica se baseia em detectar através da fluorescência a

13ª Mostra da Produção Universitária

Rio Grande/RS, Brasil, 14 a 17 de outubro de 2014.

concentração de glutathiona reduzida nas amostras, após aplicação de um agente redutor que irá quebrar as pontes dissulfeto presentes sob uma condição pró-oxidante. Para a estruturação desta metodologia foram extraídas técnicas dos trabalhos de White et al. (2003) e Wei Chen et al. (2008).

Análises estatística: os resultados obtidos nas diferentes dosagens foram analisados através dos testes de regressão linear e análise de variância. Foi utilizado um nível de significação de 5%.

4 RESULTADOS e DISCUSSÃO

Os resultados parciais sugerem que ambos os agentes utilizados (NaBH₄ e DTT) apresentam grande poder de redução, podendo induzir assim o processo de deglutationilação (remoção da GSH das proteínas glutathioniladas). As amostras oxidadas foram incubadas em três diferentes tempos: 30 min, 60 min e 120 min. Os melhores resultados foram encontrados em 30 minutos. Porém, problemas com relação a alta fluorescência dos agentes redutores nos brancos e nas amostras foram constatados. Ambos os agentes redutores apresentam alta fluorescência, podendo assim gerar resultados falso-positivo. Atualmente estão se avaliando diferentes diluições de ambos os agentes redutores para diminuir a fluorescências dos brancos e assim conseguir resultados positivos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o intuito aprimorar a técnica serão testadas diferentes diluições de ambos os agentes redutores. Analisando seus comportamentos no que diz respeito do seu potencial redutor em amostras oxidadas e sua fluorescência. Buscando um agente redutor que melhor se adéque a técnica conseguiremos padronizar a mesma com mais precisão e analisar então como e se ocorre m.

Como uma possibilidade futura, pretendemos utilizar o protocolo padronizado para analisar amostras de músculo do peixe *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) submetidos a dietas antioxidantes.

REFERÊNCIAS

- JONES, D. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, v 8, N 9-10,1865-1879, Setembro 2006.
- DALLE-DONNE, I. S-glutathionylation in protein redox regulation. *Free Radic Biol Med*, 43: 883-898, Setembro 2007.
- WHITE, C; VIERNES, H; KREYSA, C; BOTTA, D; KAVANAGH, T. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate-cysteine ligase activity. *Anal. Biochem*, Seattle, v: 318, 175-180, Maio 2002.
- WEI, C; YONG, Z; TERESA, S; XIANGMING G. Determination of thiols and disulfides via HPLC quantification of 5-thio-2-nitrobenzoic acid. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Brookings; 48, 1375–1380, Setembro. 2008.
- HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th ed., Oxford University Press: Oxford, 2007.