

ASPECTOS ESTRUTURAIS E MOLECULARES DO COLÁGENO OXIDADO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E SEU EFEITO NA ADESÃO PLAQUETÁRIA

Palavras-Chave: COLÁGENO, OXIDAÇÃO, ETRESSE OXIDATIVO

Autores(as):

BEATRIZ SCARDUA DA SILVA, FCF-UNICAMP

FELIPE CALIANI MATHIAS NETTO, FCM-UNICAMP

MAYARA GRAZIELLY BRITO ROCIO, FCF-UNICAMP

TATIANA ALVES TOLEDO, FCM-UNICAMP

Prof. Dr. RENATO SIMÕES GASPAR, FCM-UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) é uma importante resposta fisiológica, resultado de inúmeros estímulos, como por exemplo acidentes cardiovasculares. Apesar da sua importância, esse processo tem como uma consequência a oxidação de proteínas o que pode levar a alterações estruturais e funcionais das mesmas. Visto isso, uma das proteínas presentes na matriz extracelular do tecido cardiovascular, é o colágeno do tipo I, o qual além de ser uma proteína de longa meia-vida também é um agonista plaquetário. Sendo assim, a sua oxidação pode interferir de alguma maneira na cascata de ativação plaquetária, o que influenciaria na formação de trombos, podendo levar ao desenvolvimento de respostas tromboembólicas. Para elucidar nossa hipótese, foram utilizados protocolos de fibrilogênese, SDS-page e adesão plaquetária.

METODOLOGIA:

Nos ensaios de fibrilogênese o objetivo foi observar se a oxidação alteraria de algum modo a interação entre as moléculas de colágeno para formar seus agregados. Dessa forma, a análise consistiu em preparar alíquotas de colágeno (100 μ g/mL) de rato separando-as em condições controle (não oxidado) e oxidado com crescentes proporções molares de peróxido de hidrogênio (colágeno:H₂O₂ 1:100, 1:300, 1:1000, 1:3000 e 1:10000), em todas as condições as alíquotas foram incubadas overnight. Em seguida, foram pipetados cerca de 200 μ L de cada amostra em triplicata, em uma placa de 96 poços que foi levada ao leitor de placa onde foi medida a absorbância a 400 nm durante uma hora com medições minuto a minuto. A partir das curvas de absorbância por tempo, também foram observados os valores de slope de cada amostra que correspondem à velocidade da formação das redes de colágeno.

Para o SDS-page, as alíquotas seguiram as mesmas condições já citadas. Após a incubação adicionou-se um tampão redutor e elas foram aquecidas a 90°C por 20 minutos para desnaturação da proteína. Em seguida, 20 μ L de cada condição foram colocados nos poços de um gel de acrilamida 7%, a eletroforese correu por cerca de três horas a frio e a revelação foi feita com nitrato de prata.

Na adesão plaquetária, o objetivo foi de expor as plaquetas a condições com colágeno controle e oxidado, na presença de antagonistas plaquetários, de forma que pudéssemos observar se a oxidação da proteína gera alguma mudança na ação desses compostos. Para isso, foi utilizada uma placa de 24 poços com tampa, onde foi feita uma camada de colágeno a partir de amostras de colágeno controle

(100ug/mL) e de colágeno oxidado (100ug/mL) com proporções colágeno:H₂O₂ 1:150 e 1:3000. Então pipetou-se 30uL de cada amostra em seus respectivos poços cobrindo as porções com lamínulas. O conjunto permaneceu incubado por uma hora a 37°C em câmara úmida. Para a obtenção das plaquetas, foram coletados 10mL de sangue de voluntários saudáveis. Após a centrifugação, o plasma rico em plaquetas (PRP) foi separado do agregado de hemácias. Então o PRP foi incubado por 10 minutos a 37°C sob as condições controle (sem antagonista) e com os antagonistas AAS, FAK e SSO em três concentrações crescentes cada. Em seguida as lamínulas cobertas de colágeno foram lavadas e incubadas com o PRP tratado por 45 minutos a 37°C. Em seguida as lamínulas foram lavadas, as plaquetas fixadas com PFA 1%, lavadas novamente e tratadas com Triton 0,1%. Por fim, as amostras foram coradas com faloidina conjugada com Alexa488. Para a sua análise foram tiradas cinco fotos de regiões aleatórias de cada lamínula, e calculou-se a média do percentual da área ocupada pelas plaquetas, o número de plaquetas e o percentual da área por plaqueta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Foram observados os seguintes resultados:

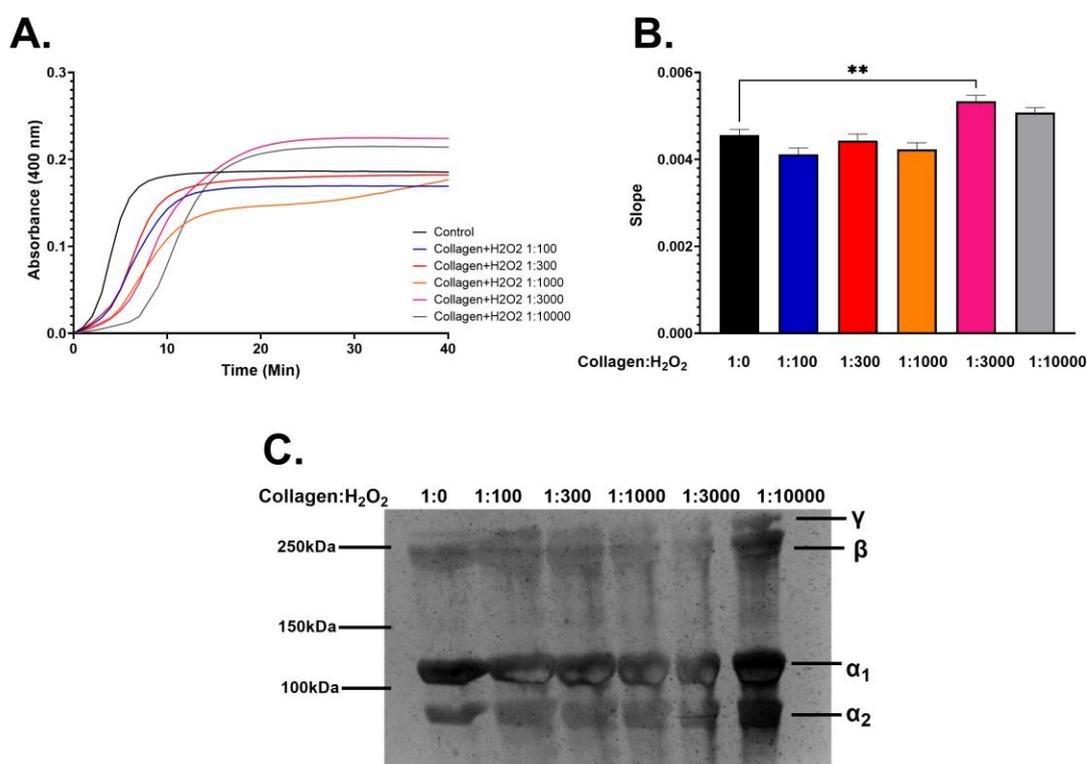


Figura 1: Comparativo das curvas de cada condição do colágeno no ensaio de fibrilogênese. B: Comparação dos valores de slope correspondentes a curva de cada condição, indicando qual estado de oxidação apresentou diferença estatística (**) em comparação a condição controle. C: Gel da corrida por SDS-page revelado com nitrato de prata. Corrida feita a frio num período de três horas.

Como observado na figura 1A, na fibrilogênese, as menores proporções de peróxido de hidrogênio (1:100, 1:300 e 1:1000) não demonstraram influência na deposição das redes de colágeno em comparação a curva do grupo controle, já as curvas das maiores concentrações (1:3000 e 1:10000) aparentaram ter uma absorbância final maior que o controle. Dessa forma, as moléculas poderiam estar mais volumosas devido a alguma mudança conformacional ou ficaram mais aglomeradas entre si resultando nessa maior deposição de colágeno. Como apresentado na figura 1B, o slope, que corresponde à velocidade em que a absorbância aumenta, a única proporção que apresentou diferença estatística foi a de 1:3000. Essas informações sugerem que a oxidação promove maior interação entre as moléculas fazendo com que elas formem mais agregados de maneira mais rápida. Visto isso, no resultado de SDS-page observamos que em comparação ao controle (1:0) as amostras de 1:100 até

1:3000 não apresentam diferença clara, porém na concentração de 1:10000 é possível perceber que as bandas de 100kDa e 150kDa ficam mais coradas e há presença de marcas de arraste que são características da degradação de proteínas. Isto indica que a oxidação promove alterações que podem degradar e/ou agrupar as hélices da molécula de colágeno. Quanto à adesão plaquetária, foram observados que a área percentual ocupada por plaquetas tende a ser maior nas amostras com colágeno oxidado em comparação ao controle apesar do número de plaquetas observadas ser mais flutuante entre os N's experimentais.

CONCLUSÕES:

A partir dos resultados analisados, pudemos concluir que o processo de oxidação por peróxido de hidrogênio modula em certo grau a molécula do colágeno do tipo 1 quando há grandes concentrações de peróxido. As mudanças geram uma maior deposição de redes de colágeno assim como há alterações no seu peso molecular e indícios de degradação na molécula. Em relação à sua influência na adesão plaquetária, os resultados preliminares indicam uma tendência de maior adesão em condições com o colágeno oxidado. A partir disso o foco será identificar o tipo de modificação que ocorre e como a estrutura molecular do colágeno se encontra após a oxidação.

BIBLIOGRAFIA

- LIOCHEV SI. **Reactive oxygen species and the free radical theory of aging.** *Free Radical Biology and Medicine* 2013; 60: 1–4.
- PUURUNEN MK, Hwang S, Larson MG, Vasan RS, O'Donnell CJ, Tofler G, Johnson AD. **ADP Platelet Hyperreactivity Predicts Cardiovascular Disease in the FHS (Framingham Heart Study).** *JAHA* 2018; 7: e008522.
- BYE AP, Unsworth AJ, Gibbins JM. **Platelet signaling: a complex interplay between inhibitory and activatory networks.** *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2016; 14: 918–30.
- FATEH-MOGHADAM S, Htun P, Tomandl B, Sander D, Stellos K, Geisler T, Langer H, Walton K, Handschu R, Garlich C, Daniel W, Gawaz M. **Hyperresponsiveness of platelets in ischemic stroke.** *Thromb Haemost* 2007; 97: 974–8.
- ZAPP C, Obarska-Kosinska A, Rennekamp B, Kurth M, Hudson DM, Mercadante D, Barayeu U, Dick TP, Denysenkov V, Prisner T, Bennati M, Daday C, Kappl R, Gräter F. **Mechanoradicals in tensed tendon collagen as a source of oxidative stress.** *Nat Commun* 2020; 11: 2315.
- JØRGENSEN SM, Lorentzen LG, Hammer A, Hoefler G, Malle E, Chuang CY, Davies MJ. **The inflammatory oxidant peroxynitrous acid modulates the structure and function of the recombinant human V3 isoform of the extracellular matrix proteoglycan versican.** *Redox Biology* 2023; 64: 102794.
- CHEN W, Smeekens JM, Wu R. **Systematic study of the dynamics and half-lives of newly synthesized proteins in human cells.** *Chem Sci* 2016; 7: 1393–400.
- GASPAR RS, da Silva SA, Stapleton J, Fontelles JL de L, Sousa HR, Chagas VT, Alsufyani S, Trostchansky A, Gibbins JM, Paes AM de A. **Myricetin, the Main Flavonoid in Syzygium cumini Leaf, Is a Novel Inhibitor of Platelet Thiol Isomerases PDI and ERp5.** *Front Pharmacol* 2020; 10: 1678.