

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

SANDRA MUNTZ VAZ

Oxidação e Nitração de Proteínas Mediadas por
Peroxinitrito e Peroxidases

Mecanismos, Inibição por Tempol e Implicações Patofisiológicas

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
07/12/2007

SANDRA MUNTZ VAZ

Oxidação e Nitração de Proteínas Mediadas por
Peroxinitrito e Peroxidases
Mecanismos, Inibição por Tempol e Implicações Patofisiológicas

Tese apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para obtenção
do Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)

Orientadora: Profa. Dra. Ohara Augusto

São Paulo

2007

Sandra Muntz Vaz

Oxidação e nitração de proteínas mediadas por peroxinitrito e peroxidases.
Mecanismos, inibição por tempol e implicações patofisiológicas.

Tese apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para obtenção
do Título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

*À Giulinha pelo companheirismo e alegria de vida.
Aos meus pais Sérgio e Obete pelo apoio, carinho e
compreensão sempre presentes.
À vovó Rosa pela direção espiritual e sabedoria.
Ao vô Alberto pela alma química.*

*Ao Danilo pela força, amor, paciência, risos e
choros durante boa parte destes anos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Vida pela oportunidade de aprendizado e força nas situações para evolução pessoal.

À Profa. Ohara Augusto pela orientação, competência, paciência, apoio, disponibilidade e confiança demonstrados no decorrer desses anos de trabalho. Muito obrigada por tudo na fase final da execução deste trabalho. Sem sua paciência e disponibilidade seria impossível...

Aos Professores de outros Laboratórios: Profas. Alícia, Ana Maria, Maria Teresa e Marisa Medeiros e Profs. Paolo Di Mascio e Chuck pela oportunidade para utilização dos recursos dos laboratórios.

Ao Professor Etelvino pelo exemplo de competência científica e emocional mostrada mesmo à distância.

Ao Danilo pelas discussões científicas, disponibilidade, incentivo e companheirismo que permitiram evolução deste trabalho. Especial agradecimento na fase final por toda força e dedicação. Não teria conseguido sem você. Te adoro.

À Edlaine pela amizade, apoio e força de trabalho e pessoal sempre presentes.

À Fernanda Prado e Isaura pela ajuda nos experimentos, análise dos resultados e amizade.

Aos colegas do Laboratório: Edlaine, Renata, Rita, Gisele e Toledo e aos colegas que já não estão mais no lab: Denise, Marcelo, Daniel Trindade e Daniel Rettori pelos frutíferos anos de convivência científica e pessoal.

Aos colegas de outros laboratórios: Camile, Osmar, Eric e Kleber pela ajuda na execução de vários dos experimentos e Agda, Cida, Sayuri, Lívea e Grazi pela convivência sempre agradável.

À Berê pelo suporte no laboratório e pelas profundas discussões para o aprendizado da vida.

À Giulinha pela paciência e compreensão durante todo o tempo e em especial no final. Te amo.

À minha família por todo apoio às minhas decisões de vida hoje e sempre.

À FAPESP pelo apoio financeiro e concessão da bolsa de doutorado.

Mantenha a calma que vai dar tudo certo...!!!

RESUMO

Vaz, S.M. **Oxidação e nitração de proteínas mediadas por peroxinitrito e peroxidases. Mecanismos, inibição por tempol e implicações patofisiológicas.** 2007. (125 páginas). Tese - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Os oxidantes derivados do peroxinitrito e das peroxidases, como mieloperoxidase (MPO), e os danos que ocasionam em proteínas vêm sendo muito estudados pela sua relevância em processos inflamatórios. Neste trabalho, as proteínas RNase e lisozima foram empregadas como alvos de oxidação e nitração mediadas por peroxinitrito e MPO/H₂O₂/NO₂⁻. Experimentos de EPR indicaram que as oxidações envolvem a formação de radicais protéicos sendo que os principais foram caracterizados como RNase-tirosila e lisozima-tirosila exposto e não exposto ao solvente, respectivamente. Estimativas do rendimento de radicais protéicos e produtos nitrados nos pHs 5,4, 6,4 e 7,4 mostrou que o peroxinitrito e o sistema MPO/H₂O₂/NO₂⁻ são oxidantes mais efetivos nos pHs 7,4 e 5,4, respectivamente. Na condição ótima para cada oxidante foram identificados produtos de oxidação/nitração de resíduos de Tyr e Trp por HPLC-UV/MS-ESI. Para localização dos resíduos modificados nas estruturas das proteínas tratadas, elas foram digeridas com tripsina e os peptídeos resultantes submetidos a análise por HPLC/MS-MALDI-ToF. Desses resultados pode-se concluir que a RNase foi nitrada preferencialmente nos fragmentos contendo o(s)resíduo(s) Tyr¹¹⁵ > Tyr^{92/97} > Tyr^{73/76} por peroxinitrito e em praticamente todos os resíduos de tirosina por MPO/H₂O₂/NO₂⁻. No caso da lisozima, o peroxinitrito oxidou principalmente o fragmento contendo os resíduos Trp^{62/63} que se mostrou nitrado e oxidado a dímero e quinurenina. Já o sistema MPO/H₂O₂/NO₂⁻ nitrou o fragmento contendo os resíduos Tyr²³/Trp²⁸ e nitrou e oxidou a dímeros e quinurenina o fragmento contendo os resíduos Trp^{62/63}. A relação entre a acessibilidade dos resíduos específicos nas estruturas terciárias e a formação de produtos de oxidação/nitração são discutidas. Também, a possível importância da oxidação de resíduos de triptofano em agregação de proteínas é enfatizada. Paralelamente, examinou-se os efeitos do nitróxido tempol sobre a nitração da RNase mediada por MPO ou HRP/H₂O₂/NO₂⁻ em condições de máxima nitração. De fato, as interações de tempol com peroxidases eram pouco conhecidas apesar da eficiência do nitróxido em reduzir a injúria e os níveis de 3-nitrotirosina em proteínas de tecidos de animais submetidos a condições inflamatórias. Foram determinadas as constantes de velocidade da reação do tempol com os intermediários oxidantes da MPO e HRP e também, o consumo de reagentes e a formação de produtos. A simulação dos resultados experimentais indicou que o tempol inibe a nitração da RNase mediada por peroxidases principalmente pela sua capacidade de reagir rapidamente com [•]NO₂ com formação de nitrito e cátion oxamônio que, por sua vez, recicla para tempol reagindo com H₂O₂ para produzir O₂.

Palavras-chave: oxidação, nitração, peroxidases, peroxinitrito, tempol

ABSTRACT

Vaz, S.M. **Oxidation and nitration of proteins by peroxynitrite and peroxidases. Mechanisms, tempol inhibition and pathophysiological implications.** 2007. (125 pages.). PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The oxidants derived from peroxynitrite and peroxidase enzymes, such as myeloperoxidase (MPO), and the lesions they promote in proteins are being extensively investigated because of their relevance in inflammatory processes. Here, the proteins RNase and lysozyme were employed as targets of oxidations/nitrations mediated by peroxynitrite and MPO/H₂O₂/NO₂⁻. EPR experiments showed that the oxidations produced protein radicals of which the prominent ones were characterized as RNase-tyrosyl and lysozyme-tyrosil solvent-exposed and non-exposed, respectively. Estimates of protein radical and nitrated product yields at pH 5.4, 6.4 and 7.4 indicated that peroxynitrite and MPO/H₂O₂/NO₂⁻ were more effective oxidants at pH 7.4 and 5.4, respectively. At the best condition for each oxidant, the oxidation/nitration products of Tyr and Trp residues were identified by HPLC-UV/ESI-MS analysis. The site of oxidation in the protein structures were identified by HPLC/MALDI-ToF-MS analysis of tryptic digests after oxidative treatment. From these results, it was concluded that RNase was nitrated mainly in Tyr¹¹⁵ > Tyr^{92/97} > Tyr^{62/63} by peroxynitrite and in all Tyr by MPO/H₂O₂/NO₂⁻. In the case of lysozyme, peroxynitrite modified mainly Trp^{62/63} that resulted nitrated and oxidized to a dimer and kynurenine. The MPO/H₂O₂/NO₂⁻ system promoted the nitration of Tyr²³/Trp²⁸ and nitration and oxidation to dimer and kynurenine of Trp^{62/63}. The relationships between residue accessibility in the structure of the proteins and their oxidation/nitration are discussed. The possible importance of Trp oxidation in protein aggregation is emphasized. In parallel, the effects of the nitroxide tempol upon RNase nitration mediated by MPO or HRP/H₂O₂/NO₂⁻ was examined. Indeed, the interactions of tempol with peroxidases have been little investigated although the nitroxide is very efficient in reducing injury and 3-nitrotyrosine protein levels in tissues of animals submitted to inflammatory conditions. The second order rate constants of tempol reactions with the ferryl oxidants of MPO and HRP were determined. The consumption of reactants and formation of products were also determined. Computer simulation of the results indicated that tempol inhibits RNase nitration mediated by peroxidases mainly because of its capability to rapidly react with •NO₂ with formation of nitrite and the oxammonium cation, which, in turn, recycles back to tempol, by reacting with H₂O₂ to produce O₂.

Keywords: oxidation, nitration, peroxidases, peroxynitrite, tempol

LISTA DE ABREVIATURAS

3-OH-Tyr	3-hidroxitirosina
3-NO ₂ -Tyr	3-nitrotirosina
DBNBS	3,5-dibromo-4-nitrosobenzeno sulfonato
DMPO	5,5-dimetil-pirrolino-N-óxido
EPR	ressonância paramagnética eletrônica
Guaiacol	2-metoxifenol
HPLC	cromatografia líquida de alta performance
HRP	peroxidase de raiz forte
<i>m/z</i>	relação massa/carga
MPO	mieloperoxidase
MPO-I	composto I da MPO
MPO-II	composto II da MPO
MS/ESI	espectrometria de massas com modo de ionização “electrospray” positivo
MS/MALDI-ToF	espectrometria de massas com modo de ionização a laser utilizando matriz com analisador por tempo de voo.
NBT	2,2'-di-p-nitrofenil-5,5'-difetil-3,3'-[3,3'-dimetoxi-4,4'-difenileno]-cloreto ditetrazólio
Peroxinitrito	soma do ânion peroxinitrito (ONOO ⁻ , oxoperoxinitrato (-1)) e ácido peroxinitroso (ONOOH, oxoperoxinitrato de hidrogênio) a menos que especificado
RNase	ribonuclease
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
TCA	ácido tricloroacético
Tempol	4-hidroxi-2,2,6,6,-tetrametilpiperidina-1-oxila
TFA	ácido trifluoroacético
TR	tempo de retenção
Trp	triptofano
Tyr	tirosina

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1. Materiais	30
3.2. Métodos	32
3.2.1 <i>Tratamentos Oxidantes</i>	32
3.2.2 <i>Produção de radicais protéicos</i>	32
3.2.3 <i>Iodinação de resíduos de tirosina</i>	33
3.2.4 <i>Estimativa da formação de produtos nitrados por espectrofotometria</i>	33
3.2.5 <i>Estimativa da formação de DOPA pela reação com NBT/glicina</i>	33
3.2.6 <i>Fragmentação das proteínas</i>	34
3.2.7 <i>Quantificação de produtos oxidados nos hidrolisados ácidos de RNase e lisozima</i>	34
3.2.8 <i>Caracterização de produtos oxidados nos hidrolisados totais (pronase) de RNase e lisozima por HPLC/MS/ESI</i>	35
3.2.9 <i>Caracterização dos resíduos oxidados da RNase e lisozima por digestão trípica e HPLC/MS-MALDI-ToF</i>	36
3.2.10 <i>Quantificação do consumo de peróxido de hidrogênio e nitrito em incubações contendo peroxidases e tempol</i>	38
3.2.11 <i>Quantificação da liberação de oxigênio em incubações contendo peroxidases e tempol</i>	39
3.2.12 <i>Experimentos de cinética rápida com peroxidases e tempol</i>	39
3.2.13 <i>Simulação cinética</i>	40
4. RESULTADOS	42
4.1. Oxidação e nitração de RNase e lisozima por peroxinitrito e MPO	42
4.1.1 Geração de radicais protéicos	42
4.1.2 <i>Caracterização dos produtos presentes nos hidrolisados totais (pronase)</i>	48
4.1.3 <i>Estimativa do rendimento de produtos de oxidação</i>	55
4.1.4 <i>Caracterização dos produtos oxidados por digestão trípica</i>	58

4.2. Efeitos inibitórios do tempol sobre a nitração da RNase mediada por peroxidases	78
5. DISCUSSÃO	94
6. CONCLUSÕES	111
7. REFERÊNCIAS	113

1. Introdução

O primeiro radical livre orgânico foi descrito por Moses Gomberg no início do século XX e neste mesmo século foram caracterizadas as propriedades tóxicas do oxigênio molecular. Desde então, pesquisas têm revelado que radicais livres estão presentes na atmosfera e nos nossos organismos. Um radical livre é um átomo ou molécula que contém elétrons desemparelhados. Nos sistemas biológicos, a maior parte dos radicais livres é derivada do oxigênio molecular embora este seja fundamental para a sobrevivência dos organismos aeróbicos. Atualmente, os radicais livres são amplamente aceitos como sendo relevantes para a fisiologia e fisiopatologia e diferentes pesquisas têm como objetivo definir mais claramente o papel destas espécies em diversas condições (Augusto, 2006; Halliwell & Gutteridge, 2007).

1.1. Óxido Nítrico

Dentro do contexto dos radicais, o óxido nítrico foi ignorado como molécula biológica por décadas. Banham *et al.* em 1925 reportaram a morte de um homem com causa aparente de envenenamento por monóxido de carbono, mas a análise do sangue mostrou que a coloração vermelha estável era devido a nitroso-hemoglobina e não a carboxi-hemoglobina. O interesse no óxido nítrico ressurgiu em 1986 quando se descobriu que um aumento nos níveis de cGMP, produzido pela guanilato ciclase nos músculos lisos vasculares, permitia relaxamento dos vasos sanguíneos e aumentava o fluxo sanguíneo (Furchgott & Zawadzki, 1980). Todavia, os agentes endógenos responsáveis por esta ativação permaneciam desconhecidos. Segundo alguns estudos (Ignarro *et al.*, 1986; Moncada *et al.*, 1987), o óxido nítrico assim como outros oxidantes poderiam ativar a guanilato ciclase, mas a geração endógena deste oxidante somente foi comprovada por volta de 1990 quando a óxido nítrico sintase (NOS) neuronal foi clonada e purificada (Bredt *et al.*, 1990; Bredt & Snyder, 1989; Bredt & Snyder, 1990).

Além desta, outras duas formas de NOS foram identificadas, a induzível e a endotelial. O tipo induzível é prontamente expresso em vários tecidos em resposta a citocinas pró-inflamatórias e, diferente dos dois outros tipos, não é regulado por alterações dos níveis de cálcio intracelular. A enzima endotelial é fortemente ativada pela entrada de cálcio nas células e também é regulada por fosforilação.

Embora o óxido nítrico seja geralmente considerado uma molécula sinalizadora e capaz de ativar a guanilato ciclase em concentrações de 5-10 nM, é importante considerar outros efeitos fisiológicos *in vivo*. Como o óxido nítrico é um radical pouco reativo em condições fisiológicas ($t_{1/2} \approx 1\text{s}$), pode difundir a partir do local de sua geração e atravessar várias células. Como é relativamente hidrofóbico, pode atravessar membranas sem canais ou receptores. Seu coeficiente de difusão em água a 37°C é pouco maior do que o do oxigênio e dióxido de carbono (Wise & Houghton, 1968). Assim, pode repetidamente difundir para dentro e fora das células durante sua meia-vida e colidir com muitas biomoléculas. Dentre os inúmeros estudos atuais envolvendo óxido nítrico destacam-se sua relação com a respiração celular (Palacios-Callender *et al.*, 2007), inflamações pulmonares (Esposito & Cuzzocrea, 2007), diabetes (Muniapan & Ozcan, 2007) e doenças cardiovasculares (Shibasaki *et al.*, 2007). Muitos dos potenciais efeitos tóxicos do óxido nítrico já relatados são provavelmente mediados por seus produtos de oxidação e não por ele próprio. Dentre os produtos dele derivados, um dos principais é o peroxinitrito, produto da reação do óxido nítrico com o ânion radical superóxido. Recentemente, foi publicada uma extensa revisão sobre óxido nítrico e peroxinitrito (Pacher *et al.*, 2007) e suas implicações fisiológicas e patofisiológicas.

1.2. Peroxinitrito

Apesar do peroxinitrito ser uma molécula conhecida desde meados do século XX, somente em 1990 foi sugerido que ele poderia ser um oxidante biológico formado a partir da reação do óxido nítrico com o ânion radical superóxido (Beckman *et al.*, 1990).

Seguiram-se vários estudos e determinou-se a constante de velocidade da reação entre o óxido nítrico e o ânion radical superóxido (reação 1, Figura 1) como sendo próxima do limite difusional ($7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Huie & Padmaja, 1993). Como a constante de velocidade da reação do ânion radical superóxido com a enzima superóxido dismutase (SOD) é da mesma ordem de grandeza ($2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), o óxido nítrico pode competir com a superóxido dismutase endógena pelo superóxido nos locais onde é produzido em altas concentrações. O peroxinitrito é um forte oxidante e pode reagir diretamente com grupos heme (Bocchini & Herold, 2004), centros ferro-enxofre (Castro *et al.*, 1994) e tióis (Rhee *et al.*, 2005). O ânion peroxinitrito (ONOO^-) também reage diretamente com eletrófilos, moléculas com carga positiva parcial, como o dióxido de carbono. Neste caso, forma um intermediário transiente, nitrosoperoxicarbonato, que rapidamente se decompõe em dióxido de nitrogênio e radical carbonato (Figura 1). A resistência na aceitação do peroxinitrito e outras espécies reativas de nitrogênio como tendo significado fisiopatológico se explica pela dúvida de serem produzidos em quantidades suficientes para ocasionar danos fisiológicos. A meia-vida do peroxinitrito é curta (aproximadamente 10-20 ms em presença de dióxido de carbono, pH 7), mas suficiente para atravessar membranas biológicas e difundir um ou dois diâmetros celulares (Denicola *et al.*, 1998). Entre os alvos do peroxinitrito ou de radicais dele derivados estão lipídeos, ácidos nucléicos e aminoácidos em proteínas. Dentre as modificações pós-translacionais mais estudadas encontra-se a formação de 3-nitrotirosina.

O desenvolvimento de anticorpos que reconhecem 3-nitrotirosina forneceu maior ímpeto ao estudo dos possíveis papéis do peroxinitrito a partir de 1998 (Ischiropoulos, 1998). Desde então, foi demonstrado que o nível de proteínas nitradas em tecidos está aumentado em diversas doenças (Greencare & Ischiropoulos, 2001; Radi, 2004). Isso se constitui numa prova inequívoca da formação de oxidantes derivados do óxido nítrico *in vivo*. Durante algum tempo acreditou-se que 3-nitrotirosina seria um marcador para peroxinitrito, mas sabemos hoje que outras rotas biológicas também a produzem, principalmente reações envolvendo peroxidases (Augusto *et al.*, 2002; Radi, 2004).

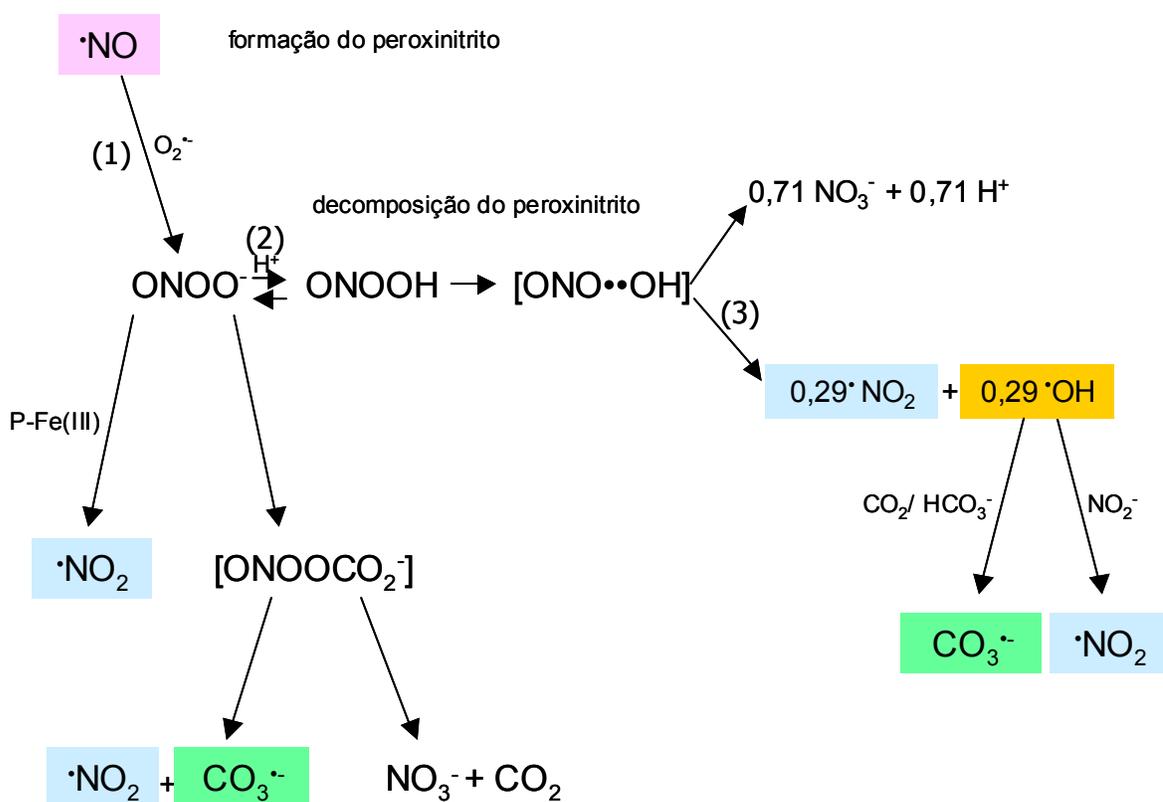
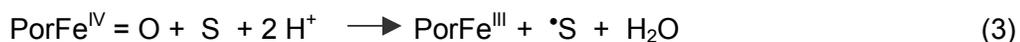
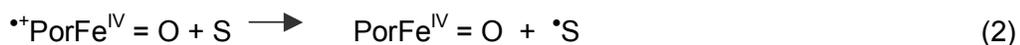
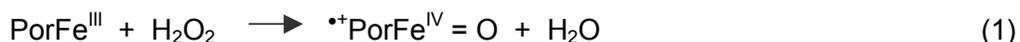


Figura 1. Produção de oxidantes a partir do óxido nítrico e peroxinitrito (Augusto *et al.*, 2002).

1.3. Mieloperoxidase

Neutrófilos e macrófagos são as principais células de defesa inespecífica de mamíferos. Quando ativados, várias enzimas intracelulares são acionadas e destroem microrganismos fagocitados, principalmente bactérias. Nestas situações, ocorre a produção de oxidantes como um dos mecanismos microbicidas visto que há um aumento no consumo de oxigênio durante a fagocitose (“burst” oxidativo). A NADPH oxidase, um sistema multi-componente, é um flavocitocromo, que montado na membrana celular, reduz oxigênio a ânion radical superóxido. Este participa da geração de outras espécies reativas derivadas do oxigênio ($\cdot\text{OH}$, H_2O_2 , intermediários ferrila) e nitrogênio ($\cdot\text{NO}_2$, ONOO^-). Também, a produção dessas espécies está relacionada com a iNOS assim como às peroxidases presentes em macrófagos e neutrófilos.

Peroxidases são um grupo de enzimas oxirredutases que utilizam peróxidos como moléculas receptoras de elétrons. As peroxidases podem ser divididas quanto à presença de um grupo heme, ou seja, podem ser classificadas como contendo o grupo heme ou não. As peroxiredoxinas e a glutathiona peroxidase são exemplos de peroxidases que não contêm o grupo heme. As peroxidases que contêm o grupo heme catalizam a peroxidação de substratos usando o íon ferro do grupo heme durante os ciclos catalíticos. Uma molécula de peróxido oxida o íon de ferro (III), formando o composto I ($\text{P}^+\text{Fe(IV)=O}$). O composto I é uma espécie química com alta capacidade oxidante, reduzindo-se à enzima nativa por 2 elétrons ou formando composto II quando oxida substratos por 1 elétron. O composto II oxida outra molécula de substrato e volta ao estado de oxidação ferro (III) (reações 1, 2 e 3). Os substratos (S) das peroxidases são de natureza bastante diversa, incluindo proteínas como citocromo c, peptídeos como glutathiona e pequenas moléculas como o NADPH.



Dentre as peroxidases relacionadas ao sistema imune destacam-se a mieloperoxidase (liberada pelos neutrófilos) e a peroxidase eosinófila (liberadas pelos eosinófilos). A importância do estudo da MPO reside no fato dela ser associada à defesa dos mamíferos contra bactérias, vírus e fungos. Além disso, estudos recentes têm revelado um papel decisivo dessa enzima em processos inflamatórios crônicos não microbianos, como doenças neurodegenerativas e arterosclerose (Podrez *et al.*, 2000). Também, dados epidemiológicos atestam uma relação entre o polimorfismo da MPO em humanos e o risco de câncer nos pulmões, laringe e esôfago e de doenças cardiovasculares em pacientes terminais com distúrbios renais (Malle *et al.*, 2003). Em pacientes, a relação MPO por leucócito indicou forte risco de doença coronariana (Brennan & Hazen, 2003). Ainda, níveis de MPO no plasma e soro mostraram um risco futuro de ataque cardíaco em pacientes que apresentavam dores no peito (Brennan *et al.*, 2003).

A MPO é altamente resistente a proteases e inativação química, uma propriedade provavelmente resultante de pressões para a evolução de uma enzima que produzisse espécies reativas oxidantes dentro do ambiente inóspito do fagolisossomo.

A MPO foi primeiramente purificada em 1941 a partir de grandes volumes de células piogênicas (pus) e foi chamada de verdoperoxidase. É a presença de MPO que confere ao pus e a outros fluidos de infecção a coloração verde. A MPO é uma proteína extremamente básica (pI > 10), rica em arginina. A enzima madura é um homodímero de 146 kDa com uma ponte dissulfeto [Cys153(319)] entre as duas subunidades (73 kDa), sendo que cada uma delas é composta por dois polipeptídeos de 14,5 e 58,5 kDa, um íon cálcio e um grupo heme (Fig. 2). O polipeptídeo de 58,5 kDa é glicosilado (Furtmüller

et al., 2005) e mostra uma atividade peroxidásica não específica, sendo capaz de oxidar um grande número de substratos.

A MPO presente nos lisossomos pode penetrar no fagossomo onde, na presença de peróxido de hidrogênio, converte íons halogênicos em compostos tóxicos como o ácido hipocloroso. Esta é a única rota conhecida para a geração de espécies reativas cloradas em humanos (Harrison & Schultz, 1976; Weiss *et al.*, 1986; Hazen & Heinecke, 1997). Tais espécies têm sido consideradas eficientes agentes antimicrobianos (Klebanoff, 1967; Albrich *et al.*, 1981; Klebanoff *et al.*, 1984) mas suas produções exacerbadas podem danificar tecidos normais por modificações oxidativas (Podrez *et al.*, 2000). A detecção de produtos clorados estáveis e específicos tem sido explorada como um marcador para identificar tecidos onde a MPO promove danos oxidativos *in vivo* (Podrez *et al.*, 2000).



Figura 2. Estrutura da mieloperoxidase. Esta peroxidase possui um grupo heme prostético (protoporfirina XI) na forma férrica (Fe^{III}). O quinto ligante do grupo heme é uma histidina (conhecida como histidina proximal – His^{336}) e um outro resíduo de histidina (histidina distal – His^{95}) atua como catalisador ácido-base na reação entre peróxido de hidrogênio e a enzima. Os resíduos catalíticos His^{95} , Arg^{239} e Gln^{91} são indicados e também estão envolvidos na reação com substratos (Furtmüller *et al.*, 2006). Esta é uma região relativamente conservada na maioria das peroxidases que contém o grupo heme (PDB 1DW0).

Os múltiplos intermediários que podem ser produzidos a partir da MPO assim como sua atividade catalítica dependem da biodisponibilidade de espécies reduzidas de oxigênio como ânion radical superóxido e peróxido de hidrogênio e de outros substratos como nitrito, tirosina, triptofano, cloreto, ascorbato e óxido nítrico (Abu-Soud & Hazen,

2000; Podrez *et al.*, 2000; Kettle & Winterbourn, 1997; Marquez *et al.*, 1990; Furtmüller *et al.*, 2000; Dunford, 1999) (Fig. 3). Este, quando em baixos níveis, é cataliticamente consumido pela enzima, mas em níveis elevados pode formar o complexo nitrosila inativo (Eiserich *et al.*, 1998; Abu-Soud & Hazen, 2000). A taxa de oxidação de substratos pela MPO é dependente de seus potenciais redox. Embora substratos com potenciais de redução de 1,05 a 1,2 V sejam rapidamente oxidados pelo composto I, eles são fracos substratos para o composto II.

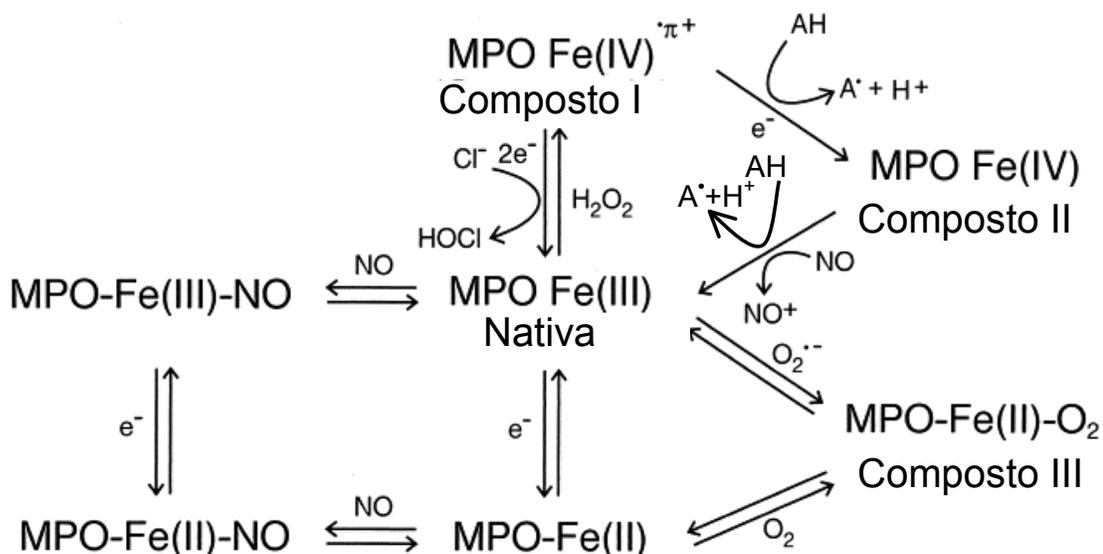


Figura 3. Múltiplos intermediários da MPO. Além dos compostos I e II também pode haver redução a uma forma ferrosa Fe(II) inativa (Kettle & Winterbourn, 1997). As reações das espécies MPO-Fe(III) e MPO-Fe(II) com $O_2^{\cdot-}$ e O_2 , respectivamente, formam um intermediário dioxi-ferroso chamado de composto III (MPO-Fe(II)-O₂). Estudos espectrais demonstraram que adição de H_2O_2 ao composto II forma o composto III. AH representa um substrato genérico.

Na ausência de substratos exógenos, o peróxido de hidrogênio age como um redutor mono eletrônico (Ghibaudi & Laurenti, 2003) e converte MPO-I em MPO-II com geração de íons radical superóxido como resultado da oxidação de peróxido de hidrogênio. Segundo Marquez *et al.* (1994), a formação do composto I é dependente da concentração de peróxido de hidrogênio presente. Um pequeno excesso de peróxido de

hidrogênio (2 a 10 vezes) leva a formação incompleta de MPO-I ao passo que grande excesso (mais de 40 vezes) leva a rápida formação de MPO-II. A formação de MPO-I a partir da reação da enzima nativa com peróxido de hidrogênio apresenta constante de velocidade de segunda ordem de $1,78 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Comparado ao composto I, o composto II é muito estável.

O sítio ativo da MPO é localizado na base de um estreito e profundo sítio hidrofóbico que restringe a acessibilidade de substratos (Zeng & Fenna, 1992; Tien, 1999). Desta forma, compostos de baixo peso molecular podem ser utilizados como oxidantes difusíveis da MPO porque podem migrar do sítio ativo para alvos distantes. A contribuição relativa da oxidação destes substratos para a atividade geral da MPO *in vivo* ainda está sendo estudada, mas já se sabe que os produtos formados e as reações que eles participam podem desempenhar funções significantes. Algumas espécies oxidantes difusíveis geradas podem levar à formação de potentes moléculas sinalizadoras, como os resultantes da peroxidação lipídica (Hazen *et al.*, 1999; Podrez *et al.*, 1999).

Além da atividade peroxidásica, a MPO pode apresentar atividade catalásica, isto é, reage com peróxido de hidrogênio liberando oxigênio. Esta atividade tem sido estudada por vários grupos de pesquisas (Ghibaudi & Laurenti, 2003; Winterbourn *et al.*, 2000) e a reação é considerada irreversível (Kettle & Winterbourn, 2001). Desta forma, o peróxido de hidrogênio reduz o composto I para a enzima nativa com liberação de oxigênio.



A MPO, além de produzir hipoclorito, é um catalisador versátil da oxidação de tirosina e nitrito. Mesmo na presença de cloreto, a MPO pode oxidar a tirosina e produzir ditirosina, tritirosina e pulquerosina (Kettle & Winterbourn, 1994; Jacob *et al.*, 1996). É importante notar que a oxidação de nitrito a dióxido de nitrogênio por MPO-I pode ser

um mecanismo para a geração de agentes microbicidas a partir de óxido nítrico (King *et al.*, 2006). Para isso, a MPO-II resultante terá que ser reciclada a MPO nativa por redutores endógenos que sejam melhores substratos para a MPO-II que o nitrito.

1.4. Oxidação e nitração de proteínas

Como colocado acima, a ocorrência de resíduos de 3-nitrotirosina em proteínas de tecidos foi o primeiro marcador reconhecido da produção de oxidantes derivados do óxido nítrico *in vivo* (Ischiropoulos, 1998). Atualmente, é conhecido que nitração biológica ocorre em resíduos de tirosina e triptofano, em lipídeos e bases dos ácidos nucleicos. Todavia, a nitração de tirosina continua a atrair maior atenção devido a sua abundância em proteínas e a existência de anticorpos comerciais que possibilitam sua detecção sensível em amostras biológicas. Como uma modificação pós-tradução, a nitração de proteínas tem sido avaliada como um potencial indicador de estados agudos e crônicos de doenças e previsor de riscos de doenças. No caso de infecções, a ocorrência de proteínas nitradas em células e tecidos afetados tem sido considerada evidência para a participação de oxidantes derivados do óxido nítrico em mecanismos microbicidas (revisão em Augusto *et al.*, 2002, Radi, 2004).

A nitração de proteína-tirosilas em condições fisiológicas ocorre por um mecanismo radicalar envolvendo a recombinação entre dióxido de nitrogênio e radicais proteína-tirosilas (Radi, 2004). Dessa forma, essa nitração será mediada por sistemas oxidantes que produzam, direta ou indiretamente, radicais proteína-tirosila e dióxido de nitrogênio concomitantemente. Exemplos são o peroxinitrito, particularmente em presença de dióxido de carbono, e peroxidases/peróxido de hidrogênio/nitrito. Mais recentemente, outras hemoproteínas como ciclo-oxigenase-2 (Pallazzo-Balance *et al.*, 2007) e iNOS (Maréchal *et al.*, 2007) foram propostas como catalisadores da nitração de proteína-tirosilas.

É importante mencionar que a nitração de proteínas deve ocorrer em baixos rendimentos *in vivo* porque as reações dominantes do óxido nítrico e dos oxidantes derivados devem ser àquelas com os reagentes mais abundantes, como o oxigênio molecular, dióxido de carbono e biotióis. Assim, oxidação de proteína-cisteínas, glutationilação e nitrosação de proteínas seriam importantes modificações pós-tradução causadas por oxidantes derivados do óxido nítrico (Lancaster, 2006). Além delas, a oxidação e nitração de resíduos de triptofano em proteínas começou a ser descrita (Exner & Herold, 2000; Yakamura *et al.*, 2005, Ishii *et al.*, 2007) e um anticorpo contra 6-nitro-triptofano foi desenvolvido muito recentemente (Ikeda *et al.*, 2007).

Nosso trabalho foi iniciado antes do triptofano ser considerado um alvo importante para a nitração de proteínas mediadas por peroxinitrito e peroxidases/peróxido de hidrogênio/nitrito. Da mesma forma, pouca ênfase fora dada à formação de produtos hidroxilados derivados dos aminoácidos aromáticos nos quais estávamos interessados (Santos *et al.*, 2000, Linares *et al.*, 2001). Fora descrito o tratamento de duas proteínas modelo, RNase e lisozima, com peroxinitrito e MPO/peróxido de hidrogênio/nitrito e somente a nitração de resíduos de tirosina foi caracterizada (Souza *et al.*, 1999) embora a lisozima contenha resíduos de triptofano. Assim, um dos nossos objetivos foi estudar em mais detalhes a oxidação e nitração de proteínas por peroxinitrito e MPO/peróxido de hidrogênio/nitrito. Também, pretendíamos contribuir para a compreensão dos mecanismos pelos quais tempol é capaz de inibir a nitração de proteínas em tecidos de animais submetidos a condições inflamatórias (revisão em Thiernemann, 2003) pelas razões esclarecidas a seguir.

1.5. Tempol

Tempol (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi) e outros nitróxidos cíclicos tem se mostrado particularmente efetivos para reduzir o dano oxidativo em células e animais submetidos a uma variedade de condições experimentais. Também conhecidos como aminoxilas e nitroxilas, esses compostos são radicais livres estáveis devido à ligação entre nitrogênio e oxigênio com três elétrons e a presença de substituintes na posição α (usualmente grupos metila) que dificultam sua dismutação (Figura 4). Devido à natureza paramagnética e estabilidade, os nitróxidos cíclicos têm sido extensivamente empregados como sondas em estudos biofísicos. Além disso, os nitróxidos são antioxidantes multifuncionais porque podem reagir com vários oxidantes e redutores biológicos reciclando via o derivado cátion oxamônio (TPNO⁺) e hidroxilamina, respectivamente (Figura 4) (para revisões recentes ver Soule *et al.*, 2007; Kagan *et al.*, 2007). Eventualmente, os nitróxidos podem ser consumidos através de reações de recombinação com certos radicais, como tiila, e essas reações parecem ser relevantes no metabolismo de nitróxidos (Figura 4) (Borisenko *et al.*, 2004).

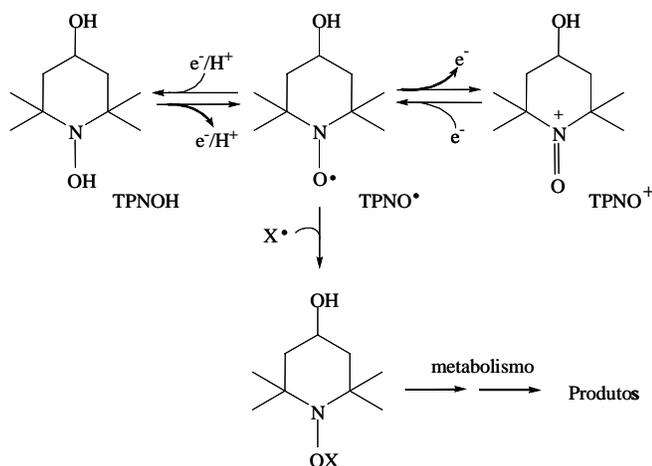


Figura 4. Principais reações redox do tempol (TPNO[•]). É um nitróxido cíclico de seis membros da classe piperidina. Além das reações redox reversíveis, o tempol é consumido por reações de recombinação com radicais alquila, alcoxila, tirosila e tiila (ver, também, abaixo).

O mecanismo antioxidante mais citado na literatura para os nitróxidos é a atividade superóxido dismutase, provavelmente porque essa foi a primeira atividade molecular descrita (Krishna *et al.*, 1992). Outros mecanismos antioxidantes investigados incluem inibição de reações de Fenton pela habilidade de oxidar íons de metais de transição reduzidos, terminação de reações radicalares em cadeia por recombinação com radicais propagadores e recebimento de elétrons da cadeia mitocondrial de transporte de elétrons (Soule *et al.*, 2007; Kagan *et al.*, 2007). Em comparação, as reações de nitróxidos cíclicos com oxidantes derivados do óxido nítrico foram bem menos investigadas e discutidas. Isso é relevante, todavia, porque tem sido demonstrado que o tempol também protege animais de injúrias associadas a condições inflamatórias (revisão em Thiernemann, 2003), as quais são caracterizadas por uma produção aumentada de óxido nítrico e de oxidantes derivados (revisão em Radi, 2004). Relevantemente, os efeitos protetores do tempol contra injúrias inflamatórias são acompanhados por um decréscimo dos níveis de proteína-tirosilas nitradas nos tecidos afetados (Thiernemann, 2003).

Em linha com a tendência da literatura, todavia, os efeitos protetores do tempol em modelos de inflamação foram inicialmente atribuídos a sua atividade superóxido dismutase que impediria a formação de peroxinitrito e de radical hidroxila. Entretanto, nitróxidos não são particularmente eficientes como miméticos da superóxido dismutase (Goldstein *et al.*, 2003a) e parece improvável que tempol administrado a animais possa atingir concentrações locais suficientes para suplantar as isoenzimas da superóxido dismutase que são abundantes em todos os ambientes fisiológicos. Procurando compreender os mecanismos protetores do tempol contra oxidantes derivados do óxido nítrico, examinamos suas interações com peroxinitrito e peroxinitrito/dióxido de carbono *in vitro* (Bonini *et al.*, 2002) e cultura de células (Fernandes *et al.*, 2005). Também,

estudamos a interação do tempol com peroxidases/peróxido de hidrogênio e nitrito que aqui descreveremos.

2. Objetivos

Neste contexto, esse trabalho procurou contribuir para caracterizar os produtos e mecanismos de oxidação e nitração de proteínas por peroxinitrito e mieloperoxidase/peróxido de hidrogênio/nitrito. Também, procuramos estabelecer os efeitos e mecanismos de ação do tempol sobre a nitração de proteínas-tirosila mediada por peroxidases. Para isso, utilizamos como alvo duas proteínas modelo que não possuem resíduos de cisteína reduzidos, RNase e lisozima. A RNase (13.682 kDa) possui 6 tirosinas, nenhum triptofano e todas as 8 cisteínas envolvidas em pontes dissulfeto. A lisozima (14.304 kDa) possui 3 tirosinas, 6 triptofanos e todas as 8 cisteínas envolvidas em pontes dissulfeto. As proteínas foram tratadas com os dois sistemas oxidantes em diferentes condições e os produtos formados nas condições ótimas foram caracterizados e seus rendimentos estimados. A nitração de RNase mediada por mieloperoxidase foi eficiente em meio ácido, e então, este sistema foi utilizado para examinar os efeitos inibitórios do tempol.

3. Materiais e Métodos

3.1 Materiais

Os seguintes reagentes foram obtidos da Sigma: ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico, ácido cítrico, ácido 3,5-dibromo-sulfanílico (sal de sódio), chelex-100, dióxido de manganês, fenol, guaiacol, hidrocloreto de guanidina, hidróxido de sódio, mercaptoetanol, NBT, ovalbumina fração V, peroxidase de raiz forte, tempol, 3-OH-Tyr, 3-NO₂-Tyr, Tyr, Trp e Tris-base. Acrilamina, bis-acrilamina e glicina foram obtidas da Gibco BRL. Peróxido de hidrogênio foi obtido da Fisher Scientific. O acetato de sódio anidro, acetonitrila, ácido acético glacial, ácido clorídrico, ácido fosfórico, bicarbonato de amônio, butanol, cloreto de cálcio, ditiotretol, etanol, éter dietílico, fosfato monossódico, glicerol, hidrogenofosfato dissódico, metanol, nitrito de sódio, o-dianisidina, TCA e TFA foram obtidos da Merck. O ácido iodoacético foi obtido da Fluka. A catalase foi obtida da Boehringer Mannheim. O iodeto de sódio foi obtido da Reagen. A lisozima de clara de ovo de galinha e persulfato de amônio foram obtidos da USB. A mieloperoxidase de leucócitos humanos foi obtida da Alexis. A RNase de pâncreas bovino foi obtida da Boehringer Mannheim ou Calbiochem. A tripsina suína grau de sequenciamento foi obtida da Promega. O DMPO foi purificado por destilação fracionada. Todos os reagentes foram de grau analítico ou superior.

O DBNBS foi sintetizado seguindo basicamente o procedimento de Kaur *et al.* (1981). Foram misturados 10 mmol do ácido 3,5-dibromo-sulfanílico (sal de sódio) com 10 mmol de acetato de sódio anidro em 30 ml de ácido acético glacial. Após a dissolução dos sais em ácido acético por aquecimento até 50°C, foi adicionado 78 mmol de peróxido de hidrogênio 30%. A mistura foi evaporada em rota-evaporador e após 48 h o precipitado foi filtrado e lavado com ácido acético glacial e éter dietílico. O DBNBS foi recristalizado em etanol e as análises de pureza seguiram o descrito por Hamilton *et al.* (2003) além da confirmação da massa por espectrometria de massa MS-ESI.

As concentrações do peróxido de hidrogênio e tempol foram determinadas espectrofotometricamente utilizando os valores $\epsilon_{240} = 43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Claiborne, 1995) e $\epsilon_{240} = 1440 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Hoffman & Eames, 1969), respectivamente.

O peroxinitrito foi sintetizado a partir de nitrito de sódio (0,6 M) e peróxido de hidrogênio (0,65 M) em um reator “quenched-flow” com adição de excesso de peróxido de hidrogênio para reduzir a contaminação por nitrito. O excesso de peróxido de hidrogênio foi removido com dióxido de manganês. Os níveis dos contaminantes peróxido de hidrogênio (< 1%) e nitrito (10-30%) no peroxinitrito sintetizado foram determinados como descrito anteriormente (Kissner *et al.*, 1997). A concentração de peroxinitrito foi determinada espectrofotometricamente ($\epsilon_{302} = 1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Kissner *et al.*, 1997).

Todas as soluções foram preparadas com água destilada purificada com um sistema Millipore Milli-Q. Os tampões foram pré-tratados com resina Chelex-100 para remoção de possíveis íons metálicos contaminantes. Para medida de absorbância utilizou-se um espectrofotômetro Shimadzu UV-1650 PC.

A mieloperoxidase (MPO) teve sua concentração determinada espectrofotometricamente ($\epsilon_{430} = 8,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ por heme) e apresentou RZ (A_{430}/A_{280}) maior que 0,75 (Agner, 1958). A atividade foi monitorada antes da utilização empregando guaiacol como substrato em presença de peróxido de hidrogênio (Maehly & Chance, 1954). A MPO utilizada apresentou atividades entre 500 e 1400 unidades/ml.

Peroxidase de raiz forte (HRP) teve sua concentração determinada espectrofotometricamente ($\epsilon_{401} = 1,02 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e apresentou RZ 1,8 (Schonbaum & Lo, 1972) e a atividade foi monitorada como descrito para a MPO.

3.2 Métodos

3.2.1 *Tratamentos Oxidantes*

No tratamento com peroxinitrito, empregou-se soluções de 5 mg/ml de lisozima ou RNase em 100 mM de sais de fosfato de sódio nos pHs 5,4, 6,4 e 7,4. A reação foi iniciada pela adição de peroxinitrito à solução de proteína. O pH final foi verificado e se manteve inalterado.

Alternativamente, as proteínas nos pHs 5,4, 6,4 e 7,4 foram incubadas com 1 mM de H₂O₂ e 1 mM de NaNO₂ na presença de 30 nM (10 U/ml) de MPO ou 10 μM (450 U/ml) de HRP durante 40 min ou 1 h, respectivamente, a 37°C. Nos estudos sobre os efeitos do tempol, este foi adicionado previamente às enzimas. A reação foi interrompida adicionando-se catalase ou por congelamento. Para análises de HPLC e espectrometria de massas, o excesso de sais foi removido por gel filtração (PD-10, Amersham-Pharmacia). As proteínas eluídas foram secas em secador a vácuo e reconstituídas ao volume original com água ou TFA 0,5%.

3.2.2 *Produção de radicais protéicos*

A formação de radicais protéicos foi acompanhada pelo método de captação de spin no EPR. Os espectros de EPR foram obtidos a temperatura ambiente em um espectrômetro de banda X Bruker ER 200D-SRD modernizado com instrumentação EMX e equipado com cavidade de alta sensibilidade (4119HS). As incubações foram transferidas para uma cela de 200 μl e os espectros foram registrados após 1 min da adição do peroxinitrito ou 40 min e 1h no caso da MPO e HRP, respectivamente. O campo magnético foi calibrado com tempol ($g = 2,0056$) (Bonini *et al.*, 1999). Os captadores de spin utilizados foram DNBNS e DMPO nas concentrações de 10 mM e 100 mM, respectivamente.

3.2.3 Iodinação de resíduos de tirosina

A mistura da reação (1 ml) contendo 350 μM de lisozima em tampão fosfato 100 mM foi tratada com NaI (concentração final 40 mM) seguindo o descrito anteriormente (Chen *et al.*, 2004). A iodinação dos resíduos de tirosina foi iniciada pela adição de 3 beads imobilizados de N-cloro-benzenosulfonamida (Iodo Beads; Pierce). A mistura foi incubada por 15 min a temperatura ambiente sob agitação. Para interromper a reação, a solução foi aplicada em uma coluna de filtração (PD-10, Amersham Pharmacia). A fração contendo a proteína iodada foi coletada e sua concentração determinada por espectrofotometria UV ($\epsilon_{280} = 3,65 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Praisman & Rupley, 1968).

3.2.4 Estimativa da formação de produtos nitrados por espectrofotometria

A geração de produtos nitrados na RNase e lisozima foi monitorada por espectrofotometria pela determinação da concentração de produtos nitrados realizada a 430 nm ($\epsilon = 4,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) em pH > 12 (Sampson *et al.*, 1998). No caso da RNase, esta determinação indica nitração de resíduos de tirosina (3-NO₂-Tyr) devido à inexistência de resíduos de triptofano. Como a lisozima apresenta resíduos de tirosina e triptofano passíveis de oxidação, o valor obtido por esta metodologia representa um índice global de nitração, pois o triptofano apresenta $\epsilon = 3,32 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em 420 nm.

3.2.5 Estimativa da formação de DOPA pela reação com NBT/glicina

Esse método consiste em incubar a amostra com ovalbumina (10 mg/ml, pH 10) e 0,24 M de NBT recém-preparado em 2 M de glicina a pH 10 (Paz *et al.*, 1991). Após o tempo de incubação, a concentração de DOPA foi determinada em leitor de Elisa a 540 nm. Esta metodologia foi validada comparando seus resultados com os do HPLC.

3.2.6 Fragmentação das proteínas

A avaliação da fragmentação das proteínas após os tratamentos foi realizada por SDS-PAGE em condições redutoras. Após os tratamentos com peroxinitrito ou MPO/H₂O₂/NO₂⁻, as amostras foram aplicadas em coluna PD-10, liofilizadas e reconstituídas em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4. As proteínas (5 µg) foram submetidas a separação em gel de poliácridamida (15%) sob condições redutoras e posteriormente, coradas com comassie blue. O marcador de peso molecular Kaleidoscope (Bio-Rad) foi incluído em cada gel.

3.2.7 Quantificação de produtos oxidados nos hidrolisados ácidos de RNase e lisozima

Para hidrólise ácida, 150 µl da mistura reacional (800 µg de proteína) foram secos a vácuo em tubo próprio para hidrólise. Para cada série de 4 amostras foram utilizados 200 µl de HCl 6 N, 10 µl de mercaptoetanol e aproximadamente 20 µg de fenol (um cristal). O recipiente foi preenchido com nitrogênio e permaneceu durante 18 horas a 110°C (Gieseg *et al.*, 1993). As amostras foram dissolvidas em TCA 2%, filtradas e analisadas por HPLC.

O sistema de HPLC utilizado é constituído por uma bomba 625L e injetor Rheodyne modelo 9125-080, com detectores de fotodiodos Waters 996 e coulométrico ESA, cela analítica modelo 5011 com dois canais eletroquímicos compostos por eletrodos porosos de grafite arranjados em série e cela guarda modelo 5020. O sistema de detecção está acoplado a um sistema de aquisição de espectros, software Millennium 32 versão 3.05.01 (1998). Para separação utilizou-se uma coluna de fase reversa Supercosil LC-18S (4,5 x 250 mm, 5 µm) com fase móvel contendo acetato de sódio 50 mM, citrato de sódio 50 mM e metanol 8% (v/v) a pH 2,8 (Henseley *et al.*, 1997); o fluxo utilizado foi 0,6 ml/min. A eluição da 3-NO₂-Tyr e tirosina foi monitorada por UV a 280

nm. A análise de 3-OH-Tyr foi realizada a partir do sistema coulométrico em potencial específico de 240 mV. A identificação de 3-NO₂-Tyr, 3-OH-Tyr e tirosina foi validada por experimentos de “spiking” e a quantificação realizada com curvas padrões de cada composto nas mesmas condições que a amostra.

3.2.8 *Caracterização de produtos oxidados nos hidrolisados totais (pronase) de RNase e lisozima por HPLC/MS/ESI*

Para digestão enzimática completa das proteínas foi seguido basicamente o procedimento descrito por Herold *et al.* (2002). As proteínas secas (1,5 mg) foram desnaturadas com hidrocloreto de guanidina 6 M em 50 mM de Tris-HCl pH 8,0 (com baixa tensão de oxigênio) e reduzidas com 10 mM de ditione por 2 h a 37°C. Após este tempo foi adicionado 60 mM de ácido iodoacético para bloqueio dos tióis e as amostras incubadas por 2 h a 37°C ao abrigo da luz. As amostras foram então aplicadas em coluna PD-10 e secas em secador a vácuo. Foram reconstituídas em 200 µl de tampão bicarbonato de amônio 50 mM, pH 7,8 e procedeu-se a digestão com adição de 1,2 mg de pronase (dissolvida no mesmo tampão) e 10 mM de cloreto de cálcio durante 12 h a 40°C. Adicionaram-se mais 1,2 mg de pronase e 10 mM de cloreto de cálcio e incubou-se mais 12 h a 40°C.

Após a digestão com pronase a mistura dos aminoácidos das proteínas com e sem tratamento oxidante foi analisada em um sistema HPLC da Shimadzu com um detector “diode array” e uma coluna de fase reversa C18, 5 µm, 250 x 3,00 mm (Luna, Phenomenex) acoplada. O solvente A foi 0,1% de TFA em água Milli-Q e o solvente B foi 0,07% de TFA em acetonitrila grau para HPLC. Os aminoácidos foram eluídos usando um aumento linear no gradiente de 5% de B como segue: até 15 min indo a 10% B, de 15 a 35 min indo de 10 a 50% B, mais 10 min até 80% B, mantendo 80% B durante 5 min, voltando a 5% em 5 min e mantendo 5% por 5 min (tempo total da corrida: 60 min). O fluxo empregado foi de 0,6 ml/min. Os produtos oxidados foram

analisados em 210, 280 e 365 nm e suas massas moleculares foram determinadas por espectrometria de massa ESI. Por este método, além da identificação dos produtos oxidados nos hidrolisados totais, foi quantificada a ditirosina.

As amostras foram analisadas em um HPLC (Shimadzu) acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo (Quattro II, Micromass, UK). O sistema de HPLC consiste em 2 bombas LC-10ADvp, uma controladora SCL-10Avp e um detector SPD-10AVvp. As análises das amostras foram realizadas acoplado o HPLC ao espectrômetro de massas no modo de ionização “electrospray” positivo (HPLC/MS/ESI⁺). A voltagem do cone de amostragem foi 10, 30 e 50 V e a voltagem do cone extrator foi 5 V. As temperaturas da fonte e de dessolvatação foram 100 e 200°C, respectivamente, a voltagem do capilar foi 2,31 kV e a voltagem das lentes RF foi 0,5 kV. O fluxo de gás de secagem e nebulização foi 300 l/h e 15 l/h, respectivamente. Os dados foram analisados utilizando o software MassLynx 3.2. Para passagem do HPLC ao espectrômetro foi acoplado divisor de fluxo com passagem para 150 µl/min da amostra.

3.2.9 Caracterização dos resíduos oxidados da RNase e lisozima por digestão trípica e HPLC/MS-MALDI-ToF

Após os tratamentos oxidantes, as amostras foram digeridas seguindo basicamente o procedimento descrito por Souza *et al.* (1999). As soluções contendo a proteína tratada ou controle foram alíquotadas de modo a se obter 0,5 a 1 mg de proteína, aplicadas em uma coluna de filtração (PD-10, Amersham-Pharmacia) e secas em secador a vácuo. Para desnaturação da proteína foi adicionada uma solução de hidrocloreto de guanidina 6 M em 50 mM de Tris-HCl pH 8 tratada com argônio para retirada de oxigênio. A seguir a proteína foi reduzida com 5 mM de ditioneitol durante 2 h a 37°C. As amostras reduzidas foram alíquotadas com ácido iodoacético 25 mM (recém-preparado) durante 2 h a 37°C ao abrigo da luz. As amostras foram eluídas em coluna

de filtração (PD-10, Amersham-Pharmacia), secas em secador a vácuo e reconstituídas em um volume de 50 µl de água. As proteínas carboximetiladas foram clivadas com tripsina modificada grau de sequenciamento na proporção de 1:100 peso/peso a 37°C por 16 h. A reação foi parada com uma solução contendo 50% de acetonitrila, 49,5% de água e 0,5% de TFA. As soluções foram secas em secador a vácuo e ressuspensas em TFA 0,1% ou água.

Após a digestão triptica, os fragmentos tripticos das proteínas tratadas ou não foram separados em um sistema HPLC (Shimadzu) constituído por duas bombas LC-20AT, detector de fluorescência RF-10AXL, detector “diode array” SPD-M20A, uma controladora CBM-20A e autoinjeter SIL-20A. Para separação empregou-se coluna de fase reversa C18, 10 µm, 3,9 x 300 mm (µ Bondapak, Waters, USA). O solvente A foi 0,1% de ácido trifluoroacético em água Milli-Q e o solvente B foi 0,05% de ácido trifluoroacético em acetonitrila grau para HPLC (90%). No caso da lisozima, os fragmentos foram eluídos usando um aumento linear no gradiente de B como segue: até 4 min de 3 a 5% B, de 4 a 12 min indo de 5 a 22% B, de 12 a 45 min indo de 22 a 30% B, de 45 a 50 min indo de 30 a 50% B e mais 5 min até 70% B (total da corrida: 55 min). No caso da RNase, os fragmentos foram eluídos usando um aumento linear no gradiente de B de 3 a 23% até 45 min, de 45 a 105 min indo de 23% a 55% B e mais 10 min até 80% B (total da corrida: 115 min). O fluxo empregado foi de 0,7 ml/min. Os fragmentos tripticos foram analisados com detector UV em 210, 280, 365 nm. As frações cromatográficas foram coletadas e analisadas por espectrometria de massas MALDI-ToF.

Os espectros de massa foram adquiridos no espectrômetro de massa Ettan MALDI-ToF Pro System da Amersham Biosciences (Upsala, SW) equipado com laser (337 nm, modo “shot” com 8 ns), campo quadrático reflectron e “timed ion gate”. A análise dos peptídeos separados pelo HPLC da proteína digerida com tripsina foi

realizada no modo de ionização reflectron com polaridade de íons positiva em potencial de aceleração de 20 kV; tipicamente, 200 “shots” do laser foram empregados em cada espectro com oito “shots” por segundo. As amostras para análise no MS/MALDI-ToF foram preparadas pelo método de “dried-droplet”. Uma alíquota de 1 µl da reação foi misturada com 5 µl de uma solução de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (4-HCCA) na concentração de 10 µg/µl em uma solução contendo 70% de acetonitrila e 30% de TFA 0,1%. Em alguns casos a relação entre amostra e matriz foi alterada para 1:10 ou 1:2.

3.2.10 Quantificação do consumo de peróxido de hidrogênio e nitrito em incubações contendo peroxidases e tempo

A concentração de peróxido de hidrogênio remanescente nos diferentes tempos de incubação foi determinada por um método enzimático (Liochev & Fridovich, 2002). As amostras foram diluídas 25 vezes em solução de o-dianisidina 0,3 mM contendo 40 µg/ml de HRP em tampão fosfato pH 7,4; a oxidação da o-dianisidina foi acompanhada por espectrofotometria ($\epsilon_{460} = 1,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A quantificação foi feita através de uma curva padrão na mesma faixa de concentração das amostras.

A concentração de nitrito remanescente nos diferentes tempos das incubações foi determinada pelo analisador de óxido nítrico por quimioluminescência (NOATM280, Sievers Instruments, INC., Boulder, CO). Alíquotas foram retiradas das incubações, diluídas 50 vezes e reduzidas na cela analítica com solução saturada de iodeto de sódio em 50% de ácido acético. Uma solução com concentração conhecida de nitrito de sódio foi utilizada como padrão para quantificação (Feelisch *et al.*, 2002).

3.2.11 *Quantificação da liberação de oxigênio em incubações contendo peroxidases e tempol*

A liberação de oxigênio foi monitorada em oxígrafo (Gilson 5/6) com eletrodo seletivo Clark com interface com computador. O sistema possui câmara fechada, agitação contínua e a temperatura foi ajustada em $(37,0 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$. O instrumento foi calibrado pela liberação de oxigênio após a adição de catalase (50 unidades/ml) em soluções de peróxido de hidrogênio de concentrações conhecidas.

3.2.12 *Experimentos de cinética rápida com peroxidases e tempol*

Os experimentos de cinética rápida e varredura foram realizados utilizando um espectrofotômetro de fluxo interrompido (stopped-flow) modelo SX-18MV com sistema de computação acoplado e software da Applied Photophysics (UK) a $(25,0 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$ empregando o modo de mistura seqüencial.

Na reação da MPO-I com tempol, $0,2 \mu\text{M}$ de MPO foi misturado com $4 \mu\text{M}$ de H_2O_2 em $0,2 \text{ mM}$ de tampão fosfato pH 7,4. Após um tempo de espera de 0,5 s, a MPO-I gerada foi misturada com diferentes concentrações de tempol, em excesso de pelo menos 10 vezes para garantir cinética de pseudo-primeira ordem (Marquez *et al.*, 1994), mas não muito alta a ponto de se atingir condições de estado estacionário. A formação da MPO-II foi monitorada em 456 nm, ponto isobéptico entre a enzima nativa e o composto I (Marquez *et al.*, 1994).

Na reação da MPO-II com tempol, não foi possível empregar o procedimento usual de pré-incubar MPO com H_2O_2 50 vezes em excesso (Marquez *et al.*, 1994), pois os ensaios preliminares e simulações cinéticas indicaram que condições de estado estacionário seriam alcançadas muito rapidamente, impedindo as medidas. Desta forma, $0,2 \mu\text{M}$ de MPO foram misturados com quantidades equimolares de H_2O_2 em $0,2 \text{ mM}$ de tampão fosfato pH 7,4. Após um tempo de espera de 0,5 s, a MPO-I formada foi misturada com concentrações variáveis de tempol pelo menos 10 vezes em excesso e a

reação foi monitorada em 456 nm em duas escalas de tempo (Tien, 1999). Primeiro, a reação rápida e quantitativa da MPO-I com tempol produzindo MPO-II foi monitorada. Subseqüentemente, o decaimento da MPO-II pela reação com excesso de tempol foi monitorado em escala de tempo maior. As reações com HRP foram mais lentas, e os procedimentos usuais puderam ser empregados. HRP (2,3 a 3 μM) foi misturada com quantidades equimolares de H_2O_2 em 0,2 mM de tampão fosfato pH 7,4 ou 6,4. Após tempo de espera de 1 s, a HRP-I formada foi misturada com diferentes concentrações de tempol e a reação foi monitorada pela formação da HRP-II em 411 nm, que é o ponto isobéstico entre HRP-II e HRP (Roman & Dunford, 1980). Nas reações da HRP-II, 3 μM de HRP e 3 μM de ferrocianeto de potássio foram misturados com 3 μM de H_2O_2 em 0,2 mM de tampão fosfato pH 7,4 ou 6,4. Após um tempo de espera de 2,5 s, a HRP-II formada foi misturada com diferentes concentrações de tempol. A reação foi monitorada pelo decaimento da HRP-II em 425 nm (Ralston & Dunford, 1980). Em todos os casos, os valores de k_{obs} foram determinados a partir das equações correspondentes às curvas obtidas. Três a seis determinações de k_{obs} foram realizadas para cada concentração de substrato. As constantes de velocidade de segunda ordem das reações foram calculadas pela inclinação das retas empregando análises de regressão linear.

3.2.13 Simulação cinética

Foi empregado o programa de simulação GEPASI 3.3 (Mendes, 1997) para a confirmação do mecanismo proposto para a inibição da nitração pelo tempol. O programa GEPASI simula cinética de reações bioquímicas. O programa é de acesso livre pela internet (<http://gepasi.dbs.aber.ac.uk/softw/gepasi.html>) constituindo uma excelente ferramenta para analisar o comportamento de sistemas de reações bioquímicas. Em comparação com outros programas de modelagem cinética (Alves *et al.*, 2006), o GEPASI se destaca pela facilidade no manuseio e funcionalidade. Foram

realizadas simulações cinéticas dos sistemas de ambas peroxidases (HRP e MPO) com e sem tempo empregando os valores de constantes de velocidade determinados neste trabalho e os disponíveis na literatura.

4. Resultados

4.1. Oxidação e nitração de RNase e lisozima por peroxinitrito e MPO

4.1.1 Geração de radicais protéicos

RNase e lisozima foram tratadas com peroxinitrito e MPO/H₂O₂/NO₂⁻ e a geração de radicais protéicos examinada por EPR em pH 5,4, 6,4 e 7,4. Tanto a RNase como a lisozima não geraram radicais suficientemente estáveis para serem detectados por EPR direto. Desta forma, utilizou-se o método do captador de spin com 5,5-dimetilpirrolino-N-óxido (DMPO) e 3,5-dibromo-4-nitrosobenzeno sulfonato (DBNBS).

No caso da RNase, na presença do captador de spin DBNBS detectou-se um radical-aduto DBNBS/*RNase cujas características do espectro de EPR ($a_N = 13,7$ G) indicam a captação de um radical tirosila exposto ao solvente porque a RNase não possui resíduos de triptofano (Augusto & Muntz Vaz, 2007). Ambos os tratamentos oxidantes geraram o mesmo espectro de EPR, sugerindo o mesmo radical-aduto. Os rendimentos de radical-aduto foram da mesma ordem de grandeza, embora variem de forma diferente com o pH (Fig. 5). Em pH 5,4, a presença ou não de nitrito não afetou o rendimento de radical-aduto produzido por MPO (Fig. 5A e 5B). No caso dos outros pHs, o rendimento de radical-aduto é maior em presença de nitrito.

No caso da lisozima também foi captado um radical-aduto DBNBS/*lisozima ($2a_N = 62,5$ G) mas as características do espectro de EPR indicam um radical menos exposto ao solvente (Fig. 6). Este radical-aduto pode corresponder a tirosila ou triptofanila (Augusto & Muntz Vaz, 2007). Para elucidar a natureza do radical captado, os resíduos de tirosina foram bloqueados por iodinação nas condições de pH onde o rendimento de radicais foi maior. Verificou-se que o rendimento de radical-aduto foi reduzido em média 75%. Esses resultados sugerem captação preferencial de radical tirosila e não triptofanila (Fig. 7). Em todos os pHs estudados, um maior rendimento de radicais foi obtido para o tratamento com MPO em presença de nitrito (Fig. 6A e B).

Em síntese, os espectros de EPR variaram com a proteína, mas não com o tratamento oxidante. Para ambas proteínas, ocorreu maior formação de radicais a pH 5,4 e 7,4 para os tratamentos com MPO e peroxinitrito, respectivamente (inserções Fig. 5 e 6).

Experimentos paralelos foram realizados com o captador de spin DMPO para tentar obter mais informação sobre os radicais protéicos formados (Bonini *et al.*, 2004). Não foram detectados radicais-aduto de DMPO, embora o captador fosse capaz de inibir a nitração de RNase e lisozima em aproximadamente 70% (ver adiante). Duas possíveis explicações para esse efeito são a menor eficiência do DMPO em comparação ao DNBNS em captar radicais tirosila (Bonini *et al.*, 2004) e a possibilidade de oxidação do radical-aduto do DMPO à nitrona correspondente (Ramirez *et al.*, 2003) (Fig. 8).

Como os radicais formados derivados da RNase e lisozima são os precursores de produtos de oxidação, procedeu-se a caracterização dos mesmos.

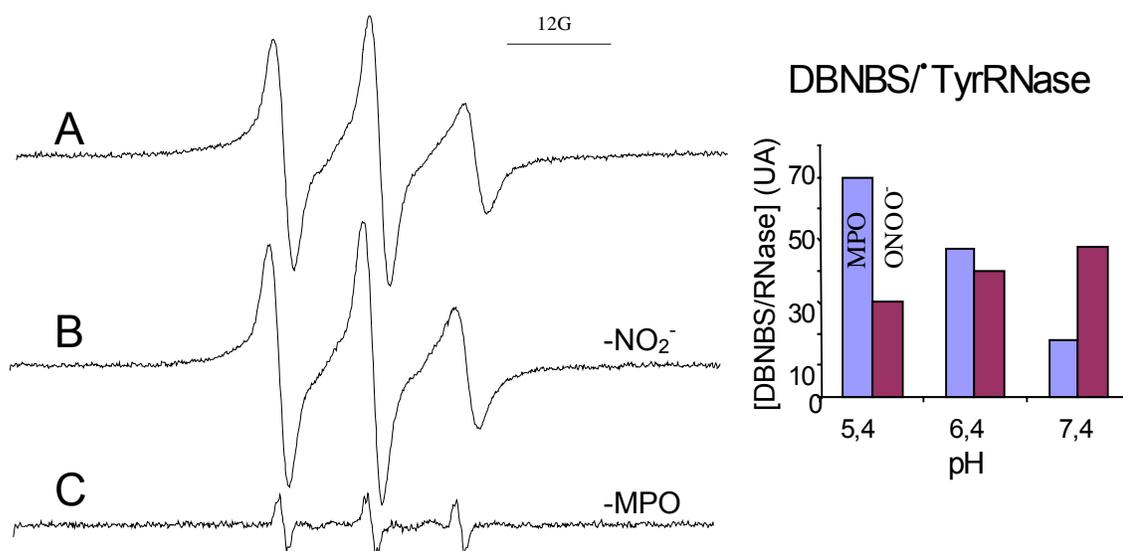


Figura 5. Geração de radicais na RNase tratada com MPO/H₂O₂/NO₂⁻ e peroxinitrito. A, 5 mg/ml de RNase foram tratados com 10 U/ml de MPO, 1 mM de H₂O₂ e 1 mM de NO₂⁻ na presença de 10 mM de DBNBS em pH 5,4 e foi incubada por 40 min a 37°C. B, idem ao (A) sem a presença de nitrito. C, idem ao (A) sem a presença de MPO. Condições instrumentais: potência da fonte de microondas: 20 mW; constante de tempo: 327,7 s; velocidade de varredura: 0,3 G/s; ganho: 1,26 x 10⁵; amplitude de modulação: 1 G. As inserções mostram o efeito do pH e do tratamento oxidante no rendimento de radicais. MPO indica a proteína tratada com MPO/H₂O₂/NO₂⁻. ONOO⁻ indica a proteína tratada com 1 mM ONOO⁻.

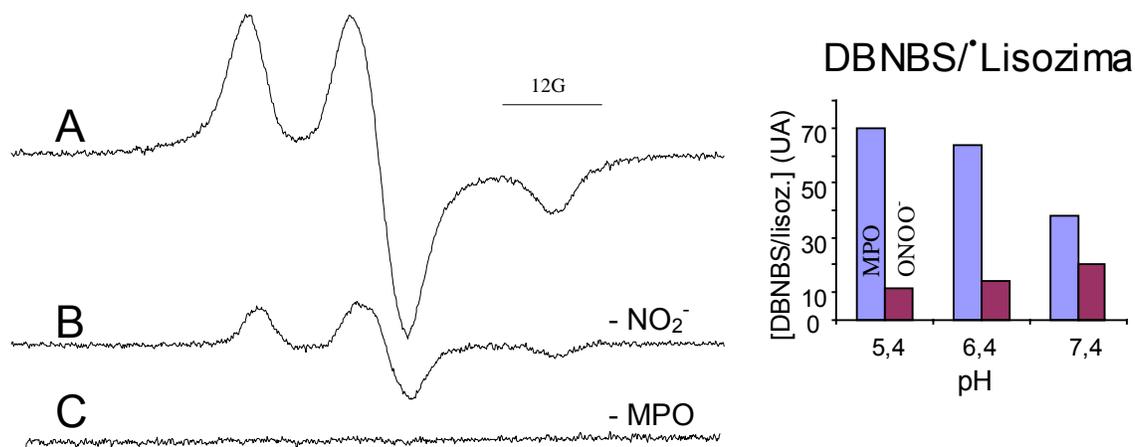


Figura 6. Geração de radicais na lisozima tratada com MPO/H₂O₂/NO₂⁻ e peroxinitrito. A, 5 mg/ml de lisozima foram tratados com 10 U/ml de MPO, 1 mM de H₂O₂ e 1 mM de NO₂⁻ na presença de 10 mM de DBNBS em pH 5,4 e incubada 40 min a 37°C. B, idem ao (A) sem a presença de nitrito. C, idem ao (A) sem a presença de MPO. Condições instrumentais: potência da fonte de microondas: 20 mW; constante de tempo: 327,7 s; velocidade de varredura: 0,3 G/s; ganho: 1,26 x 10⁵; amplitude de modulação: 1 G. As inserções mostram o efeito do pH e do tratamento oxidante no rendimento de radicais. MPO indica a proteína tratada com MPO/H₂O₂/NO₂⁻. ONOO⁻ indica a proteína tratada com 1 mM ONOO⁻.

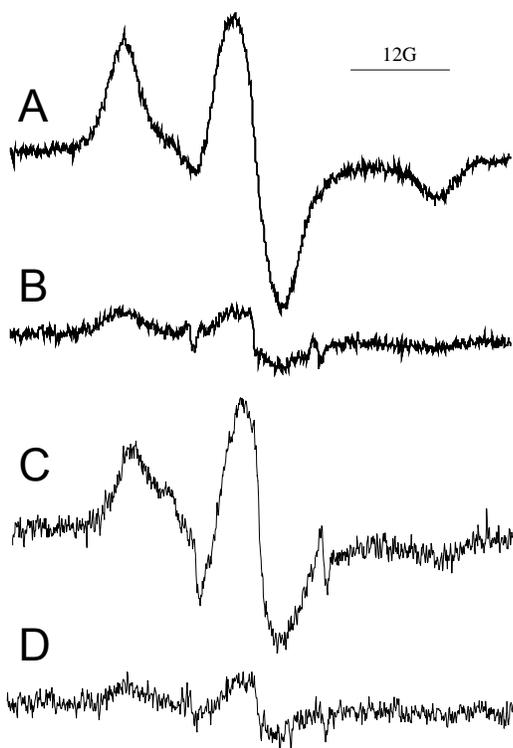


Figura 7. Influência das tirosinas presentes na lisozima na geração de radicais pelos tratamentos oxidantes. A, 5 mg/ml de lisozima tratados com 10 U/ml de MPO, 1 mM de H_2O_2 , 1 mM de NO_2^- e 10 mM de DBNBS em pH 5,4 após 40 min de incubação a $37^\circ C$. B, idem ao (A) mas com a lisozima pré-iodinada. C, 5 mg/ml de lisozima tratada com 1 mM de peroxinitrito, 10 mM de DBNBS em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4. D, idem ao (C) mas com a lisozima pré-iodinada. Condições instrumentais: potência da fonte de microondas: 20 mW; constante de tempo: 327,7 s; velocidade de varredura: 0,3 G/s; ganho: $1,26 \times 10^5$; amplitude de modulação: 1 G.

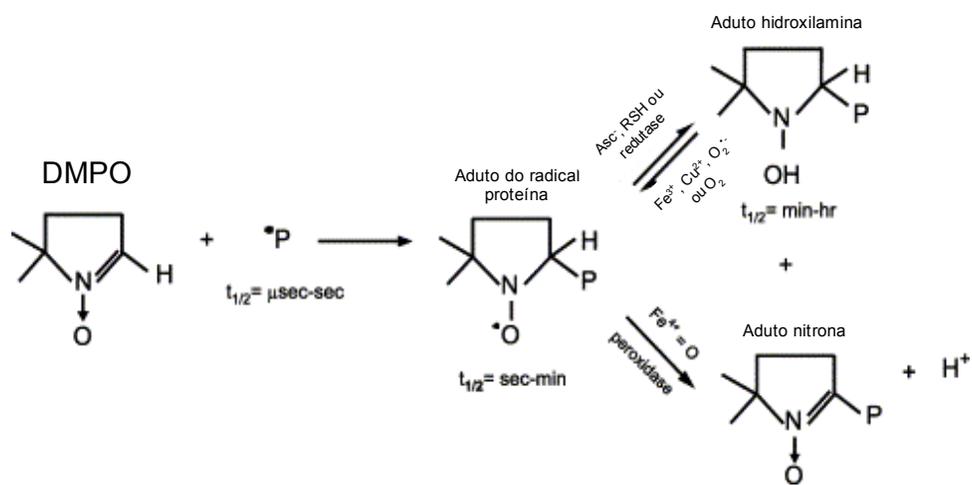


Figura 8. Vias para a formação e decaimento de radical-adutos de DMPO (Ramirez *et al.*, 2003).

4.1.2 Caracterização dos produtos presentes nos hidrolisados totais (pronase)

Para caracterizar os produtos de oxidação da RNase e lisozima foi realizada digestão completa das proteínas com pronase e posterior identificação dos produtos via HPLC/UV/MS/ESI.

No caso da RNase, e para ambos os oxidantes, foram identificados principalmente os produtos 3-OH-Tyr (Fig. 9, TR = 4,3 min) e 3-NO₂-Tyr (Figs. 9 e 10, TR = 17,6 min) (Figs. 9 e 10). No caso da Tyr-Tyr (TR = 11,0 min) a identificação foi realizada após digestão ácida. Foram comparados os espectros UV e os tempos de retenção das amostras com os de padrões 3-NO₂-Tyr, 3-OH-Tyr e Tyr-Tyr. Outras espécies também foram eluídas (Figs. 9 e 10, TR = 18,1, 26,1 e 35,3 min), mas estas não puderam ser identificadas pela análise dos espectros de UV.

Considerando a possibilidade de formação de tritirosina, e di- e tri-tirosinas nitradas (Heinecke, 2002 e Zhang *et al.*, 2000) e visto que a ditirosina é um substrato para oxidação por ^{*}NO₂ (Marquez & Dunford, 1995) pode-se sugerir que os produtos nos tempos de retenção 18,1, 26,1 e 35,3 min (Figs. 9 e 10) são nitro-ditirosina, tritirosina e tritirosina nitrada, respectivamente. Todavia, somente análises por espectrometria de massa e RMN podem corroborar essas sugestões. Os mesmos produtos de oxidação foram obtidos pelo tratamento com MPO e peroxinitrito, mas os rendimentos foram diferentes.

No caso da lisozima tratada com peroxinitrito, além de 3-OH-Tyr e 3-NO₂-Tyr também foram identificados produtos derivados da oxidação do triptofano como NO₂-triptofano (Fig. 11, TR = 25,0, 27,0 e 31,5 min), OH-triptofano (Fig. 11, TR = 22,0 min), di-hidroxi-triptofano (Fig. 11, TR = 26,0 min), N-formil quinurenina (Fig. 11, TR = 16,1 min) e quinurenina (Fig. 11, TR = 13,3 min). Além dos espectros de UV obtidos, estes produtos foram confirmados por espectrometria de massas ESI (Tabela 1). Além destes produtos, outros foram identificados nos tempos de retenção 21,8, 27,6, 28,4 e 28,8 min.

Os espectros obtidos nos tempos de retenção 27,6, 28,4 e 28,8 min foram similares com absorção máxima ao redor de 285 e 325 nm. Não foram encontrados na literatura espectros iguais a esses, embora possuam padrões similares aos de produtos hidroxilados (Maskos *et al.*, 1992). Também, as análises por espectrometria de massas não foram conclusivas para identificar estes produtos. Tampouco foram identificados os produtos de tempo de retenção 21,8 e 28,4 min. Para o tratamento com MPO, foram identificados os produtos quinurenina, 3-NO₂-Tyr, 7-OH-Trp, 6-NO₂-Trp e Tyr-Tyr. Também, análises das proteínas por SDS-PAGE redutor mostraram que a lisozima sofre fragmentação no tratamento com MPO. Verifica-se que a quebra da cadeia polipeptídica gera fragmentos de 10 e 4 kDa. Esta fragmentação não foi verificada no tratamento com peroxinitrito e nem na proteína RNase com ambos tratamentos (Fig. 12).

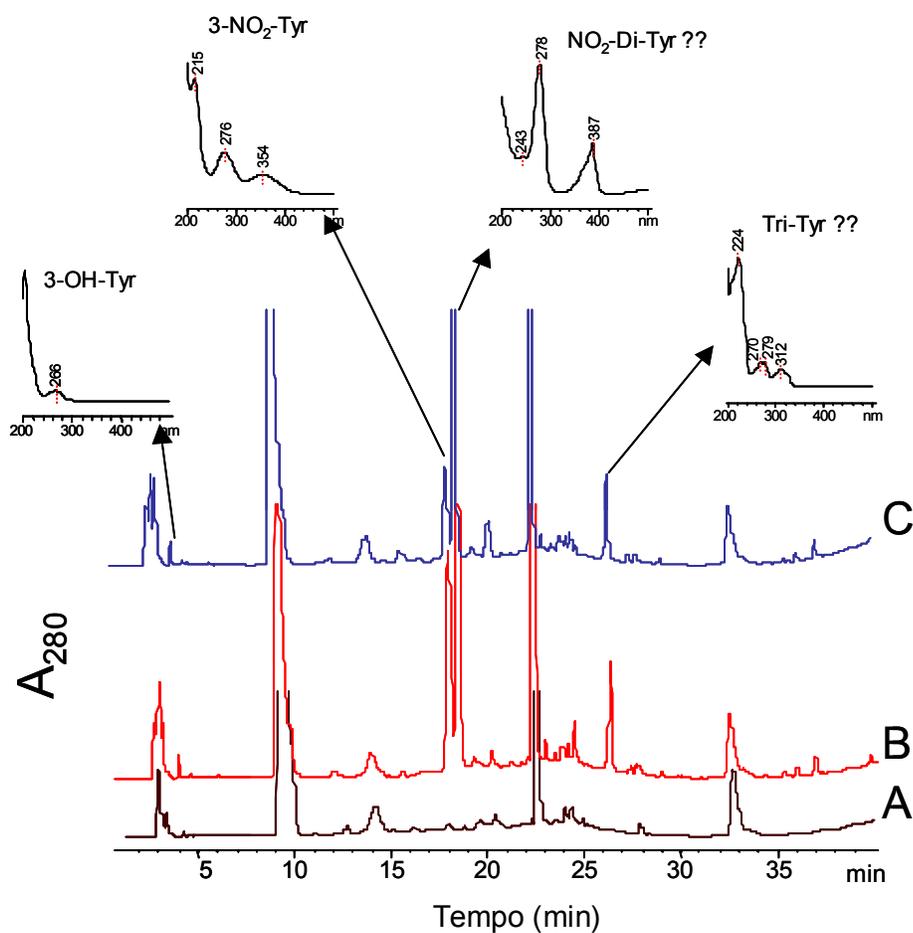


Figura 9. Comparação dos produtos de oxidação formados na RNase pelos tratamentos com MPO e peroxinitrito. A, HPLC/UV dos hidrolisados provenientes da digestão da RNase nativa com pronase acompanhados a 280 nm. B, proteína tratada com 10 U/ml MPO, 1 mM H₂O₂ e 1 mM NO₂⁻, pH 5,4. C, proteína tratada com 1 mM ONOO⁻, pH 7,4. Os aminoácidos foram eluídos utilizando-se uma coluna de fase reversa C18 nas condições descritas em Materiais e Métodos.

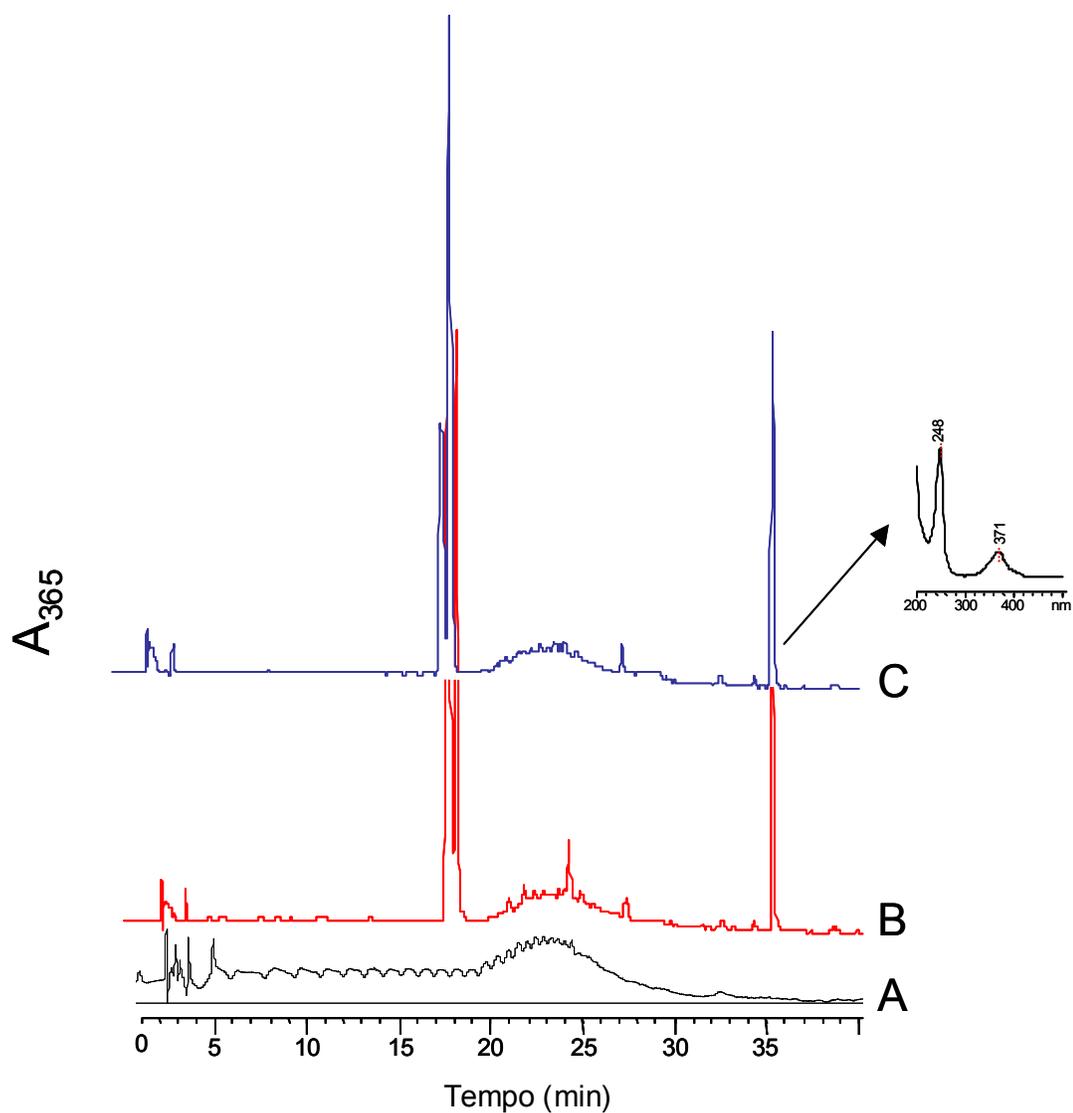


Figura 10. Comparação dos produtos de oxidação formados na RNase pelos tratamentos com MPO e peroxinitrito. A, HPLC/UV dos hidrolisados provenientes da digestão da RNase nativa com pronase acompanhados a 365 nm. B, proteína tratada com 10 U/ml MPO, 1 mM H_2O_2 e 1 mM NO_2^- , pH 5,4. C, proteína tratada com 1 mM $ONOO^-$, pH 7,4. Os aminoácidos foram eluídos utilizando-se uma coluna de fase reversa C18 nas condições descritas em Materiais e Métodos.

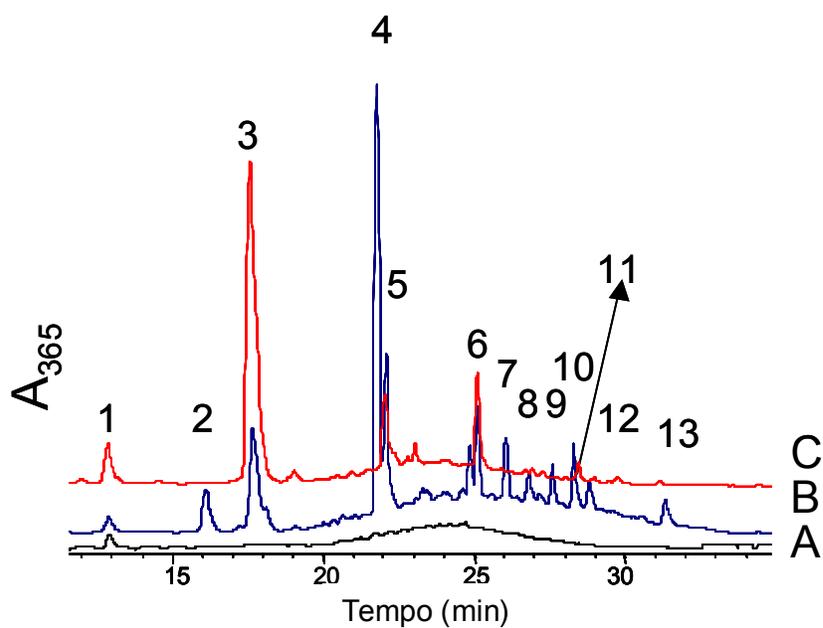
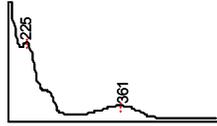
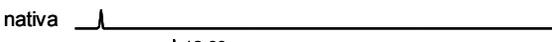
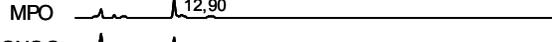
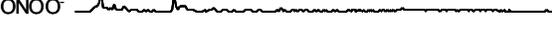
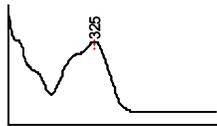
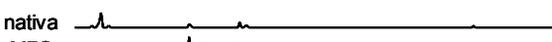
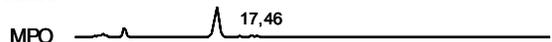
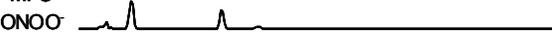
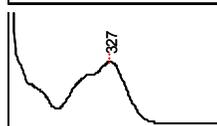
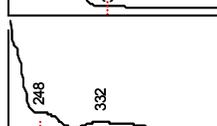
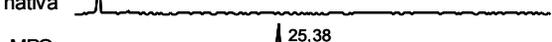
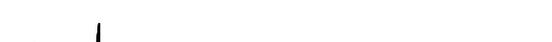
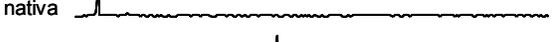
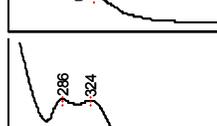
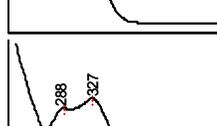
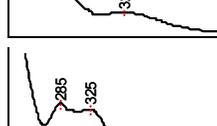
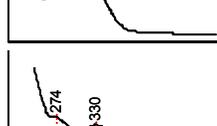


Figura 11. Comparação dos produtos de oxidação formados na lisozima pelos tratamentos com MPO e peroxinitrito. A, HPLC dos hidrolisados provenientes da digestão da lisozima nativa com pronase acompanhados a 365 nm. B, proteína tratada com 1 mM ONOO⁻, pH 7,4 C, proteína tratada com 10 U/ml MPO, 1 mM H₂O₂ e 1 mM NO₂⁻, pH 5,4. Os aminoácidos foram eluídos utilizando-se uma coluna de fase reversa C18 nas condições descritas em Materiais e Métodos.

Tabela 1. Espectros UV-vis e cromatograma dos produtos de oxidação da lisozima tratada com MPO e peroxinitrito após digestão completa com pronase.

No.	Espectro	Produto (M/Z)	Cromatograma de massas
1		Quinurenina (M/Z: 209)	nativa  MPO  ONOO ⁻ 
2		N-formilquinurenina (M/Z: 237)	nativa  MPO  ONOO ⁻ 
3		3-NO ₂ -Tyr (M/Z: 227)	nativa  MPO  ONOO ⁻ 
4		NI	
5		7-OH-Trp	Baixa intensidade na análise por MS/ESI
6		6-NO ₂ -Trp (M/Z: 250)	nativa  MPO  ONOO ⁻ 
7		Di-OH-Trp	
8		X-NO ₂ -Trp (M/Z: 250)	nativa  MPO  ONOO ⁻ 
9		NI	
10		NI	
11		NI	
12		NI	
13		5-NO ₂ -Trp	Baixa intensidade na análise por MS/ESI

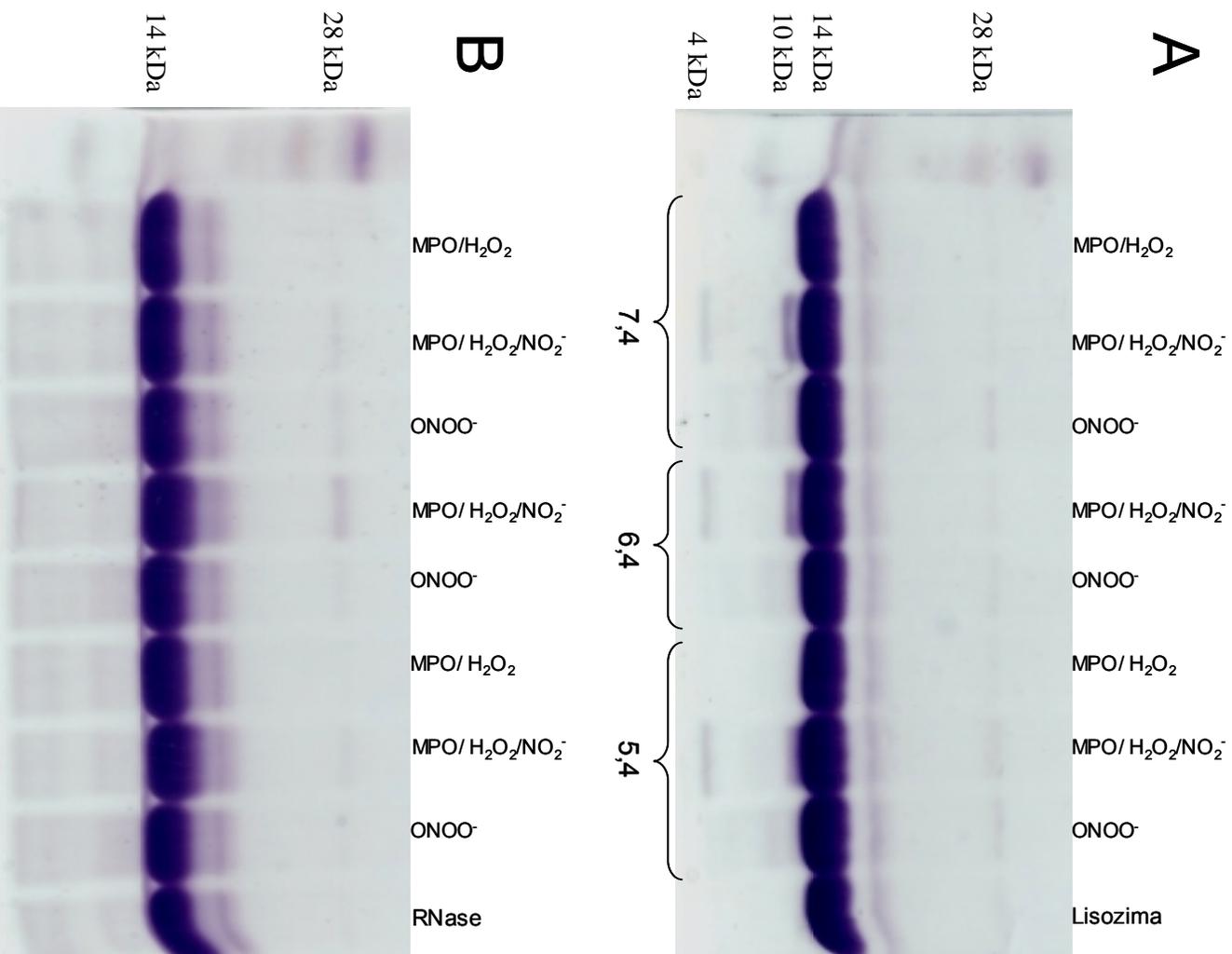


Figura 12. Fragmentação e dimerização das proteínas lisozima e RNase. A, SDS-PAGE da lisozima tratada com MPO/H₂O₂/NO₂⁻ e ONOO⁻ nos pHs 5,4, 6,4 e 7,4. B, idem a (A) para a RNase.

4.1.3. Estimativa do rendimento de produtos de oxidação

Após caracterização de alguns dos produtos formados, aqueles gerados em maiores rendimentos foram quantificados. A quantificação dos produtos de nitração e hidroxilação nas proteínas inteiras foi feita diretamente após os tratamentos pelos métodos espectrofotométricos descritos em Materiais e Métodos. Deve-se ressaltar que a quantificação desses produtos na RNase reflete modificações em resíduos de tirosina, enquanto que para a lisozima reflete a somatória das modificações em resíduos de tirosina e triptofano ($\epsilon_{\text{NO}_2\text{-Tyr}} = 4,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em 430 nm e $\epsilon_{6\text{-NO}_2\text{-Trp}} = 3,32 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em 420 nm) (Suzuki *et al.*, 2004). No caso de 3-NO₂-Tyr e 3-OH-Tyr a quantificação obtida com a proteína intacta foi comparada com a quantificação dos produtos por HPLC-UV após digestão total com ácido (3-OH-Tyr) ou pronase (3-NO₂-Tyr). Os rendimentos dos produtos de Tyr obtidos na RNase intacta ou digerida após os tratamentos ficaram dentro da mesma ordem de grandeza (Tabela 2). Os resultados de produtos hidroxilados obtidos pela metodologia com NBT indicam preferencialmente a formação de 3-OH-Tyr.

No caso do peroxinitrito, maior nitração foi verificada no pH 7,4 (Tabelas 2 e 3), diminuindo cerca de 3 vezes a pH 5,4. O contrário foi verificado para hidroxilação, a qual foi mais eficiente no pH 5,4.

No caso do tratamento com MPO/H₂O₂/NO₂⁻, a formação de produtos nitrados foi maior em pH 5,4 e marginal em pH 7,4 (Tabelas 2 e 3). Estes resultados contrastam com outro na literatura (Brennan *et al.*, 2002), onde os valores de nitração do aminoácido L-tirosina mediada por MPO/H₂O₂/NO₂⁻ foram praticamente os mesmos em pH 5 e 7. Todavia, não se pode esperar o mesmo comportamento da tirosina livre e em proteínas.

A formação de produtos hidroxilados na lisozima e RNase foi estudada em condições de oxigênio normais e com tensões reduzidas de oxigênio (TRO) (Tabelas 2 e

3) para verificar a influência do oxigênio no mecanismo de hidroxilação. Em geral, verifica-se que a hidroxilação é menor nas condições de tensão reduzida de oxigênio nas duas proteínas. Desta forma, pode-se concluir que o oxigênio participa do mecanismo da hidroxilação, embora as etapas envolvidas necessitem ser melhor esclarecidas.

Resumindo, na condição ótima de cada tratamento, a formação de produtos nitrados foi mais efetiva com MPO do que com peroxinitrito. O rendimento de produtos hidroxilados (Tabelas 2 e 3) produzido em ambas proteínas foi maior em meio mais ácido (5,4) para ambos os oxidantes (MPO/H₂O₂/NO₂⁻ e peroxinitrito). A RNase apresentou maior rendimento de 3-OH-Tyr. Os sistemas com tensão reduzida de oxigênio reduziram o rendimento de 3-OH-Tyr para RNase e para a lisozima. A formação de Tyr-Tyr no caso das duas proteínas foi maior a pH 7,4 para o peroxinitrito, mas com MPO a RNase apresentou maior rendimento de dímero a pH 7,4 e a lisozima a pH 5,4.

Tabela 2. Estimativa do rendimento de produtos de oxidação da RNase tratada com peroxinitrito e MPO/H₂O₂/NO₂⁻ (a).

Tratamento (pH)	3-NO ₂ -Tyr μM	3-OH-Tyr μM	3-OH-Tyr (TRO) μM	Tyr-Tyr μM	Total ^(b) μM
MPO (5,4)	308 ± 38 ^(c)	11 ± 1 ^(c)	7,7 ± 0,7	3,0 ± 0,6	322
MPO (6,4)	105 ± 1	10,3 ± 0,2	2,6 ± 0,3	4,5 ± 0,6	119,8
MPO (7,4)	4,1 ± 0,7	1,8 ± 0,7	0	6,8 ± 0,9	12,7
ONOO ⁻ (5,4)	28 ± 2	7,2 ± 0,9	6,1 ± 0,8	2,7 ± 0,6	37,9
ONOO ⁻ (6,4)	46 ± 3	3,5 ± 0,6	2,4 ± 0,2	4,3 ± 0,8	53,6
ONOO ⁻ (7,4)	90 ± 1	3,0 ± 0,6	1,9 ± 0,3	7,6 ± 0,9	100,6

(a) – incubações padrões e análises de 3-NO₂-Tyr, 3-OH-Tyr nas proteínas intactas e de Tyr-Tyr após digestão com pronase (ver Materiais e Métodos).

(b) – somatória dos produtos de nitração, hidroxilação e dímero.

(c) – os valores obtidos para de 3-NO₂-Tyr e 3-OH-Tyr após hidrólise total e análise por HPLC foram respectivamente, 221 e 19 μM.

TRO – tensão reduzida de oxigênio

Tabela 3. Estimativa do rendimento de produtos de oxidação da lisozima tratada com peroxinitrito e MPO/H₂O₂/NO₂⁻ (a).

Tratamento (pH)	Nitração μM	3-OH-Tyr μM	3-OH-Tyr (TRO) μM	Tyr-Tyr μM	Total ^(b) μM
MPO (5,4)	177 ± 31	3,1 ± 0,3	3,3 ± 0,5	4,6 ± 0,6	184,7
MPO (6,4)	148 ± 25	1,9 ± 0,4	1,7 ± 0,2	1,4 ± 0,2	151,3
MPO (7,4)	12,2 ± 0,7	0,5 ± 0,1	0	1,7 ± 0,4	14,4
ONOO ⁻ (5,4)	27,2 ± 0,7	7,3 ± 0,8	6,8 ± 0,8	3,8 ± 0,6	38,3
ONOO ⁻ (6,4)	53 ± 4	2,1 ± 0,4	1,1 ± 0,2	3,3 ± 0,5	58,4
ONOO ⁻ (7,4)	83 ± 6	2,0 ± 0,5	0,44 ± 0,08	4,2 ± 0,5	89,2

(a) – incubações padrões e análises de produtos nitrados e 3-OH-Tyr nas proteínas intactas e de Tyr-Tyr após digestão com pronase (ver Materiais e Métodos).

(b) – somatória dos produtos de nitração, hidroxilação e dímero.

TRO – tensão reduzida de oxigênio

4.1.4 Caracterização dos produtos oxidados por digestão trípica

Para caracterizar os resíduos específicos que foram oxidados e nitrados, as proteínas tratadas foram digeridas com tripsina e os fragmentos trípticos separados por HPLC e analisados por espectrometria de massas/MALDI-ToF. Além das incubações usuais, foram realizadas incubações paralelas em presença de DMPO (100 mM) e DNBNS (10 mM).

A nitração das proteínas RNase e lisozima por MPO/H₂O₂/NO₂⁻ ou peroxinitrito resulta no aumento de 45 unidades de massa em resíduos de tirosina e/ou triptofano. A hidroxilação aumenta 16 unidades e a dimerização dobra o valor da massa (*m/z*). A adição dos captadores de spin DMPO e DNBNS nos sistemas oxidantes com posterior análise por espectrometria de massa pode ajudar a identificar os locais onde ocorreram formação de radicais protéicos. As massas identificadas por MS/MALDI-ToF da análise dos fragmentos de digestão trípica foram comparadas àquelas fornecidas pela digestão *in silico* geradas pelo site: <http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/>. A digestão *in silico* foi realizada a partir das condições experimentais utilizadas durante a digestão trípica nas quais as cisteínas foram alquiladas com ácido iodoacético e os resíduos de metionina oxidados. Em alguns casos, certos fragmentos apresentaram mais de uma massa. Isto ocorreu, pois alguns resíduos de metionina não foram oxidados e/ou a digestão não foi completa, identificando-se, neste caso, massas de dois fragmentos juntos.

A análise da mistura de fragmentos trípticos por MS/MALDI-ToF permite localizar os resíduos que sofreram alterações mas não permite quantificar os fragmentos alterados. Desta forma, não foi possível estabelecer quais resíduos sofrem oxidação e nitração preferencialmente. Muitas das massas identificadas não foram atribuídas e uma quantificação relativa não foi possível. Para suplantar esses problemas, foi realizada a separação dos fragmentos por HPLC para posterior análise por MS/MALDI-ToF.

Os cromatogramas obtidos para a lisozima são mostrados nas Figs. 13-18 e na Tabela 4 são apresentadas as massas localizadas em cada tempo de retenção para os fragmentos trípticos da lisozima não tratada. Vale ressaltar que apesar dos picos estarem com boa resolução, cada tempo de retenção apresentou mais de uma massa identificada o que dificultou a análise dos resultados. Além da relação entre tempo de retenção e massa (m/z), foi verificado também o espectro no UV em cada tempo de retenção para se avaliar o espectro predominante do fragmento tríptico e a pureza do composto.

As figuras 13 e 14 mostram que os fragmentos trípticos nitrados em maior extensão com 1 mM de peroxinitrito foram aqueles que contém os resíduos Tyr²⁰ (Fig. 15B, TR = 13,7 min), o resíduo Trp⁶²/Trp⁶³ (Fig. 15B, TR = 15,8 min), Trp¹²³ (Fig. 15B, TR = 19,5 min) e os resíduos Tyr²³/Trp²⁸ (Fig. 15B, TR = 20,8 min). Além disso, houve formação de quinurenina no fragmento que contém Trp⁶²/Trp⁶³ e Trp¹²³ (aumento na intensidade dos picos no TR = 15,3 e 21,8 min na Fig. 14B) e de dímero em Trp⁶²/Trp⁶³ (Fig. 14B, TR = 18,4 min).

A presença dos captadores de spin DMPO e DNBNS não alterou de forma significativa o perfil cromatográfico, mas reduziu a intensidade dos fragmentos modificados (Fig. 15B, C e D). No caso do DMPO no tempo de retenção 9 min (Fig. 13C) foi verificada a presença de DMPO puro. Na presença de DNBNS foi verificada redução na intensidade dos picos que representam nitração (Fig. 15B e D). A redução na intensidade do pico em 17,5 min (Fig. 14B e D) indica reação do Trp¹²³ e/ou Trp¹⁰⁸/Trp¹¹¹ que forma um radical-aduto com massa detectada no tempo de retenção 20,1 min (Fig. 15D). Além desta, a massa do captador com Tyr²³/Trp²⁸ e Trp¹⁰⁸/Trp¹¹¹ também foi detectada em 26,1 min.

Comparando os cromatogramas da lisozima nativa com a tratada pelo sistema MPO/H₂O₂/NO₂⁻ (Fig. 16-18), verifica-se redução dos fragmentos trípticos que

contém os resíduos Trp⁶²/Trp⁶³ na forma nativa (Fig. 16 e 17A e B em 15,0 min). A massa detectada em 21,0 min (Fig. 18A e B) foi atribuída a nitração do fragmento que contém Trp⁶²/Trp⁶³, que é o principal alvo da nitração pelo sistema com MPO. Ocorreu também redução dos fragmentos que contém os resíduos Tyr²³/Trp²⁸ na forma nativa (Fig. 17A e B em 17,7 min) onde foi detectada nitração (Fig. 18B). Não foram detectadas alterações significativas na intensidade dos picos atribuídos aos fragmentos com os resíduos Tyr²⁰, Tyr⁵³ e Trp¹²³. Além das alterações descritas, foram localizadas massas relacionadas as seguintes oxidações: 2 hidroxilações no Trp⁶²/Trp⁶³ (Fig. 17B, TR = 14 min) e formação de quinurenina em Trp¹²³ (Fig. 17B, TR = 21,8 min).

A presença dos captadores DMPO e DNBNS não alterou o perfil cromatográfico verificado para as oxidações sem os captadores (mesmo comportamento apresentado pela série com peroxinitrito). Entretanto, os picos atribuídos a nitração foram inibidos, o que significa que os captadores reagiram com os radicais precursores da nitração. Verifica-se uma redução na intensidade do pico atribuído ao fragmento que contém os resíduos Trp⁶²/Trp⁶³ e Tyr²³/Trp²⁸ indicando formação de aduto nestes resíduos (Fig. 17B e C, TR = 15,3 min). Além disso, foram localizadas massas correspondentes a adutos com DMPO nos fragmentos que contém os resíduos Tyr²⁰ e Trp¹²³ (Fig. 17C e D, TR = 12,5 e 14 min).

Para o DNBNS ocorreu inibição dos picos nitrados no fragmento contendo Tyr²³/Trp²⁸ (Fig. 18B e D) e a diminuição dos picos nativos indica formação de adutos nos fragmentos com os resíduos Trp⁶²/Trp⁶³, Tyr²³/Trp²⁸ e Trp¹²³ ou Trp¹⁰⁸/Trp¹¹¹, mas as massas relativas aos fragmentos correspondentes não foram identificadas.

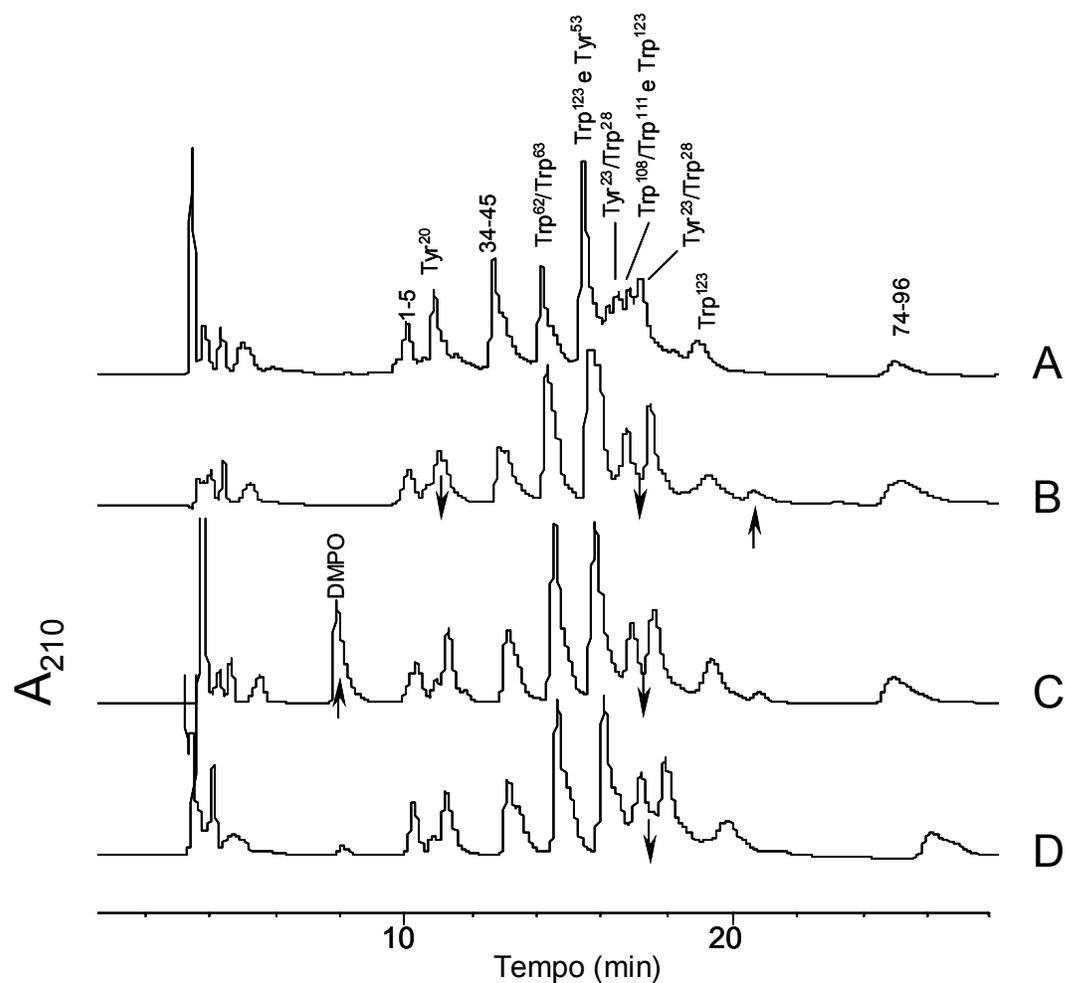


Figura 13. Cromatogramas dos fragmentos trípticos da lisozima intacta e tratada com peroxinitrito detectados a 210 nm. A, lisozima nativa. B, tratamento com 1 mM ONOO⁻. C, idem ao B com 100 mM DMPO. D, idem ao B com 10 mM DBNBS. Os peptídeos foram eluídos utilizando-se uma coluna de fase reversa C18 usando um gradiente linear de acetonitrila conforme descrito em Materiais e Métodos. As flechas indicam as modificações mais relevantes.

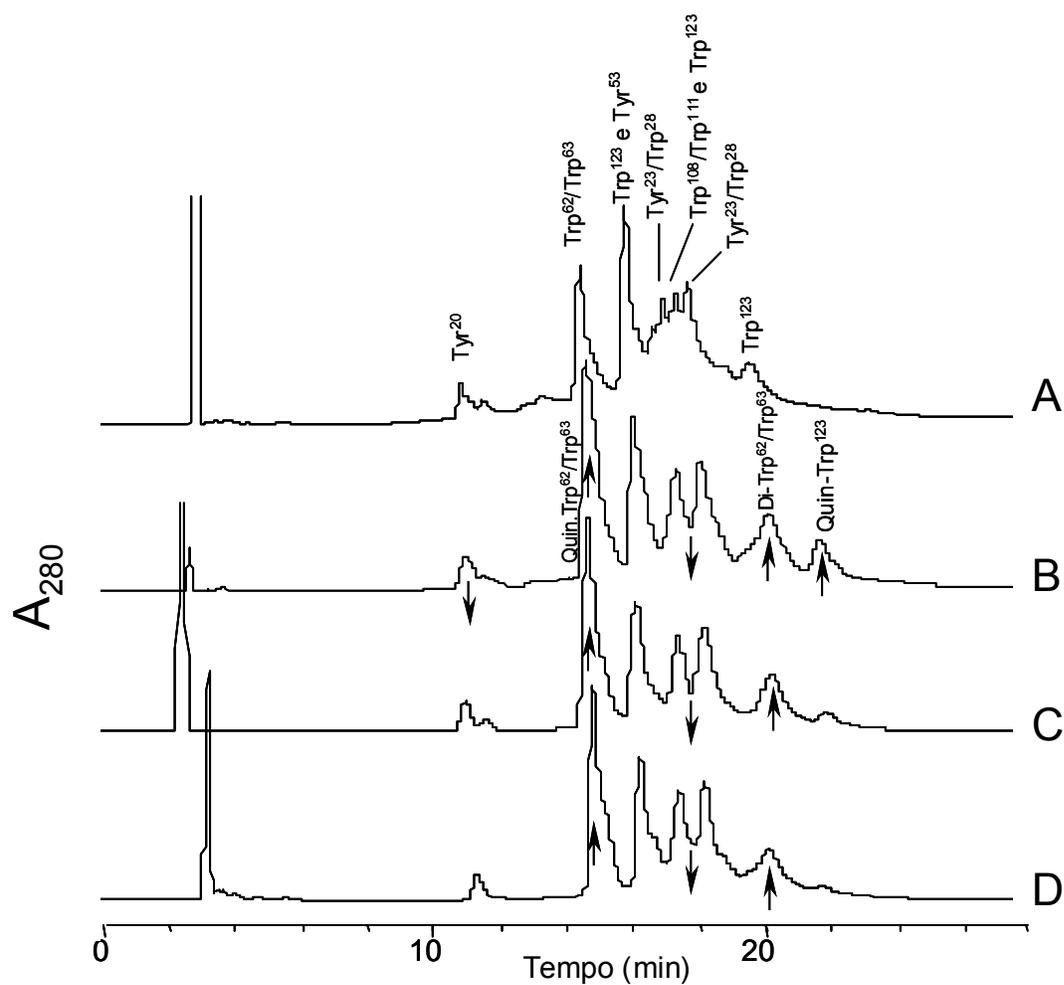


Figura 14. Cromatogramas dos fragmentos trípticos da lisozima intacta e tratada com peroxinitrito detectados a 280 nm. A, lisozima nativa. B, tratamento com 1 mM ONOO⁻. C, idem ao B com 100 mM DMPO. D, idem ao B com 10 mM DBNBS. Os peptídeos foram eluídos utilizando-se uma coluna de fase reversa C18 usando um gradiente linear de acetonitrila conforme descrito em Materiais e Métodos. As flechas indicam as modificações mais relevantes.

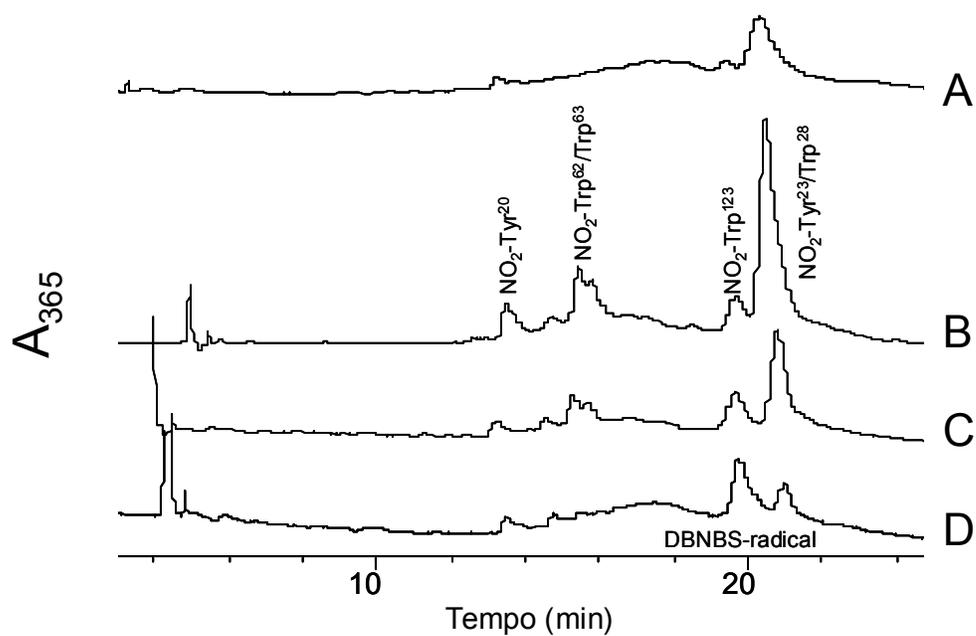


Figura 15. Cromatogramas dos fragmentos trípticos da lisozima intacta e tratada com peroxinitrito detectados a 365 nm. A, lisozima nativa. B, tratamento com 1 mM ONOO⁻. C, idem ao B com 100 mM DMPO. D, idem ao B com 10 mM DBNBS. Os peptídeos foram eluídos utilizando-se uma coluna de fase reversa C18 usando um gradiente linear de acetonitrila conforme descrito em Materiais e Métodos.

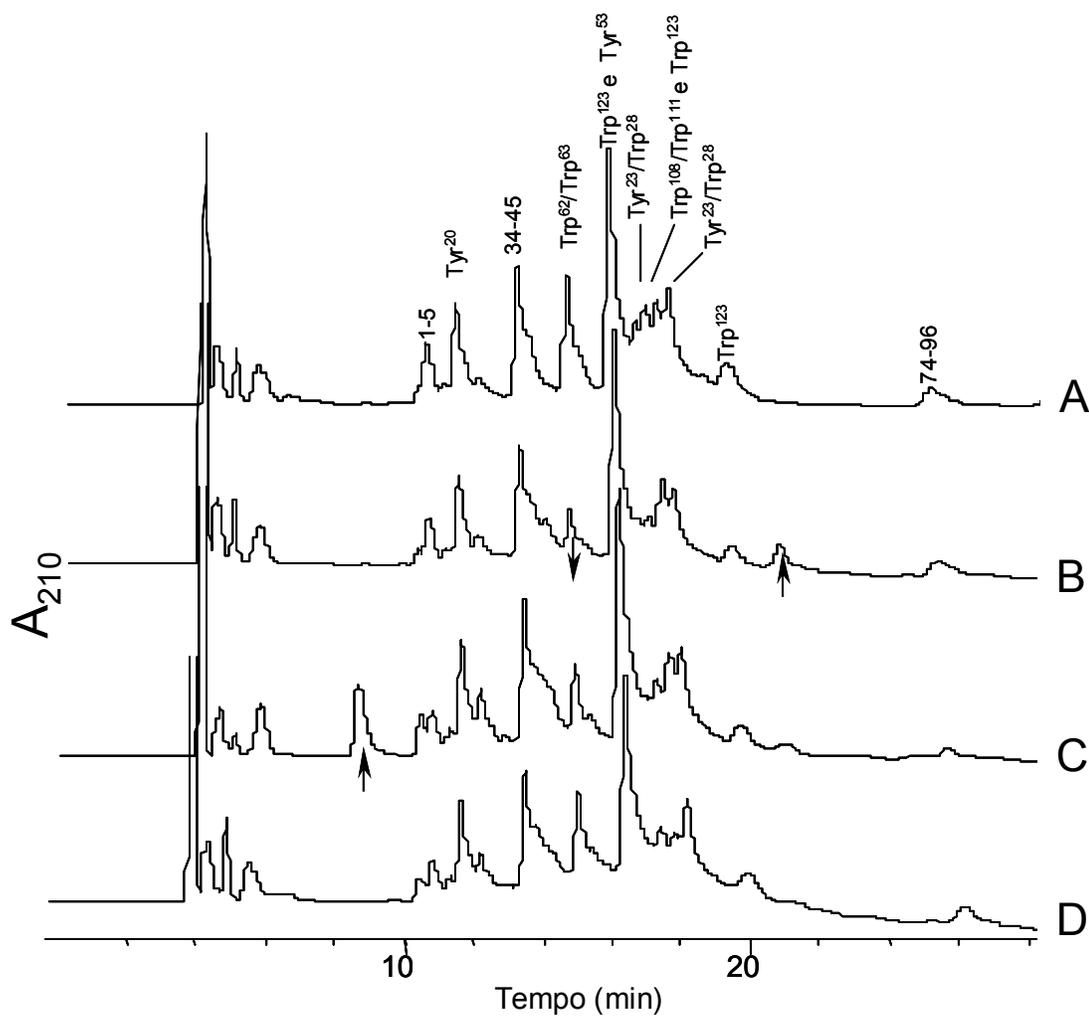


Figura 16. Cromatogramas dos fragmentos trípticos da lisozima intacta e tratada com MPO/H₂O₂/NO₂⁻ detectados a 210 nm. A, lisozima nativa. B, tratamento com MPO/H₂O₂/NO₂⁻. C, idem ao B com 100 mM DMPO. D, idem ao B com 10 mM DNBBS. Os peptídeos foram eluídos utilizando-se uma coluna de fase reversa C18 usando um gradiente linear de acetonitrila conforme descrito em Materiais e Métodos. As flechas indicam as modificações mais relevantes.

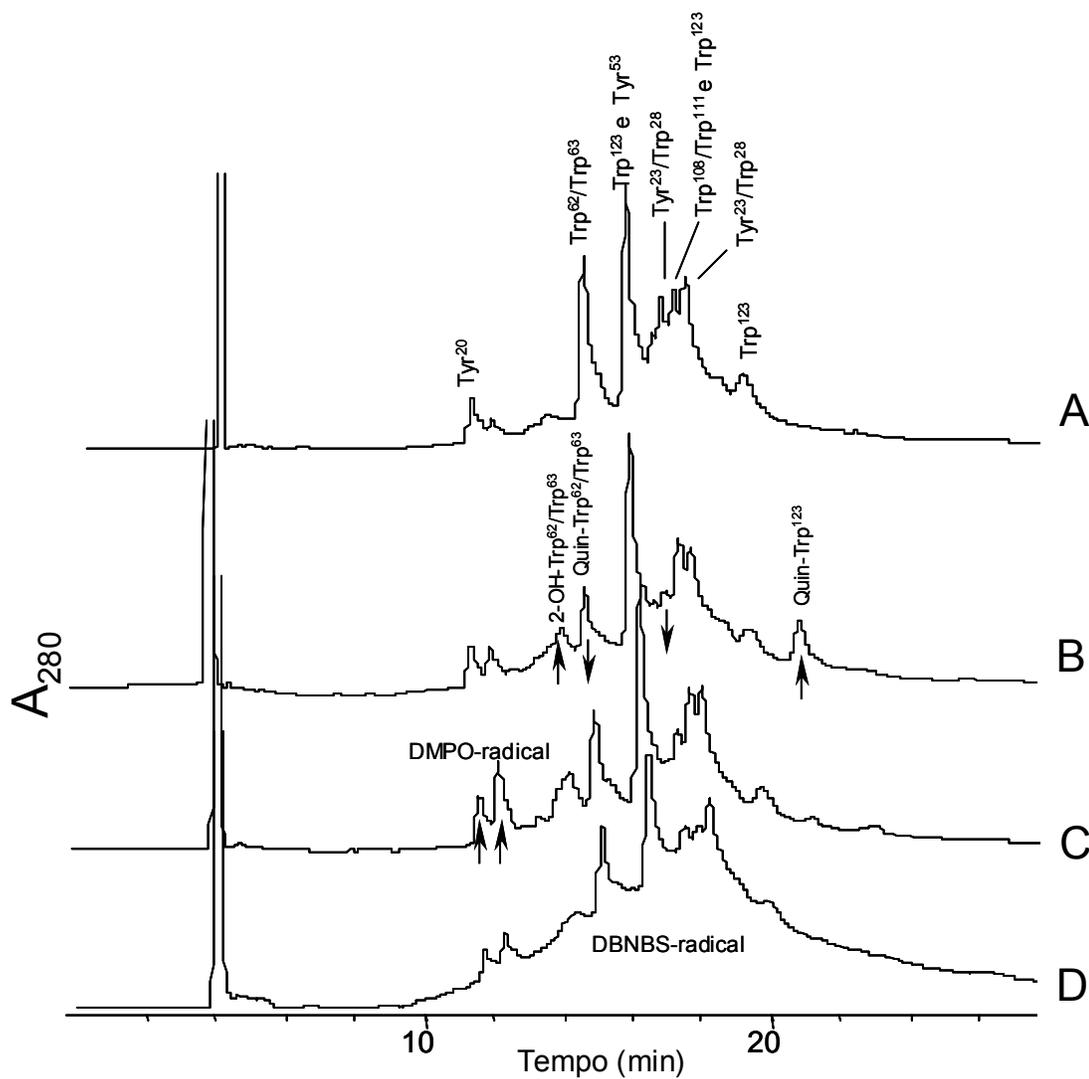


Figura 17. Cromatogramas dos fragmentos trípticos da lisozima intacta e tratada com MPO/H₂O₂/NO₂⁻ detectados a 280 nm. A, lisozima nativa. B, tratamento com MPO/H₂O₂/NO₂⁻. C, idem ao B com 100 mM DMPO. D, idem ao B com 10 mM DBNBS. Os peptídeos foram eluídos utilizando-se uma coluna de fase reversa C18 usando um gradiente linear de acetonitrila conforme descrito em Materiais e Métodos. As flechas indicam as modificações mais relevantes.

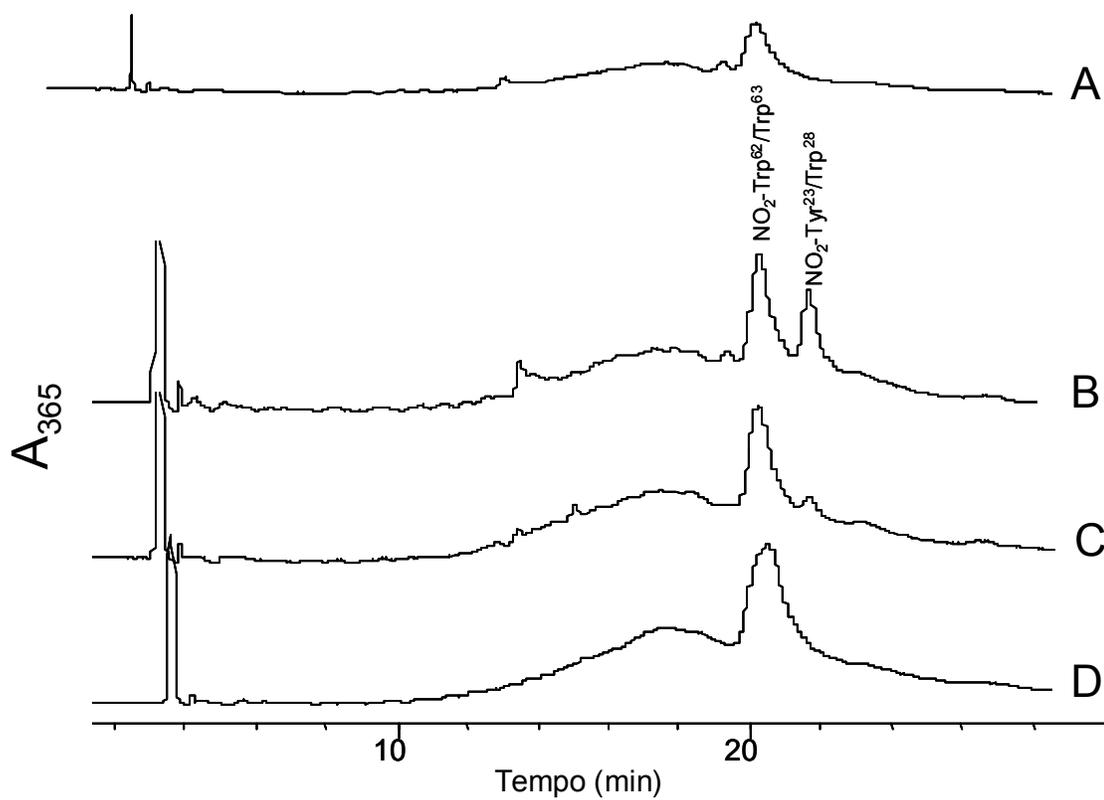


Figura 18. Cromatogramas dos fragmentos tripticos da lisozima intacta e tratada com MPO/H₂O₂/NO₂⁻ detectados a 365 nm. A, lisozima nativa. B, tratamento com MPO/H₂O₂/NO₂⁻. C, idem ao B com 100 mM DMPO. D, idem ao B com 10 mM DBNBS. Os peptídeos foram eluídos utilizando-se uma coluna de fase reversa C18 usando um gradiente linear de acetonitrila conforme descrito em Materiais e Métodos.

Tabela 4. Massas (m/z) dos fragmentos trípticos de lisozima tratada com peroxinitrito e MPO/H₂O₂/NO₂⁻ separados por HPLC/MS/MALDI-ToF.

Tempo de retenção (min)	Resíduos (Massa principal)
Até 6	69-73 (517) / 113-116 (520, 578)
11	1-5 (606)
12	Tyr ²⁰ (874)
13,7	34-45 (1428)
14,3	34-45 (1428)
15,3	Trp ⁶² Trp ⁶³ (936, 994)
16,6	Trp ¹²³ (1045) / Tyr ⁵³ (1754)
17,7	Tyr ²³ Trp ²⁸ (1268) / Trp ¹⁰⁸ Trp ¹¹¹ (1676, 1692)
18,1	Trp ¹⁰⁸ Trp ¹¹¹ (1805, 1821) / Trp ¹²³ (1334)
18,5	Tyr ²³ Trp ²⁸ (1326)
19,5	Tyr ²³ Trp ²⁸ (1326)
26,5	74-96 (2511)

A RNase foi analisada de maneira similar à lisozima mas as condições cromatográficas foram alteradas. O tempo para separação dos fragmentos foi aumentado e o gradiente médio de B foi reduzido de 1,22%/min para 0,69%/min. Os resultados da separação por HPLC são mostrados nas Figs. 19-24 e na Tabela 5 são apresentadas as massas localizadas em cada tempo de retenção para os fragmentos trípticos da RNase não tratada. Também neste caso, apesar dos picos estarem com boa resolução, cada tempo de retenção apresentou mais de uma massa identificada, o que dificultou a análise dos resultados.

A comparação entre o perfil cromatográfico dos fragmentos trípticos da RNase nativa e tratada com peroxinitrito indica redução na intensidade dos picos relativos aos fragmentos contendo Tyr⁷³/Tyr⁷⁶ e Tyr¹¹⁵ (Fig. 20A e B, TR = 19 e 49 min). Um aumento em 12 min (Figs. 19 e 20A e B) indicou fragmentos hidroxilados principalmente no fragmento que contém os resíduos Tyr⁷³/Tyr⁷⁶. Os fragmentos

nitrados em maior extensão com 1 mM de peroxinitrito foram os que contém o resíduo Tyr¹¹⁵ (Fig. 21B, TR = 52 min), os resíduos Tyr⁹²/Tyr⁹⁷ (Fig. 21B, TR = 17 e 20 min) e os resíduos Tyr⁷³/Tyr⁷⁶ (Fig. 21B, TR = 30 min). Além disso, houve formação de dímeros nitrados no fragmento contendo os resíduos Tyr⁹²/Tyr⁹⁷ (Fig. 21B, TR = 46 min).

Na presença do captador de spin DMPO houve redução dos picos nitrados (Fig. 21C, TR = 20, 30 e 52 min). O aumento do pico no TR = 30 min (Fig. 20C) foi identificado como de massa correspondente à formação de radical-aduto no fragmento que contém os resíduos Tyr⁹²/Tyr⁹⁷. Na presença de DBNBS ocorreu inibição da nitração mais acentuada que o verificado para o captador DMPO com redução na intensidade dos picos que representam nitração (Fig. 21B, C e D). Embora tenha sido verificada uma redução acentuada na intensidade do pico relativo a nitração do resíduo Tyr¹¹⁵, não foi identificado radical-aduto neste resíduo. Radical-aduto foi identificado no fragmento que contém os resíduos Tyr⁷³/Tyr⁷⁶ (Fig. 20D, TR = 45 min).

Comparando os cromatogramas da RNase nativa com a tratada pelo sistema MPO/H₂O₂/NO₂⁻ (Figs. 22-24), verificou-se redução na intensidade do pico relativo ao fragmento que contém os resíduos Tyr⁷³/Tyr⁷⁶ na forma nativa (Fig. 22 e 23A e B, TR = 25 min), indicando que foram oxidados/nitrados. Em 280 nm (Fig. 23) identificou-se aumento nas áreas dos picos relativas aos fragmentos que contém os resíduos Tyr⁹²/Tyr⁹⁷ e Tyr⁷³/Tyr⁷⁶ (TR = 13 e 30 min). Foram constatadas modificações relativas à oxidação, dimerização e nitração principalmente no fragmento que contém os resíduos Tyr⁹²/Tyr⁹⁷. Além disso, foram detectados picos em 47 e 50 min (Figs. 23B e 24B) indicando nitração do fragmento que contém dímero em Tyr⁹²/Tyr⁹⁷ e resíduo Tyr¹¹⁵, respectivamente. Foram verificados vários produtos de nitração (Fig. 24B) e analisando-se as áreas relativas às massas detectadas verificou-se que todos os resíduos de tirosina foram nitrados com intensidades similares, exceto Tyr²⁵, que foi nitrada em

menor extensão. Em termos gerais, o fragmento que contém os resíduos Tyr⁹²/Tyr⁹⁷ sofreu o maior número de modificações oxidativas, embora seja difícil indicar o principal alvo da nitração nestas condições. Procuramos, então, reduzir a concentração de nitrito para 0,5 e 0,25 mM.

Ao contrário do esperado, a redução do nitrito não resultou em redução significativa na intensidade de nenhum alvo, principalmente entre as concentrações de 0,5 e 1 mM (Fig. 24E e 24B). Comparando-se 0,25, 0,5 e 1 mM de NO₂⁻ (Fig. 24F, 24E e 24B), a área dos picos relativos às massas dos produtos hidroxilados e dimerizados não sofreu alteração significativa. No entanto, os fragmentos contendo os resíduos nitrados Tyr²⁵ e Tyr¹¹⁵ (TR = 25 e 50 min) e Tyr⁹²/Tyr⁹⁷ (TR = 20 min) e Tyr⁷³/Tyr⁷⁶ com dupla nitração (TR = 29 min) foram os que maior aumento tiveram com o aumento na concentração de nitrito. Desta forma, conclui-se que os produtos de oxidação/nitração das concentrações 0,5 e 1 mM são similares e somente com a concentração de 0,25 mM pode-se distinguir alguma preferência. Verifica-se que os fragmentos que contém resíduos com menores acessibilidades (Tyr⁹²/Tyr⁹⁷, Tyr²⁵ e Tyr⁷³/Tyr⁷⁶) (ver Discussão) foram nitrados em maior extensão com maiores concentrações de nitrito, indicando tendência na nitração de resíduos mais acessíveis pela MPO.

A presença dos captadores DMPO e DNBNS não alterou o perfil cromatográfico da oxidação da RNase mediada por MPO (Fig. 22 e 23B, C e D). Entretanto, os picos atribuídos a nitração foram inibidos, o que significa que os captadores reagiram com os radicais que deram origem aos produtos. De fato, verificou-se redução na intensidade do pico atribuído ao fragmento que contém os resíduos Tyr⁷³/Tyr⁷⁶ nitrado(s) indicando formação de radical-aduto nestes fragmentos (Fig. 23B, C e D, TR = 25 min). No caso do DMPO, radicais foram localizadas massas de radical-aduto nos fragmentos que contém os resíduos Tyr⁹²/Tyr⁹⁷ (Fig. 23B e C, TR = 45 min). No caso do DNBNS ocorreu formação de radicais adutos nos fragmentos com os

resíduos Tyr⁹²/Tyr⁹⁷ e Tyr²⁵ (identificados na Fig. 23, TR = 40-60 min). Comparando-se os dois captadores verifica-se que no caso do DNBNS houve maior captação de radicais que com o DMPO.

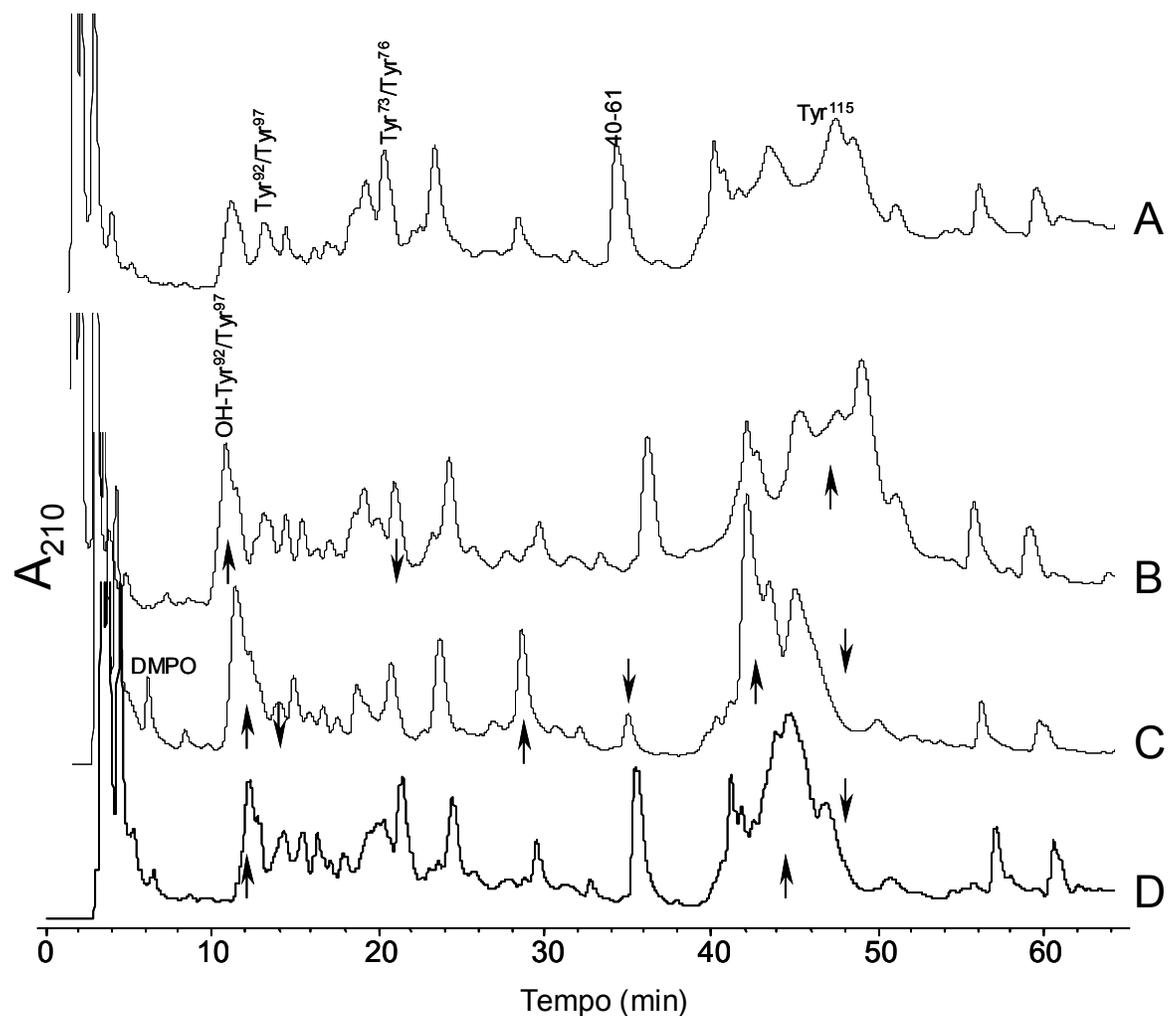


Figura 19. Cromatogramas dos fragmentos trípticos da RNase intacta e tratada com peroxinitrito detectados a 210 nm. A, RNase nativa. B, tratamento com 1 mM ONOO⁻. C, idem ao B com 100 mM DMPO. D, idem ao B com 10 mM DNBBS. Os peptídeos foram eluídos utilizando-se uma coluna de fase reversa C18 usando um gradiente linear de acetonitrila conforme descrito em Materiais e Métodos. As flechas indicam as modificações mais relevantes.

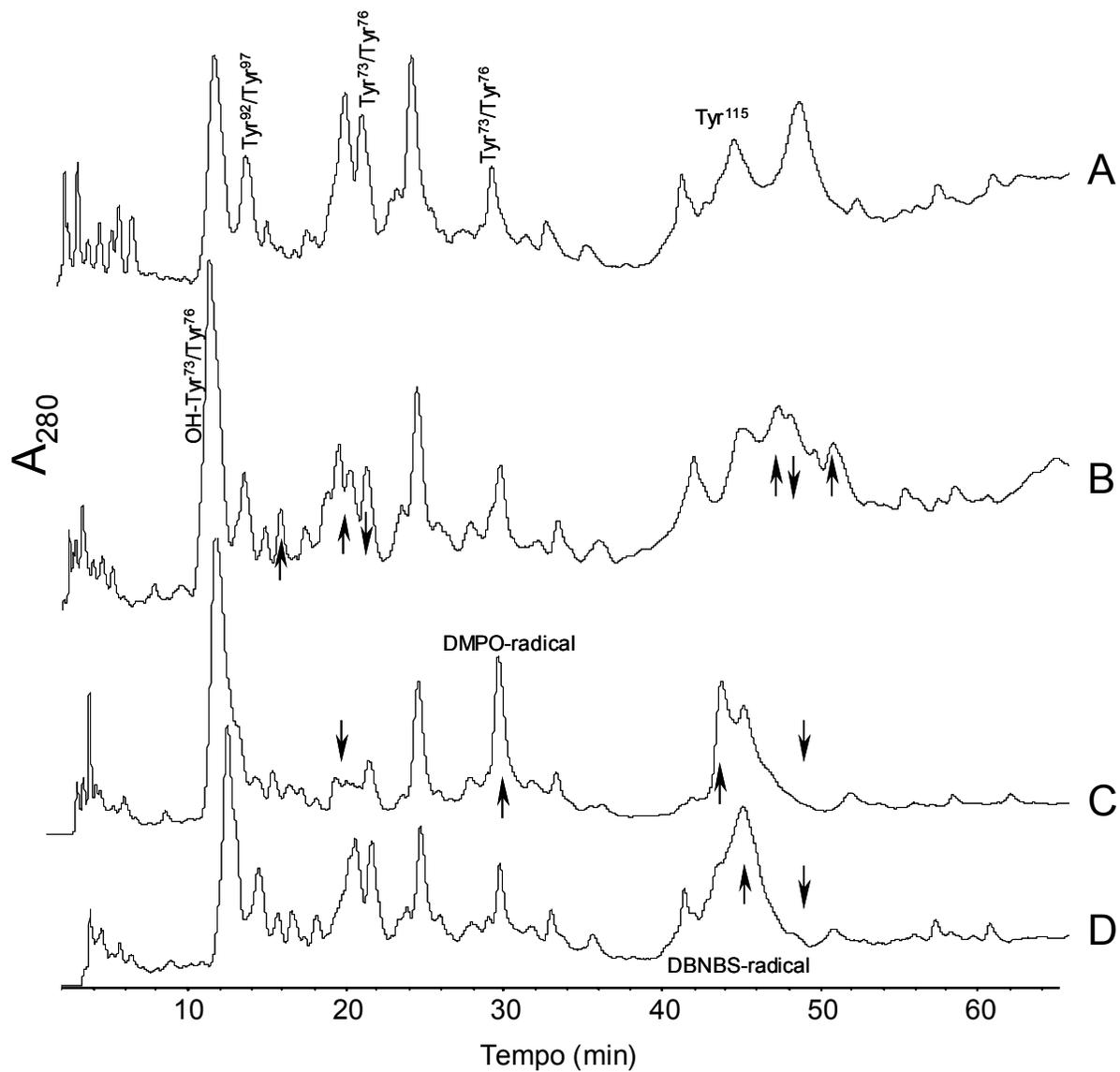


Figura 20. Cromatogramas dos fragmentos tripticos da RNase intacta e tratada com peroxinitrito detectados a 280 nm. A, RNase nativa. B, tratamento com ONOO⁻. C, idem ao B com 100 mM DMPO. D, idem ao B com 10 mM DBNBS. Os peptídeos foram eluídos utilizando-se uma coluna de fase reversa C18 usando um gradiente linear de acetonitrila conforme descrito em Materiais e Métodos. As flechas indicam as modificações mais relevantes.

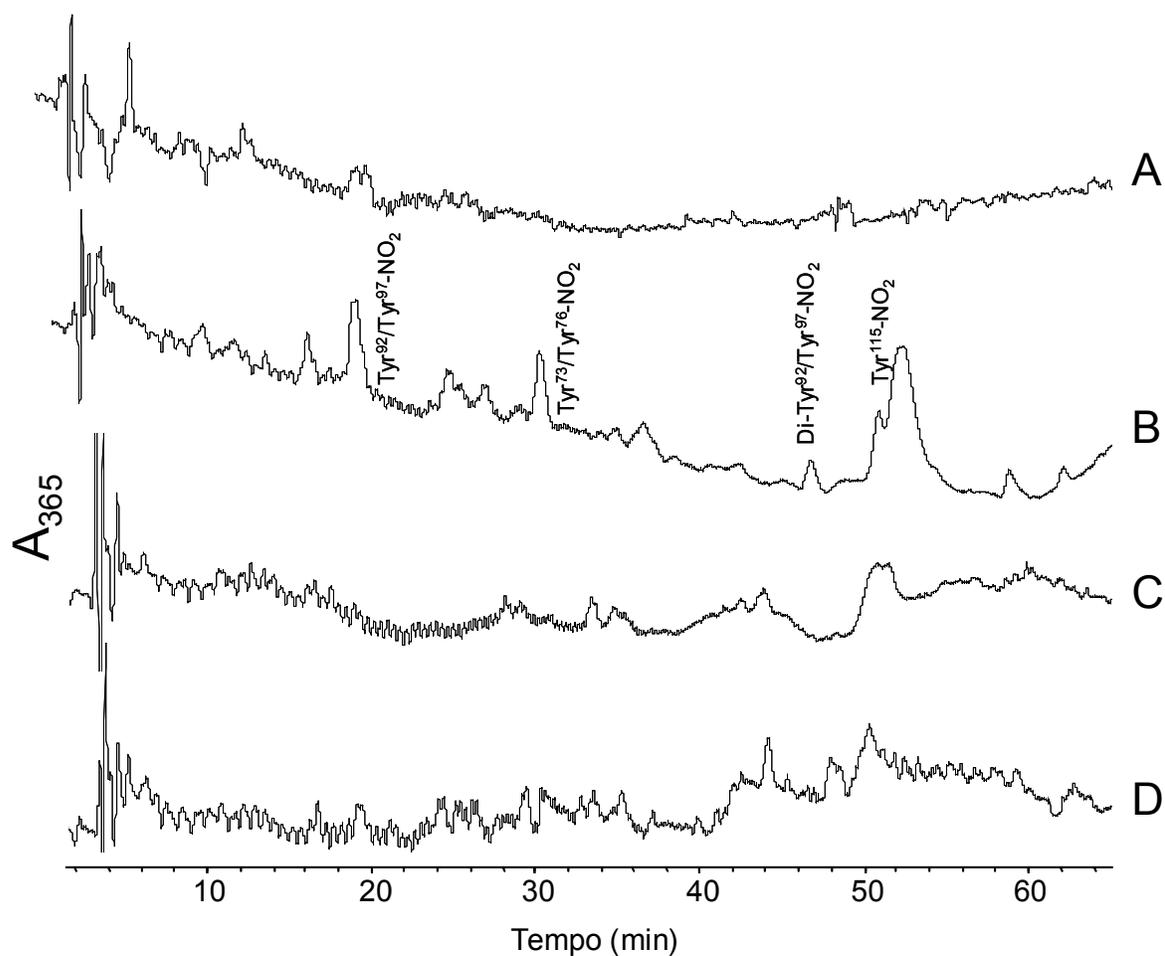


Figura 21. Cromatogramas dos fragmentos trípticos da RNase intacta e tratada com peroxinitrito detectados a 365 nm. A, RNase nativa. B, tratamento com 1 mM ONOO⁻. C, idem ao B com 100 mM DMPO. D, idem ao B com 10 mM DNBNS. Os peptídeos foram eluídos utilizando-se uma coluna de fase reversa C18 usando um gradiente linear de acetonitrila conforme descrito em Materiais e Métodos.

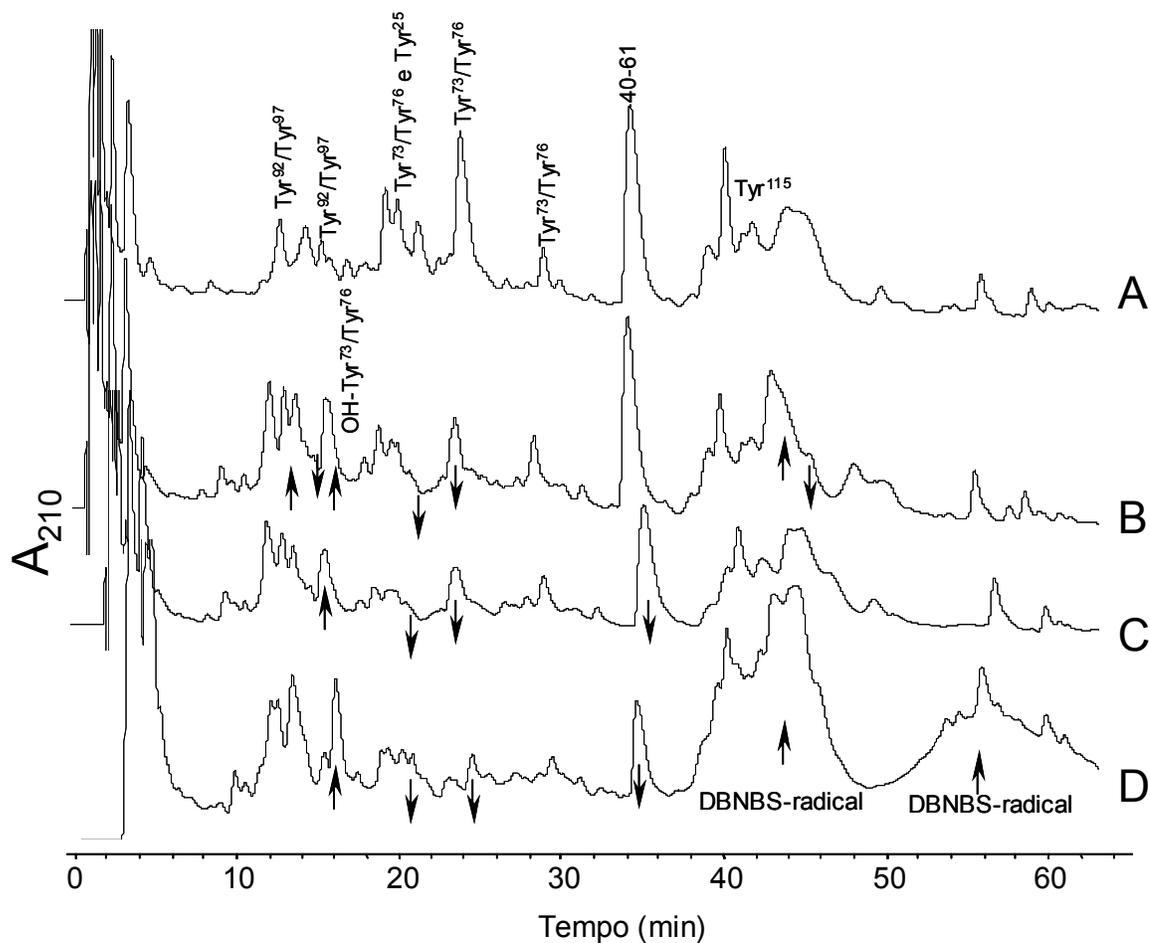


Figura 22. Cromatogramas dos fragmentos tripticos da RNase intacta e tratada com MPO/H₂O₂/NO₂⁻ detectados a 210 nm. A, RNase nativa. B, tratamento com MPO/H₂O₂/NO₂⁻. C, idem ao B com 100 mM DMPO. D, idem ao B com 10 mM DNBBS. Os peptídeos foram eluídos utilizando-se uma coluna de fase reversa C18 usando um gradiente linear de acetonitrila conforme descrito em Materiais e Métodos. As flechas indicam as modificações mais relevantes.

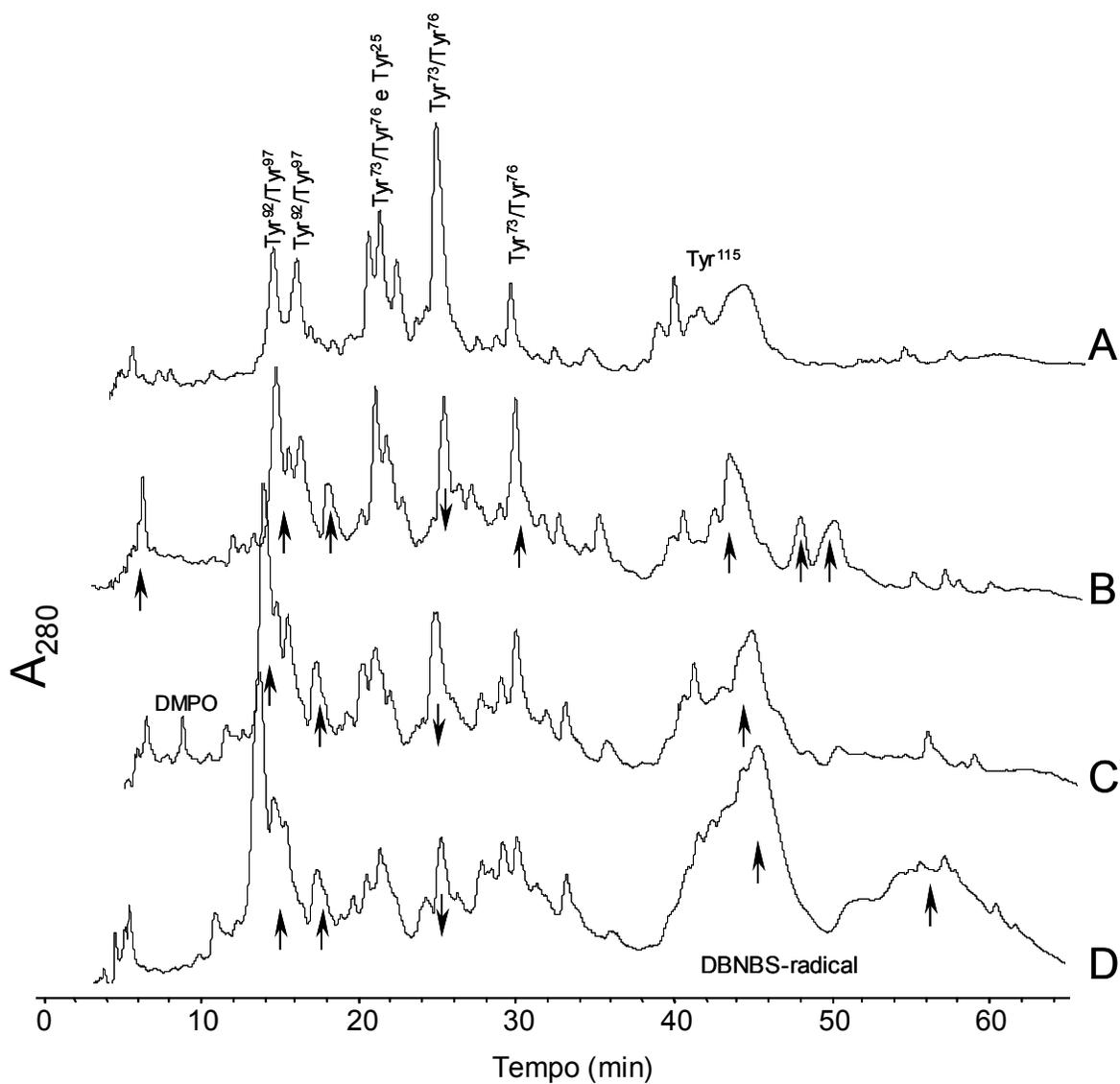


Figura 23. Cromatogramas dos fragmentos trípticos da RNase intacta e tratada com MPO/H₂O₂/NO₂⁻ detectados a 280 nm. A, RNase nativa. B, tratamento com MPO/H₂O₂/NO₂⁻. C, idem ao B com 100 mM DMPO. D, idem ao B com 10 mM DBNBS. Os peptídeos foram eluídos utilizando-se uma coluna de fase reversa C18 usando um gradiente linear de acetonitrila conforme descrito em Materiais e Métodos. As flechas indicam as modificações mais relevantes.

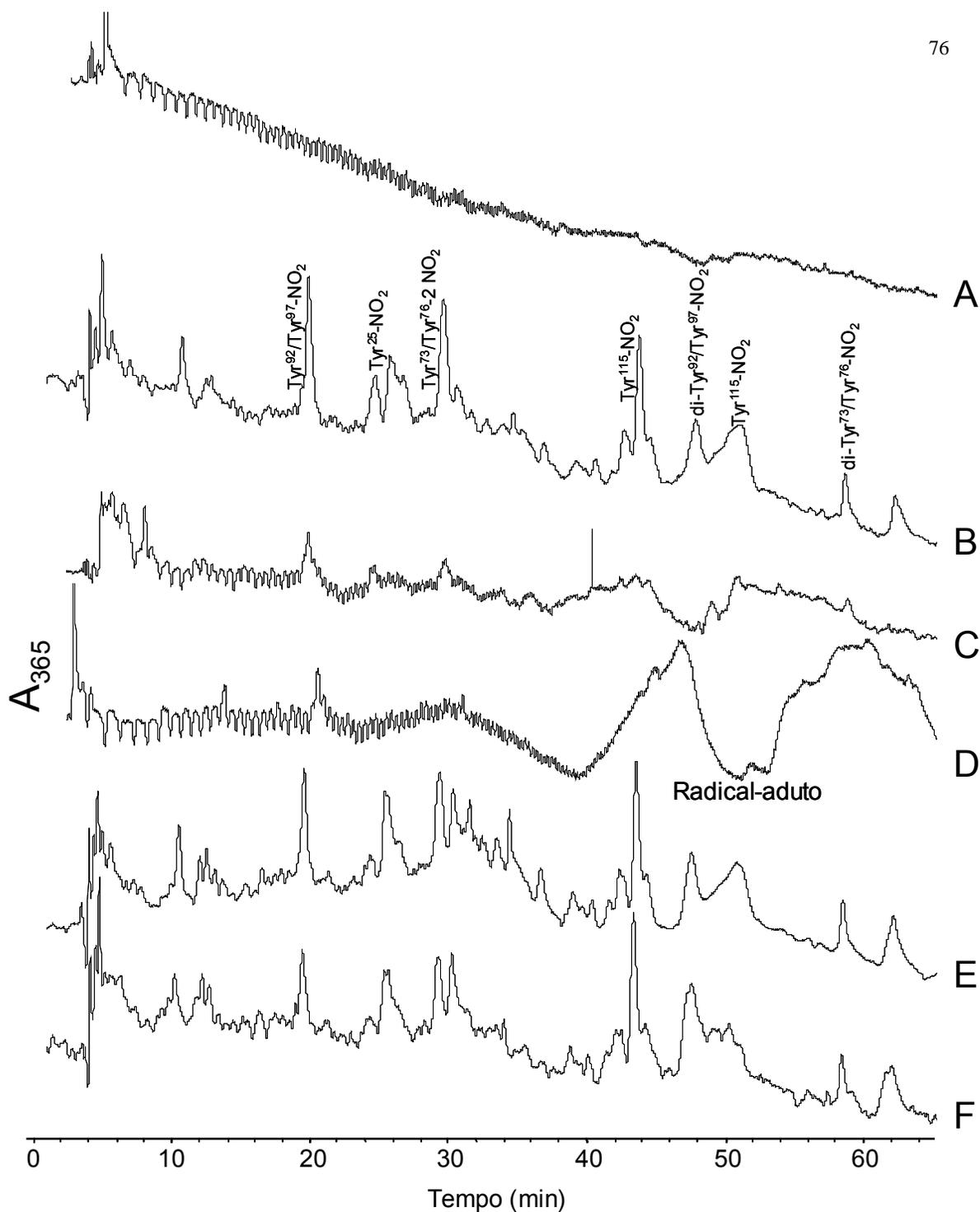


Figura 24. Cromatogramas dos fragmentos trípticos da RNase intacta e tratada com MPO/H₂O₂/NO₂⁻ detectados a 365 nm. A, RNase nativa. B, tratamento com MPO/H₂O₂/NO₂⁻ (1 mM). C, idem ao B com 100 mM DMPO. D, idem ao B com 10 mM DBNBS. E, idem ao B com NO₂⁻ (0,5 mM). F, idem ao B com NO₂⁻ (0,25 mM). Os peptídeos foram eluídos utilizando-se uma coluna de fase reversa C18 usando um gradiente linear de acetonitrila conforme descrito em Materiais e Métodos.

Tabela 5. Massas dos fragmentos trípticos de RNase tratada com peroxinitrito e MPO/H₂O₂/NO₂⁻ separados por HPLC/MALDI-ToF.

Tempo de retenção (min)	Resíduos (Massa principal - Da)
6,6	34-39 (752) / (718) / (662)
9	1-7 ou 32-37 (718) / 99-104 (662)
10	Tyr ^{92/97} (858) / 2-10 (1023)
13,3	Tyr ^{92/97} (916)
15	Tyr ^{92/97} (858 e 916) / Tyr ^{73/76} (2287)
19	Tyr ^{73/76} (2189) / Tyr ²⁵ (2365)
21	Tyr ^{73/76} (2189) / Tyr ²⁵ (2365)
21,6	Tyr ²⁵ (2365)
25	Tyr ^{73/76} (2189, 2171 e 2764) / Tyr ¹¹⁵ (2167)
29,5	Tyr ^{73/76} (2289 e 2171)
36	40-61 (2402)
41	Tyr ¹¹⁵ (2167) / Tyr ^{73/76} (2700)
45	Tyr ¹¹⁵ (2226) / 40-61 (2520)
49	Tyr ¹¹⁵ (2164, 2226) / 40-61 (2520)
55	40-61 (2520) / Tyr ¹¹⁵ (2167)
> 57	Picos de digestão incompleta

4.2. Efeitos inibitórios do tempol sobre a nitração da RNase mediada por peroxidases

Compreender os mecanismos pelos quais o tempol protege animais experimentais da injúria associada a condições inflamatórias tem sido um dos objetivos do nosso grupo de pesquisa. Previamente, estudamos a interação de tempol com peroxinitrito e radicais dele derivados (Bonini *et al.*, 2002; Fernandes *et al.*, 2005). Aqui, examinamos os efeitos do tempol sobre a nitração de RNase mediada por peroxidases.

Além da MPO, empregamos HRP (peroxidase de raiz forte) nas mesmas condições experimentais descritas no item 4.1. A quantificação de 3-NO₂-Tyr foi feita na proteína inteira por espectrofotometria. Embora menos sensível ao pH, a nitração mediada por HRP foi maior a pH 6,4 (Fig. 25). Notavelmente, concentrações de nanomolar de MPO foram tão eficientes quanto concentrações de micromolar de HRP para a nitração de resíduos de tirosina, evidenciando o papel central que a nitração mediada por MPO pode ter em condições inflamatórias. Apesar da diferença de eficiência entre MPO e HRP, os efeitos do tempol sobre a nitração de resíduos de tirosina na RNase foram observados para ambas as peroxidases conforme descrito a seguir.

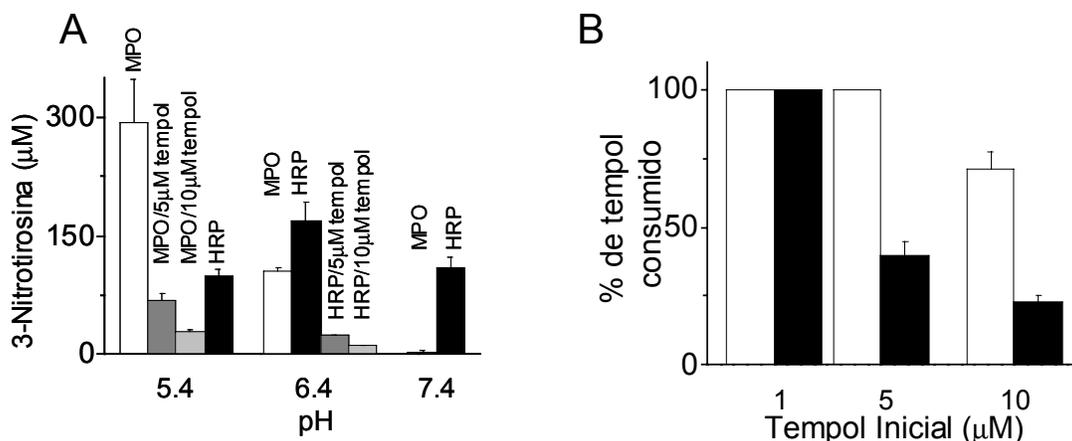


Figura 25. Efeito inibitório do tempol sobre a nitração da RNase mediada por peroxidases. A, produção de 3-nitrotirosina na RNase (370 µM) após 40 ou 60 min de incubação com 1 mM de H₂O₂, 1 mM de NO₂⁻ e 30 nM (10 unidades/ml) de MPO ou 10 µM (450 unidades/ml) de HRP, respectivamente, na ausência ou presença de tempol no pH especificado e 37°C. B, porcentagem de tempol consumido em função da sua concentração inicial nas incubações acima descritas contendo MPO em pH 5,4 (barras brancas) ou HRP em pH 6,4 (barras pretas). O consumo de tempol foi monitorado pelo decaimento de seu espectro de EPR. Os valores mostrados são médias ± SD de três experimentos independentes.

Os dados indicam que, em termos estequiométricos, a MPO nitrou quase um resíduo de tirosina (294 µM) por molécula de RNase (370 µM) no pH 5,4. Na presença de concentrações de tempol da ordem de micromolar (5-10 µM), a nitração da RNase mediada por MPO e HRP foi quase completamente inibida (Fig. 25). Os efeitos inibitórios do tempol foram observados sob todas as condições de nitração da RNase testadas, mas a maioria dos experimentos subsequentes foi realizado no valor de pH onde foi verificada a máxima nitração, isto é, pH 5,4 e 6,4 para MPO e HRP, respectivamente. A atividade peroxidásica em pHs baixos é relevante, pois ambientes ácidos são encontrados na superfície das células, fagolisossomos de células fagocíticas e tecidos com isquemia.

As baixas concentrações de tempol (5-10 µM) necessárias para inibir a nitração da RNase sugerem que ele poderia estar agindo cataliticamente. Entretanto, o tempol foi parcial ou totalmente consumido dependendo da concentração inicial,

conforme monitorado pelo espectro de EPR das incubações finais (Fig. 26). Nas incubações contendo MPO, o tempol foi completamente consumido nas concentrações de 1 e 5 μM , ao passo que aproximadamente 3 μM permaneceu nas incubações iniciadas com 10 μM de tempol (Fig. 26B). Uma possibilidade para explicar o consumo do tempol é pela reação de recombinação com o radical RNase-tirosila (equação 16, Tabela 7) (Fernandes *et al.*, 2005; Wright & English, 2003). Para testar esta possibilidade, o efeito de tempol sobre o rendimento de radical-aduto DNBBS/RNase foi examinado. Como já descrito, incubações de RNase com MPO/H₂O₂/NO₂⁻ na presença de DNBBS produzem um espectro consistente com o radical-aduto DNBBS/proteína-tirosila (Fig. 5).

Em presença de 10 μM tempol, o rendimento do radical-aduto DNBBS/proteína-tirosila foi reduzido em 50% como indicado pela altura do pico do radical-aduto que não coincide com as linhas do tempol (marcado na Fig. 26). Este resultado indica que o tempol em concentrações da ordem de micromolar compete com concentrações milimolar de DNBBS pelo radical RNase-tirosila. Tal fato está de acordo com as constantes de velocidade de segunda ordem conhecidas para as reações de nitróxidos e DNBBS com radicais centrados em carbono (Wright & English, 2003). Seguindo a menor eficiência da HRP em nitrar a RNase comparada à MPO, o consumo de tempol (Fig. 25) e a formação de radical RNase-tirosila (Fig. 26C) foram muito menores nas incubações contendo HRP.

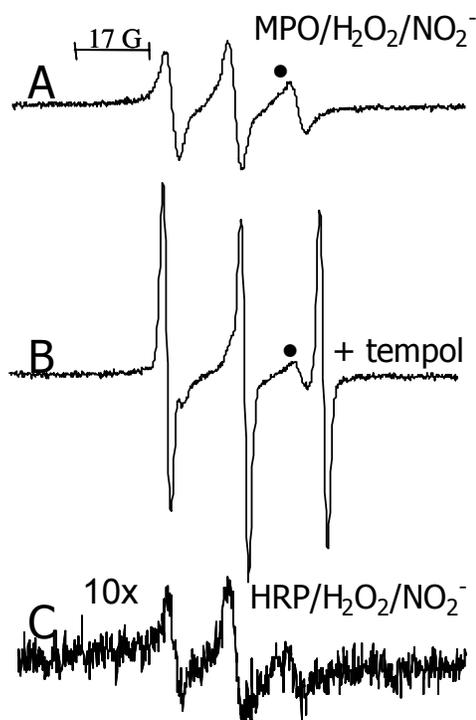


Figura 26. Efeito do tempol sobre a produção de radical RNase-tirosila mediada por peroxidases. A, espectro de EPR obtido após 40 min de incubação de misturas padrão (370 μM de RNase, 30 nM (10 unidade/ml) de MPO, 1 mM de H_2O_2 e 1 mM de NO_2^- pH 5,4, 37°C) na presença de 10 mM de DBNBS. B, mesmo que (A), na presença de 10 μM de tempol. C, espectro de EPR obtido após 60 min de incubação da mistura padrão para HRP (370 μM de RNase, 10 μM (450 unidade/ml) de HRP, 1 mM de H_2O_2 e 1 mM de NO_2^- pH 6,4, 37°C) na presença de 10 mM de DBNBS. Os círculos indicam o pico do espectro utilizado para estimar o efeito inibitório do tempol. Condições instrumentais: potência do microondas: 20 mW; constante de tempo: 327,7 ms; tempo de varredura: 335,5 s; amplitude de modulação: 1,0 G; ganho: $1,26 \times 10^5$ exceto para (C) que foi multiplicado por 10 como especificado na figura.

Em seguida, verificou-se o efeito do tempol sobre o consumo de substratos e a formação de produtos. Nas incubações contendo MPO, quase todo H_2O_2 (Fig. 27A) e menos da metade do NO_2^- (Fig. 27B) foram consumidos em aproximadamente 5-10 min na ausência do tempol. A presença do tempol inibiu o consumo de NO_2^- (Fig. 27B) ao passo que o consumo de H_2O_2 permaneceu similar no início, mas foi mais rápido ao final da reação (Fig. 27A). Resultados similares foram obtidos com a HRP, embora o

consumo de H_2O_2 e NO_2^- tenha sido muito mais lento (Fig. 28A e B). Após 40 min, aproximadamente 0,5 mM de H_2O_2 foi consumido tanto na presença como ausência do tempol e 0,3 e 0,1 mM de NO_2^- foram consumidos na presença e ausência do nitróxido, respectivamente (Fig. 28A e B). O reduzido efeito do tempol no consumo de H_2O_2 , quando comparado ao seu pronunciado efeito no consumo de NO_2^- (Figs. 27B e 28B) e na nitrificação da RNase (Fig. 25) indicam que o H_2O_2 foi consumido em outros processos além da oxidação/nitrificação da RNase. Uma possibilidade seria a decomposição do H_2O_2 a oxigênio molecular como anteriormente descrito (Krishna *et al.*, 1996). De fato, o tempol aumentou a liberação de oxigênio pelas incubações (Figs. 27C e 28C). Para garantir uma medida mais precisa da liberação de oxigênio, cuja solubilidade em solução aquosa é em torno de 0,2 mM, concentrações menores de H_2O_2 (0,3 e 0,4 mM) foram empregadas nas incubações contendo MPO visto que este sistema consome todo H_2O_2 presente (Fig. 27C). Na presença de tempol, o oxigênio liberado foi sempre um quarto do H_2O_2 consumido. Desta forma, 0,3 e 0,4 mM de H_2O_2 produziram em torno de 0,075 e 0,1 mM de oxigênio, respectivamente. Por extrapolação, pudemos estimar que 1 mM de H_2O_2 (Fig. 27C) produziriam 0,25 mM de oxigênio. Nas incubações contendo HRP, a liberação de oxigênio ocorreu mesmo na ausência do tempol, e aproximadamente metade do H_2O_2 consumido (0,5 mM) produziu oxigênio (0,25 mM) após 40 min na sua presença (Fig. 28C).

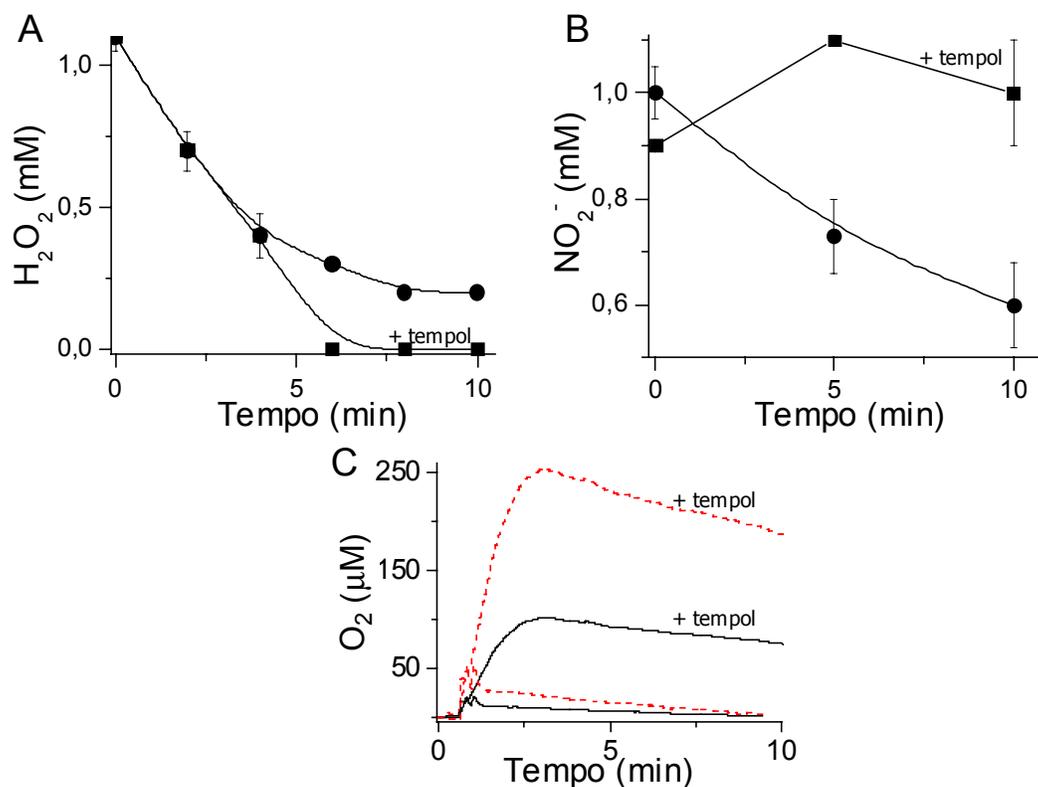


Figura 27. Efeitos do tempol sobre o consumo de H_2O_2 e NO_2^- e liberação de oxigênio pelas incubac es contendo MPO. A, consumo de H_2O_2 em função do tempo na ausência (\bullet) e presenç a (\blacksquare) de 10 μM de tempol. As incubac es padrões foram 370 μM de RNase, 30 nM (10 unidades/ml) de MPO, 1 mM de H_2O_2 e 1 mM de NO_2^- pH 5,4 e 37 C. B, consumo de NO_2^- em função do tempo nas incubac es padrões na ausência (\bullet) e presenç a (\blacksquare) de 10 μM de tempol. C, liberação de oxigênio em função do tempo nas incubac es contendo 370 μM de RNase, 30 nM (10 unidades/ml) de MPO, 0,4 mM de H_2O_2 e 1 mM de NO_2^- pH 5,4 e 37 C na ausência e presenç a de 10 μM de tempol conforme especificado na figura. As curvas cheias são os dados experimentais, ao passo que as curvas tracejadas foram calculadas multiplicando as curvas experimentais por 2,5. Isto foi necessário para estimar a liberação de oxigênio nas condições padrão dos experimentos (1 mM de H_2O_2). As curvas experimentais foram obtidas com 0,4 mM de H_2O_2 devido   solubilidade limitada do oxigênio em soluções aquosas. As análises de H_2O_2 e NO_2^- foram realizadas aliquotando-se as incubac es nos tempos especificados e submetendo-os aos ensaios enzimático e de quimioluminescência, respectivamente. Os valores são m dias \pm SD de três experimentos independentes.

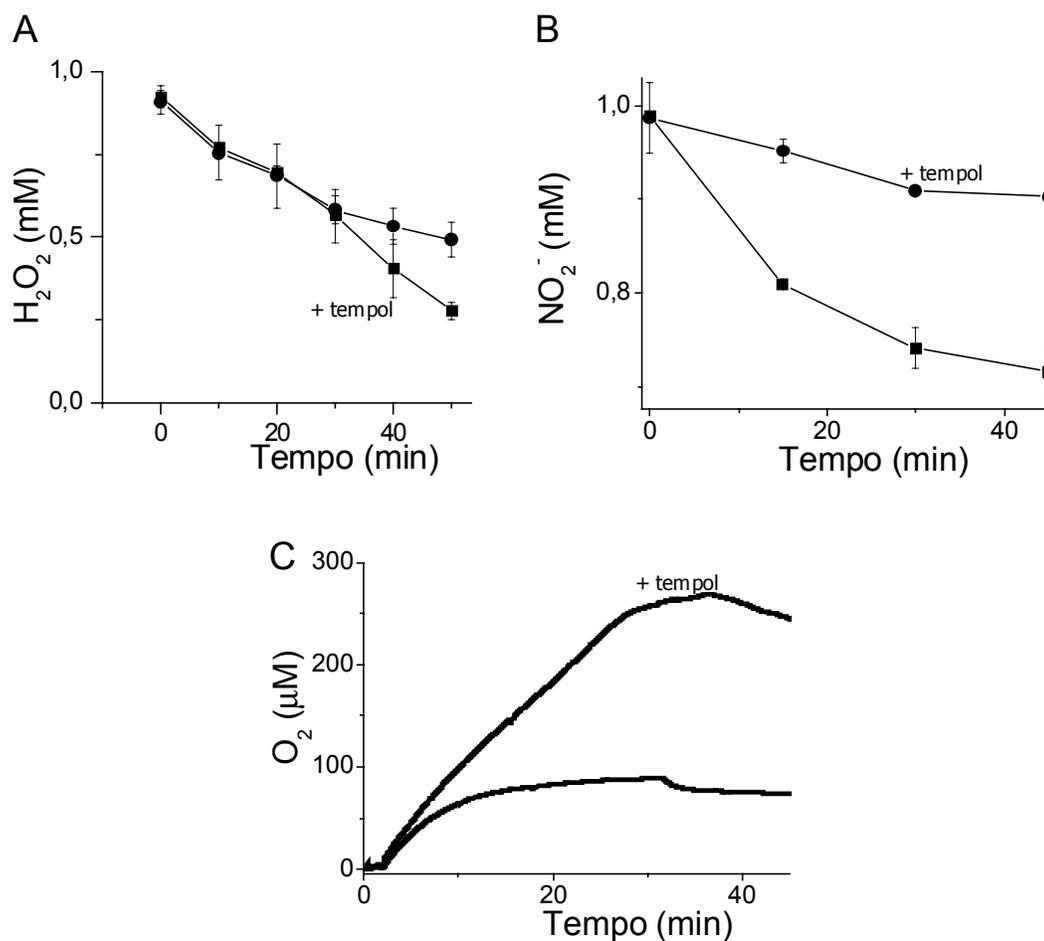


Figura 28. Efeitos do tempol no consumo de H₂O₂ e NO₂⁻ e liberação de oxigênio nas incubações contendo HRP. A, consumo de H₂O₂ em função do tempo na ausência (•) e presença (▪) de 10 µM de tempol. As incubações padrões foram 370 µM de RNase, 10 mM (450 unidades/ml) de HRP, 1 mM de H₂O₂ e 1 mM de NO₂⁻ pH 6,4 e 37°C. B, consumo de NO₂⁻ em função do tempo nas incubações padrões na ausência (•) e presença (▪) de 10 µM de tempol. C, liberação de oxigênio em função do tempo nas incubações na ausência e presença de 10 µM de tempol conforme especificado na figura. As análises de H₂O₂ e NO₂⁻ foram realizadas alíquotando-se as incubações nos tempos especificados e submetendo-as aos ensaios enzimático e de quimioluminescência, respectivamente. Os valores são médias ± SD de três experimentos independentes.

Em seguida foram realizados estudos cinéticos da reação de tempol com as peroxidases. Embora as propriedades da MPO e da HRP variem consideravelmente, possuem ciclos catalíticos similares envolvendo a produção de estados ferrila (MPO-I e MPO-II e HRP-I e HRP-II) que oxidam diferentes substratos como NO_2^- e tirosina com constantes de velocidade de segunda ordem já determinadas sob várias condições experimentais (Furtmüller *et al.*, 2006; Jantschko *et al.*, 2002). Neste trabalho, determinamos as constantes de velocidade de segunda ordem da reação do tempol com MPO-I (Fig. 29A), MPO-II (Fig. 29B), HRP-I (Fig. 30A) e HRP-II (Fig. 30B) pelo método de fluxo interrompido. Os valores das constantes de velocidade determinadas (k) estão na Tabela 6 e concordam com os dados reportados para a maioria dos substratos que reagem com MPO-I apresentando constantes variando entre 10^6 e $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, enquanto reagem com MPO-II, HRP-I e HRP-II com constantes usualmente menores e mais variadas (Jantschko *et al.*, 2002). O valor encontrado para a reação do tempol com MPO-I ($k = 3,8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) é alto, mas comparável a outros substratos endógenos e exógenos. Apesar dos outros experimentos do estudo terem sido realizados a 37°C e pH 5,4 e 6,4 para MPO e HRP, respectivamente, os estudos cinéticos com MPO foram realizados em pH 7,4 e 25°C para minimizar erros devido a possibilidade das reações se tornarem muito rápidas para serem monitoradas pelo equipamento de fluxo interrompido. Considerando que as reações radicalares têm baixas energias de ativação, e que os valores das constantes de velocidades com HRP não variaram significativamente em pHs 6,4 e 7,4 (Tabela 6), os valores das constantes de velocidades foram considerados aplicáveis para simulações cinéticas.

Para melhor compreensão dos efeitos inibitórios do tempol na nitração da RNase mediada por MPO, simulações cinéticas foram realizadas com o software Gepasi 3.3 (Mendes, 1997) empregando as reações e constantes de velocidades correspondentes especificadas na Tabela 7 (Goldstein *et al.*, 2003a e b; Marquez *et al.*,

1994; Burner *et al.*, 2000; Marquez & Dunford, 1995; Kettle & Winterbourn, 2001; Prutz *et al.*, 1985; Hunter *et al.*, 1989; Jin *et al.*, 1993; Mallard *et al.*, 1998; Goldstein & Samuni, 2007). Uma concordância razoável foi obtida entre os dados experimentais e a simulação da variação da concentração de substratos e produtos com o tempo (Fig. 31A e B).

A maior discrepância obtida entre os dados experimentais e a simulação foi em relação à concentração de oxigênio liberado. Entretanto, o oxigênio liberado obtido experimentalmente foi determinado por extrapolação devido à limitada solubilidade do oxigênio em soluções aquosas (Fig. 27C). Também, reações paralelas podem ocorrer nas incubações contendo MPO e muitas das constantes de velocidade de segunda ordem utilizadas não foram obtidas nas condições experimentais deste trabalho (Tabelas 7 e 8). Então, a concordância obtida pode ser considerada razoável e informativa, visto que permite o teste de quais reações seriam importantes para explicar os efeitos do tempol. As reações do tempol com MPO-I e MPO-II afetaram marginalmente os dados de simulação e desta forma, não possuem papel representativo na inibição da nitração da RNase mediada por MPO. Da mesma forma, os efeitos do tempol na inibição da nitração da RNase mediada pela HRP foram razoavelmente simulados e se mostraram independentes das reações do tempol com HRP-I e HRP-II (Fig. 32 e Tabela 9).

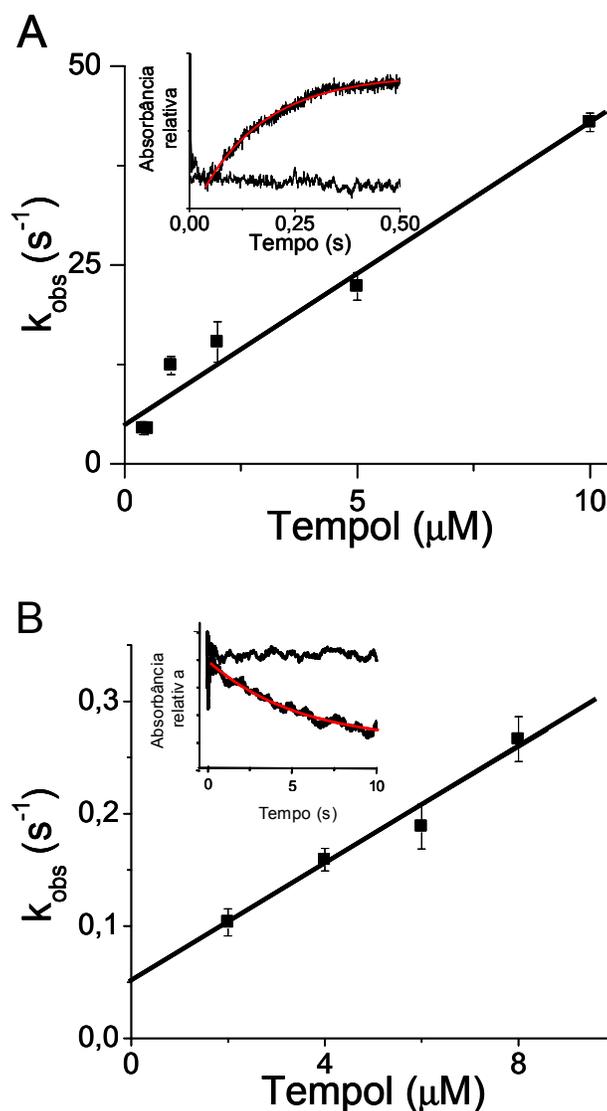


Figura 29. Determinação das constantes de velocidade de segunda ordem das reações do tempol com os compostos I e II da MPO. A, a constante de velocidade de pseudo-primeira ordem do tempol com a MPO-I foi determinada realizando-se uma pré mistura de $0,2 \mu\text{M}$ de MPO com $4 \mu\text{M}$ de H_2O_2 em $0,2 \text{ M}$ de tampão fosfato, pH 7,4. B, a MPO-II foi preparada realizando-se uma pré-mistura de $0,2 \mu\text{M}$ de MPO com $0,2 \mu\text{M}$ de H_2O_2 em $0,2 \text{ M}$ de tampão fosfato, pH 7,4. Após um tempo de espera de $0,5 \text{ s}$, MPO-I e MPO-II reagiram com as concentrações de tempol especificadas (pelo menos 10 vezes maiores que a da MPO-I mas não tão maiores para evitar condições de estado estacionário). As reações em função do tempo foram monitoradas em 456 nm e as inserções mostram uma curva típica e o ajuste matemático obtido com $2 \mu\text{M}$ de tempol. As constantes de segunda ordem aparentes foram calculadas pela inclinação da reta obtida utilizando análise de regressão linear. As inserções mostram uma curva típica e o ajuste matemático obtido com $2 \mu\text{M}$ de tempol.

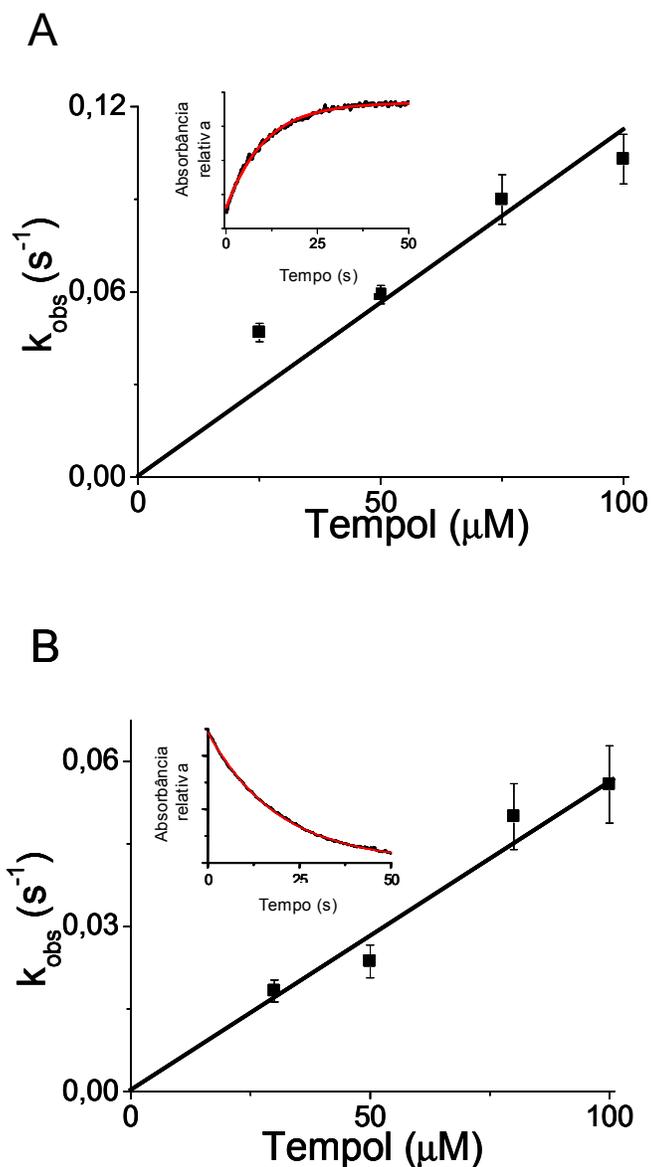


Figura 30. Determinação das constantes de velocidade de segunda ordem para as reações do tempol com os compostos I e II da HRP. A, as constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem para MPO-I com tempol foram determinadas realizando-se uma pré-mistura de 3 μM de HRP com 3 μM de H_2O_2 em 0,2 M de tampão fosfato, pH 6,4 ou 7,4 a 25°C. Após um tempo de espera de 1 s, a HRP-I reagiu com as concentrações de tempol especificadas (pelo menos 10 vezes maiores que a da HRP-I). B, a HRP-II foi preparada realizando-se uma pré-mistura de 3 μM de HRP com 3 μM de H_2O_2 e 3 μM de ferrocianeto de potássio em 0,1 M de tampão fosfato, pH 6,4 ou 7,4 a 25°C. Após um tempo de espera de 2,5 s, a HRP-II formada foi misturada com diferentes concentrações de tempol. As reações com o tempo foram monitoradas em 411 nm para HRP-I e 425 nm para HRP-II e as inserções mostram uma curva típica e o ajuste matemático obtido com 50 μM de tempol. As constantes de segunda ordem aparentes foram calculadas pela inclinação da reta obtida utilizando análise de regressão linear.

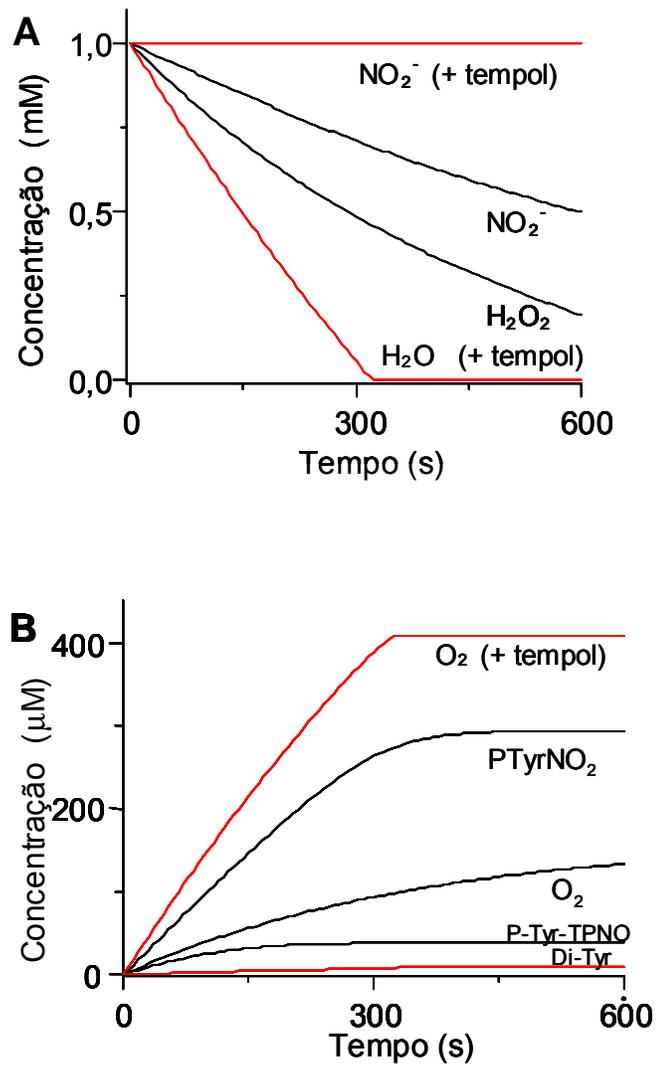


Figura 31. Simulação cinética do consumo de substratos e formação de produtos nas incubações contendo MPO na presença e ausência de tempol. A, consumo de substratos em incubações contendo MPO na ausência e presença de 10 μM de tempol simulados pelo software Gepasi 3.3. B, formação de produtos simulados em paralelo ao (A).

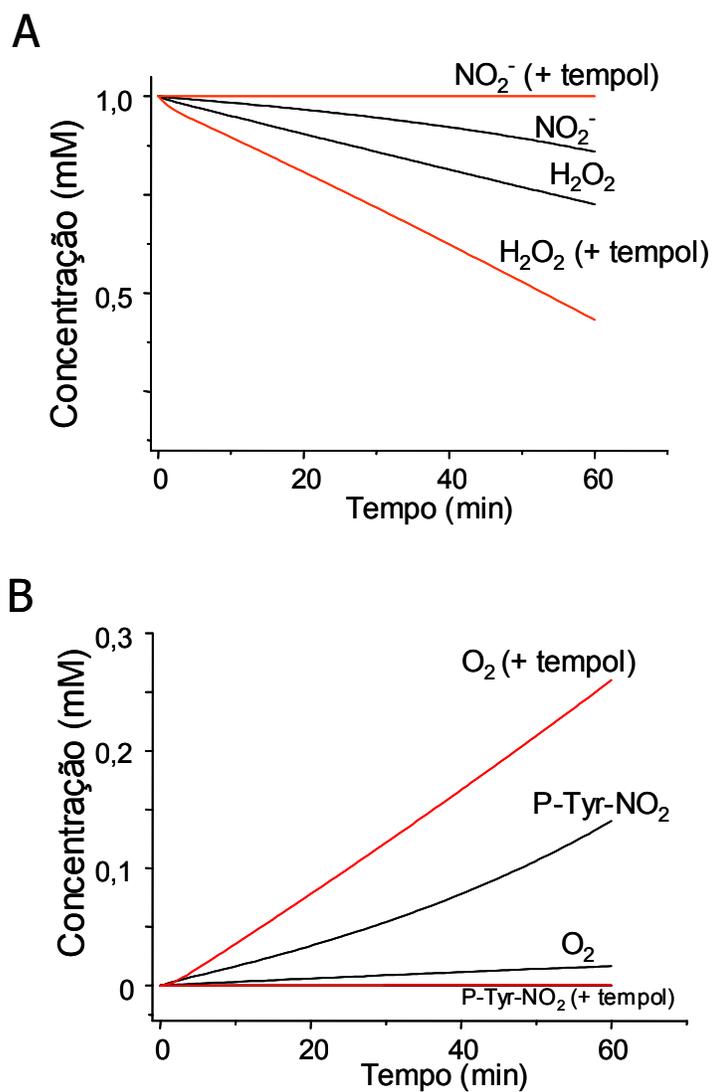


Figura 32. Simulação cinética do consumo de substratos e formação de produtos nas incubações contendo HRP na presença e ausência de tempol. A, consumo de substratos em incubações contendo HRP na ausência e presença de 10 μM de tempol simulados pelo software Gepasi 3.3. B, formação de produtos simulados em paralelo ao (A).

Tabela 6. Constantes de velocidade de segunda ordem k_{app} ($M^{-1} s^{-1}$) da reação dos compostos I e II da MPO e HRP com tempol e RNase a 25°C.

Enzima/ substrato	Cpd-I	Cpd-II	Condição
MPO			
Tempol	$(3,3 \pm 0,5) \times 10^6$	$(2,6 \pm 0,7) \times 10^4$	pH 7,4
HRP			
RNase	$(6,0 \pm 0,3) \times 10^3$	$(3,8 \pm 0,7) \times 10^2$	pH 7,4
	$(5,7 \pm 0,2) \times 10^3$	$(3,5 \pm 0,8) \times 10^2$	pH 6,4
Tempol	$(1,0 \pm 0,2) \times 10^3$	$(2,5 \pm 0,5) \times 10^2$	pH 7,4
	$(1,1 \pm 0,3) \times 10^3$	$(2,4 \pm 0,5) \times 10^2$	pH 6,4

Tabela 7. Valores das constantes de velocidade das reações empregadas na simulação (GEPASI) do sistema MPO/H₂O₂/NO₂⁻/RNase/TPL.

	Reação	k (M ⁻¹ s ⁻¹)	Considerações	Ref.
1	MPO + H ₂ O ₂ ⇌ MPO-I + H ₂ O	k ₁ =2,3 x 10 ⁷ k ₋₁ =58 s ⁻¹	k ₁ calculado a partir da dependência de pH descrita	Marquez <i>et al.</i> , 1994
2	MPO-I + NO ₂ ⁻ → MPO-II + •NO ₂	5,8 x 10 ⁶	Calculado a partir da dependência de pH descrita	Burner <i>et al.</i> , 2000
3	MPO-II + NO ₂ ⁻ → MPO + •NO ₂	4,0 x 10 ⁴	Calculado a partir da dependência de pH descrita	Burner <i>et al.</i> , 2000
4	MPO-I + P-Tyr → MPO-II + P-Tyr•	7,7 x 10 ⁵	Considerado igual a k _{tirosina} , pH 7,4	Marquez & Dunford, 1994
5	MPO-II + P-Tyr → MPO + P-Tyr•	1,6 x 10 ⁴	Considerado igual a k _{tirosina} , pH 7,4	Marquez & Dunford, 1994
6	MPO-I + H ₂ O ₂ → MPO + O ₂ + H ₂ O	2,0 x 10 ⁶	Valor da ref. obtido a pH 7,4, 25°C	Kettle & Winterbourn, 2001
7	P-Tyr• + •NO ₂ → P-Tyr-NO ₂	3,0 x 10 ⁹	Valor da ref. obtido para Gly-Tyr pH 7,5	Prutz <i>et al.</i> , 1985
8	P-Tyr + •NO ₂ → P-Tyr• + NO ₂ ⁻	3,2 x 10 ⁵	Valor da ref. obtido para Gly-Tyr pH 7,5	Prutz <i>et al.</i> , 1985
9	P-Tyr• + O ₂ → P-Tyr-OO•	1,0 x 10 ³	Valor da ref. obtido a pH 7,4	Hunter <i>et al.</i> , 1989
10	P-Tyr• + O ₂ • ⁻ + H ⁺ → P-Tyr-OOH	1,5 x 10 ⁹		Jin <i>et al.</i> , 1993
11	P-Tyr• + P-Tyr• → Di-Tyr	2,0 x 10 ⁸	Valor da ref. obtido a pH 7,5	Hunter <i>et al.</i> , 1989
12	•NO ₂ + •NO ₂ + H ₂ O → NO ₂ ⁻ + NO ₃ ⁻ + 2H ⁺	1,3 x 10 ⁸		Mallard <i>et al.</i> , 1998
13	TPNO• + •NO ₂ ⇌ TPNO ⁺ + NO ₂ ⁻	k ₁ =8,7 x 10 ⁸ k ₋₁ =2,7 x 10 ⁵	Não influenciado pelo pH (3,9-10,2)	Goldstein <i>et al.</i> , 2003b
14	TPNO ⁺ + H ₂ O ₂ ⇌ TPNO• + O ₂ • ⁻	k ₁ =1,4 x 10 ⁸ k ₋₁ =1,2 x 10 ⁸		Goldstein <i>et al.</i> , 2003a
15	TPNO ⁺ + O ₂ • ⁻ → TPNO• + O ₂	3,4 x 10 ⁹	Valor da ref. obtido a pH 7,9	Goldstein & Samuni, 2007
16	P-Tyr• + TPNO• → P-Tyr-ONTP	4 x 10 ⁶	Obtido pela simulação por tentativa e erro.	

Tabela 8. Valores das constantes de velocidade das reações paralelas que podem ocorrer nas incubações contendo MPO/H₂O₂/NO₂⁻/TPL.

	Reação	k (M ⁻¹ s ⁻¹)	Considerações	Ref.
1	MPO + O ₂ • ⁻ ⇌ MPO-III	k _f =1,1 x 10 ⁶ k _r =0,0014 s ⁻¹	Valor da ref. obtido a pH 7,5	Kettle <i>et al.</i> , 1988
2	MPO-I + H ₂ O ₂ → MPO-II + O ₂ • ⁻	7,3 x 10 ⁴	Calculado a partir da dependência de pH descrita	Winterbourn <i>et al.</i> , 1985
3	MPO-II + H ₂ O ₂ → MPO-III + H ₂ O	78	Valor da ref. obtido a pH 7,4	Marquez & Dunford, 1995
4	MPO-II + O ₂ • ⁻ → MPO + O ₂ + H ₂ O	5,0 x 10 ⁶	Valor da ref. obtido a pH 7,4	Jantschko <i>et al.</i> , 2003
5	MPO-III + O ₂ • ⁻ → MPO-I + O ₂ + H ₂ O	1,3 x 10 ⁵	Valor da ref. obtido a pH 7,4	Kettle <i>et al.</i> , 2007
6	O ₂ • ⁻ + O ₂ • ⁻ + 2H ⁺ → H ₂ O ₂ + O ₂	1,8 x 10 ⁷	Valor da ref. obtido a pH 5,16	Kettle <i>et al.</i> , 2007
7	NO ₂ + O ₂ • ⁻ ⇌ O ₂ NOO ⁻	k _f =4,5 x 10 ⁹ k _r =1,05 s ⁻¹	Valor da ref. obtido a pH 6,7-9,3	Rabani & Nielsen, 1969
8	O ₂ NOO ⁻ → NO ₂ ⁻ + O ₂	1,35 s ⁻¹	Valor da ref. obtido a pH 7,7-9,3	Loeager & Sehested, 1993
9	MPO-I + TPNO• → MPO-II + TPNO ⁺	3,3 x 10 ⁶	Determinado neste estudo, pH 7,4, 25°C	Este estudo
10	MPO-II + TPNO• → MPO + TPNO ⁺	2,6 x 10 ⁴	Determinado neste estudo, pH 7,4, 25°C	Este estudo

Tabela 9. Valores das constantes de velocidade das reações empregadas na simulação (GEPASI) envolvendo o sistema HRP/H₂O₂/NO₂⁻/RNase/TPL.

	Reação	k (M ⁻¹ s ⁻¹)	Considerações	Ref.
1	HRP + H ₂ O ₂ → HRP-I + H ₂ O	1,78 x 10 ⁷	Não influenciado pelo pH	Job & Dunford, 1978
2	HRP-I + RNase → HRP-II + •RNase	5,7 x 10 ³	Determinado neste estudo pH 6,4 25°C	Este estudo
3	HRP-II + RNase → HRP + •RNase	3,5 x 10 ²	Determinado neste estudo pH 6,4 25°C	Este estudo
4	HRP-I + NO ₂ ⁻ → HRP-II + •NO ₂	6,5 x 10 ³	Valor da ref. obtido a pH 6,0, 25°C	Roman & Dunford, 1973
5	HRP-II + NO ₂ ⁻ → HRP + •NO ₂	13,3		Monzani <i>et al.</i> , 2004
6	HRP-I + H ₂ O ₂ → HRP + ½ O ₂	1,78 s ⁻¹	Valor da ref. obtido a pH 6,5 e 8,5	Hernández-Ruiz <i>et al.</i> , 2001
7	P-Tyr• + •NO ₂ → P-Tyr-NO ₂	3,0 x 10 ⁹	Valor da ref. obtido para Gly-Tyr pH 7,5	Prutz <i>et al.</i> , 1985
8	P-Tyr + •NO ₂ → P-Tyr• + NO ₂ ⁻	3,2 x 10 ⁵	Valor da ref. obtido para Gly-Tyr pH 7,5	Prutz <i>et al.</i> , 1985
9	P-Tyr• + O ₂ → P-Tyr-OO•	1,0 x 10 ³	Valor da ref. obtido a pH 7,4	Hunter <i>et al.</i> , 1989
10	•NO ₂ + •NO ₂ + H ₂ O → NO ₂ ⁻ + NO ₃ ⁻ + 2H ⁺	1,3 x 10 ⁸		Mallard <i>et al.</i> , 1998
11	HRP-I + TPNO• → HRP-II + TPNO ⁺	1,1 x 10 ³	Determinado neste estudo pH 6,4 25°C	Este estudo
12	HRP-II + TPNO• → HRP + TPNO ⁺	2,4 x 10 ²	Determinado neste estudo pH 6,4 25°C	Este estudo
13	P-Tyr• + TPNO• → P-Tyr-TPNO	4 x 10 ⁶	Obtido pela simulação por tentativa e erro	
14	TPNO ⁺ + H ₂ O ₂ ⇌ TPNO• + O ₂ • ⁻	k ₁ =1,4 x 10 ⁸ k ₋₁ =1,2 x 10 ⁸		Goldstein <i>et al.</i> , 2003a
15	TPNO ⁺ + O ₂ • ⁻ → TPNO• + O ₂	3,4 x 10 ⁹	Valor da ref. obtido a pH 7,9	Goldstein & Samuni, 2007
16	TPNO• + •NO ₂ ⇌ TPNO ⁺ + NO ₂ ⁻	k ₁ =8,7 x 10 ⁸ k ₋₁ =2,7 x 10 ⁵	Não influenciado pelo pH (3,9-10,2)	Goldstein <i>et al.</i> , 2003b

5. Discussão

Nossos resultados mostram que a RNase e lisozima são oxidadas e nitradas por oxidantes derivados do peroxinitrito e MPO/H₂O₂/NO₂⁻ estendendo estudos anteriores da literatura (Souza *et al.*, 1999). As proteínas selecionadas não possuem grupos tióis livres os quais estão entre os principais alvos protéicos dos oxidantes derivados do óxido nítrico (Augusto *et al.*, 2002). No caso da RNase e lisozima os principais alvos são resíduos de tirosina e de tirosina e triptofano, respectivamente. Para a discussão da oxidação das proteínas, é interessante recapitular a oxidação desses aminoácidos por peroxinitrito e MPO/H₂O₂/NO₂.

A oxidação da tirosina por peroxinitrito ocorre por mecanismos radicalares como sumarizado na Figura 33. O NO₂[•] derivado da homólise do ácido peroxinitroso oxida resíduos de tirosina (P-Tyr[•]) formando o radical tirosila na proteína o qual recombina com [•]NO₂ ou outro P-Tyr[•] gerando 3-NO₂-Tyr ou P-Tyr-Tyr-P, respectivamente. Por sua vez, o radical [•]OH deve preferencialmente se adicionar a resíduos de tirosina levando a formação de outros produtos, por exemplo, 3-OH-tirosina (Santos *et al.*, 2000).

O mecanismo de oxidação do triptofano por peroxinitrito gerou algum debate na literatura, havendo discussão quanto à natureza radicalar do processo. Entretanto, a reação de adição do peroxinitrito ao anel benzênico (mecanismo por 2 elétrons) possui constante de velocidade baixa (184 M⁻¹ s⁻¹, pH 7,1, 37°C) (Alvarez *et al.*, 1996), tornando esta rota pouco provável. Vários produtos de oxidação do triptofano são formados (posições 2, 3, 4, 5, 6 e 7) (Yamakura *et al.*, 2005; Exner & Herold, 2000; Ishii *et al.*, 2007) por mecanismos radicalares (Figura 34), sendo a posição 6 a preferencial. De fato, nossos resultados mostraram que o principal produto de nitratação de resíduos de triptofano da lisozima é o 6-NO₂-Trp, mas também, verificou-se a formação de 5-NO₂-

Trp e de outros produtos de oxidação reportados ou não na literatura (Fig. 11 e Tabela 1). O radical triptofanila, como qualquer radical de carbono, reage com oxigênio molecular com constante de velocidade controlada pela difusão para formar o radical peroxila (Figura 34). Este radical é o precursor da quinurenina, através de N-formilquinurenina como intermediário. Considerando a somatória dos produtos provenientes da oxidação da lisozima, os resíduos de tirosina e triptofano se mostraram alvos comparáveis dos oxidantes estudados. Todavia, os dados de geração de radicais mostraram que a maior parte dos radicais captados é derivado de resíduos de tirosina e não de triptofano (Fig. 6). Como a constante de velocidade da reação do NO_2^\bullet com triptofano ($k = 1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) é maior do que com tirosina ($k = 3,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Bonini *et al.*, 2004) deve estar ocorrendo transferência de elétrons de radicais triptofanila para resíduos de tirosina. A formação de produtos nitrados e dimerizados em função do pH revela que o peroxinitrito foi mais eficiente a pH 7,4 e isto deve estar relacionado à meia-vida do peroxinitrito que é maior em pH neutro ($k = 0,17 \text{ s}^{-1}$ em pH 7,4 e $k = 1,1 \text{ s}^{-1}$ em pH 5,4, 25°C).

A pouca acessibilidade do sítio ativo da MPO sugeriria que a formação de radicais protéicos e seus produtos dependeria da formação do NO_2^\bullet que atuaria como oxidante difusível. Todavia, os resultados de EPR mostraram que a pH 5,4 ocorre formação de radicais protéicos mesmo em ausência de nitrito (Figs. 5 e 6). Deve-se concluir que MPO-I e MPO-II são capazes de oxidar as proteínas em meio ácido. A oxidação de resíduos de tirosina em dipeptídeos, tripeptídeos e polipeptídeos com alto conteúdo de tirosinas (20-50 kDa) já foi demonstrada, embora só MPO-I oxide o polipeptídeo (Tien, 1999). No caso da lisozima e, principalmente da RNase, o desenovelamento da proteína em meio ácido pode estar facilitando sua oxidação por MPO/ H_2O_2 (ver também abaixo). Outra alternativa para explicar nossos resultados seria um isômero do composto I, no qual o radical é transferido da porfirina à cadeia

polipeptídica (Furtmüller *et al.*, 2006). De fato, um radical derivado da MPO já foi detectado durante sua reação com H_2O_2 (Lardinois e Montellano, 2000).

No caso da lisozima tratada com $\text{MPO}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{NO}_2^-$ foram identificados os produtos quinurenina, 3- NO_2 -Tyr, 7-OH-Trp e 6- NO_2 -Trp e dímeros de tirosina. A tirosina se mostrou um melhor alvo quando comparada ao triptofano e isto pode estar relacionado à transferência de elétrons entre resíduos ou às maiores constantes de velocidade das reações da tirosina ($7,72 \times 10^5$ e $1,57 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Marquez & Dunford, 1995) para os compostos I e II com tirosina e $4,5 \times 10^5$ e $6,9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Jantschko *et al.*, 2002) para os compostos I e II com triptofano). O composto I da MPO também oxida nitrito eficientemente ($k = 2,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pH 7) embora este não seja um bom substrato para o composto II ($k = 5,5 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pH 7) (Burner *et al.*, 2000). A pH 5, as constantes de velocidade dos compostos I e II com nitrito são maiores ($1,1 \times 10^7$ e $8,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente) (Burner *et al.*, 2000), o que pode explicar a maior formação de produtos nitrados, hidroxilados e dimerizados no pH 5,4 (Tabela 2). Desta forma, nas condições do estudo espera-se que a geração dos radicais seja devida principalmente à oxidação pelo $\cdot\text{NO}_2$ do que pelos compostos I e II da MPO (Fig. 34 e 35).

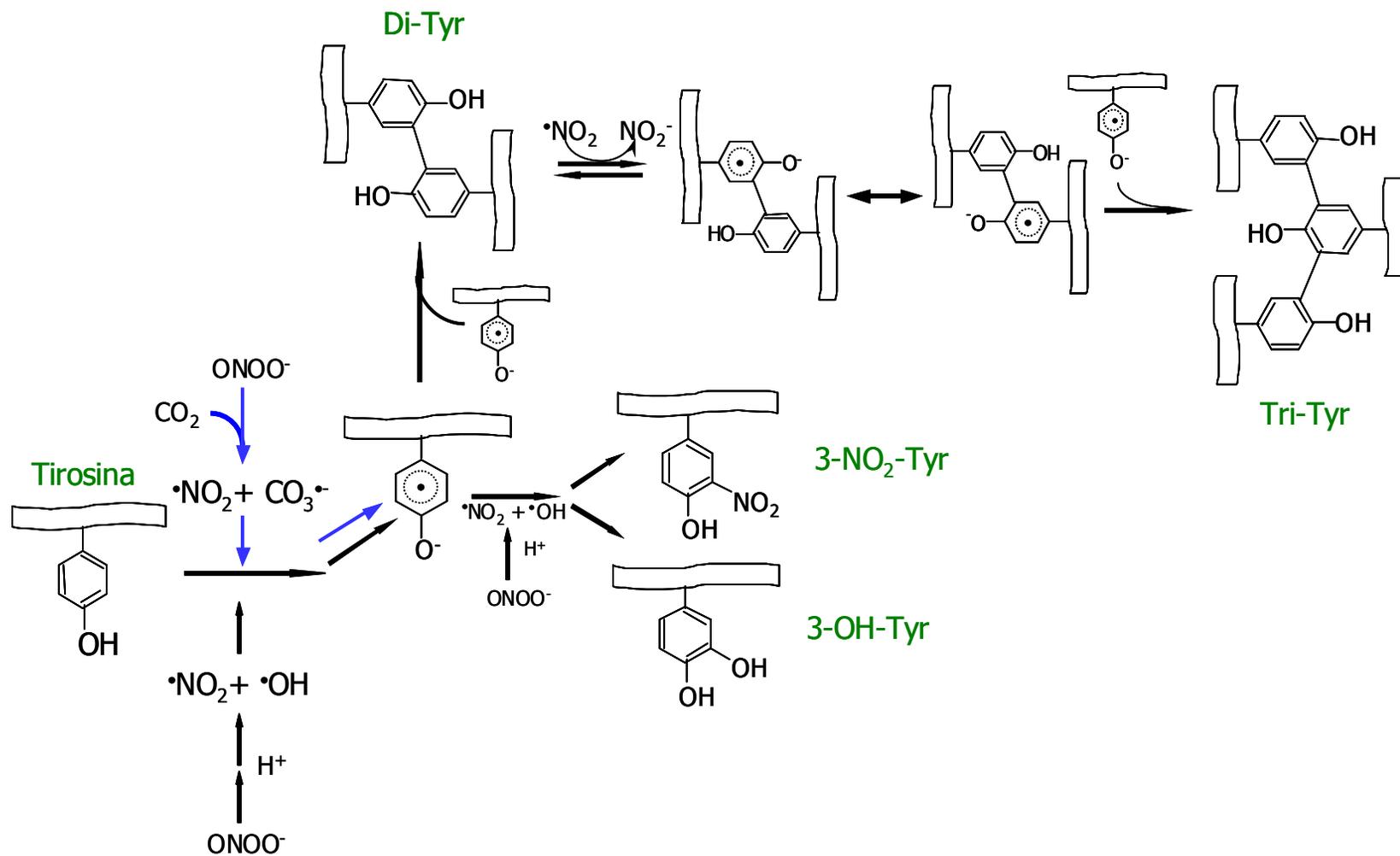


Figura 33. Mecanismos para formação de radicais e produtos de tirosina por peroxinitrito.

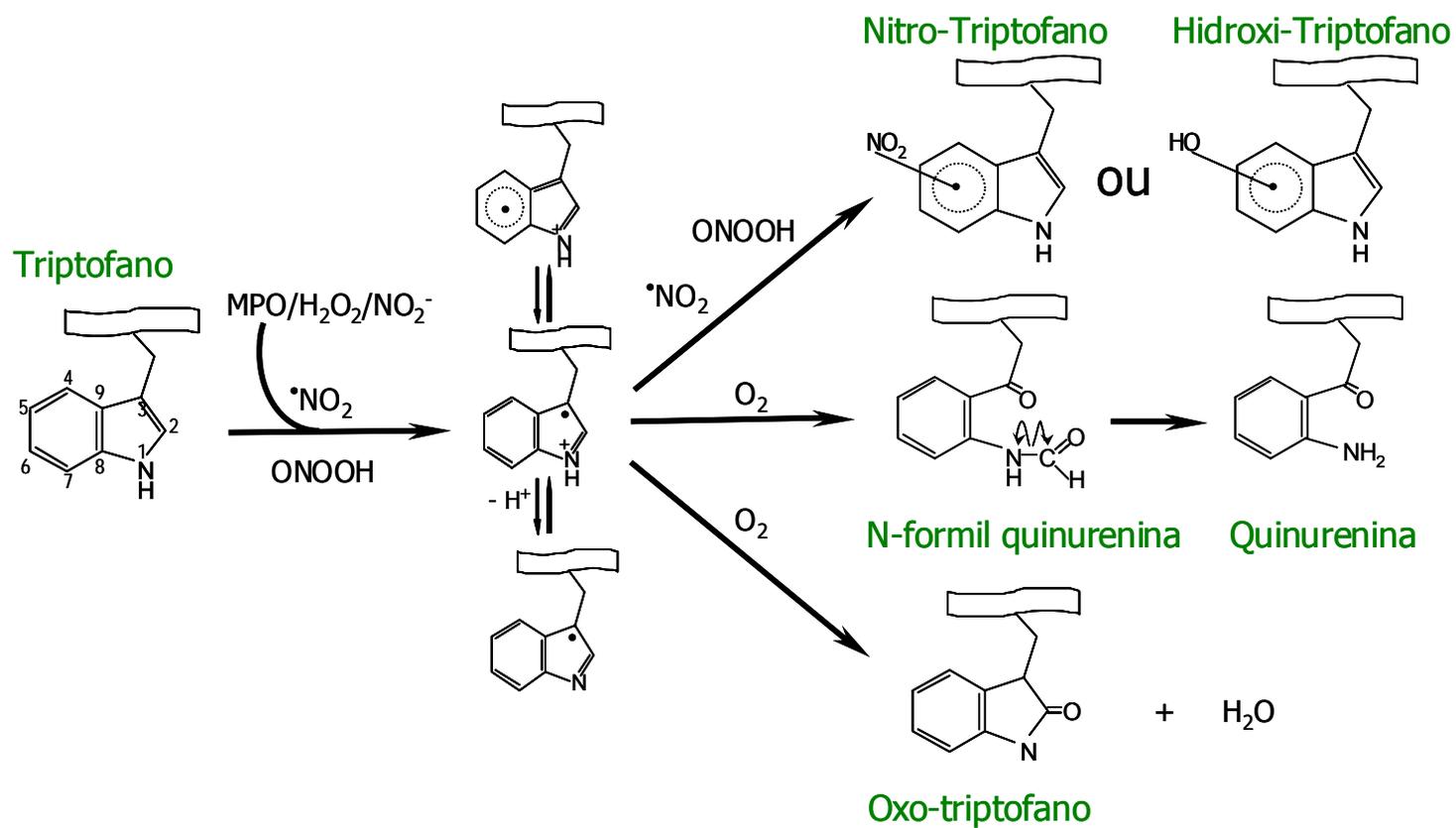


Figura 34. Mecanismos para formação de radicais e produtos de triptofano por peroxinitrito e MPO/H₂O₂/NO₂⁻.

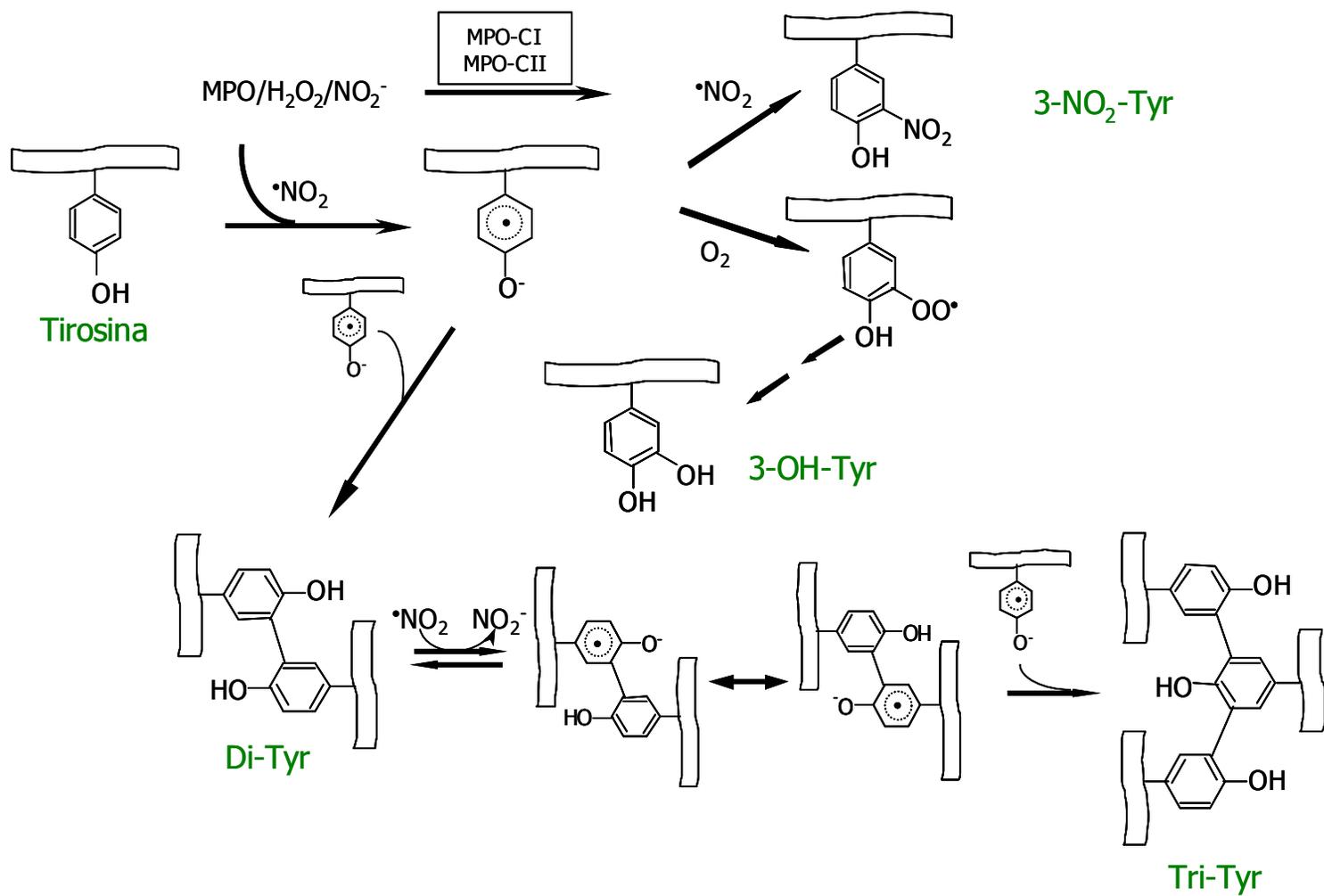


Figura 35. Mecanismos para formação de radicais e produtos de tirosina por MPO/H₂O₂/NO₂⁻.

No caso da RNase, a oxidação de resíduos de tirosina por peroxinitrito apresentou alguma seletividade em função da localização do resíduo na estrutura protéica. Houve maior oxidação dos resíduos Tyr¹¹⁵ seguido dos resíduos Tyr⁹²/Tyr⁹⁷ que não podemos especificar, pois estão no mesmo fragmento tríptico. Em menor extensão foi(ram) oxidado(s) o(s) resíduo(s) Tyr⁷³/Tyr⁷⁶. No caso do tratamento com MPO, foram gerados produtos oxidados e nitrados em todos os fragmentos trípticos analisados, principalmente no fragmento que contém os resíduos Tyr⁹²/Tyr⁹⁷. A RNase possui 124 resíduos de aminoácidos e tamanho molecular aparente de 13 kDa. A estrutura cristalina obtida por raio-X indica a presença de 3 α -hélices, e 7 folhas- β (Fig. 36). Os 6 resíduos de tirosina estão nas posições 25, 73, 76, 92, 97 e 115, sendo que a Tyr²⁵ está localizada em uma região inacessível de α -hélice da proteína. Também em região inacessível se encontra o resíduo Tyr⁹⁷ localizado em uma folha- β . A Tyr⁷³ se encontra em uma folha- β e os demais resíduos de tirosina se localizam em "loops". Os resíduos de tirosina se dividem em duas regiões opostas da proteína, sendo que Tyr⁷³, Tyr⁷⁶ e Tyr¹¹⁵ se encontram em um lado e Tyr²⁵, Tyr⁹² e Tyr⁹⁷ de outro (Souza *et al.*, 1999).

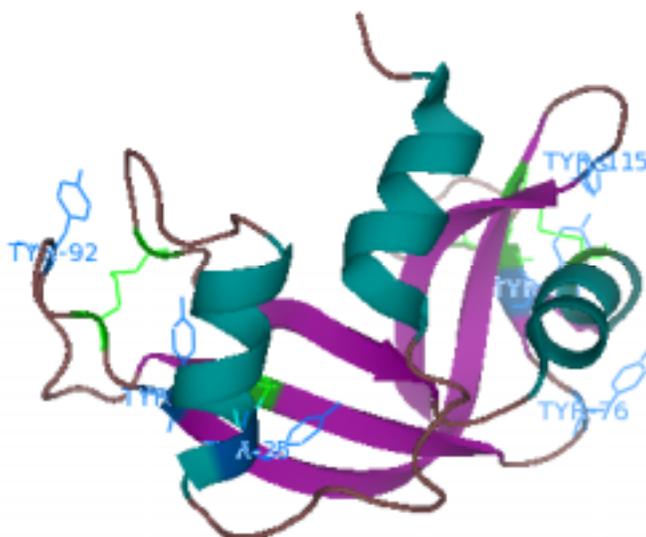


Figura 36. Estrutura terciária da RNase com os resíduos de tirosina localizados.

Vários estudos sobre acessibilidade e enovelamento têm sido realizados com a RNase A, sendo que vários deles empregaram mutantes inclusive em tirosinas (Juminaga *et al.*, 1997, Navon *et al.*, 2001, Xu *et al.*, 2006). A acessibilidade molecular é geralmente baseada em estratégias computacionais de alta resolução estática ou de dinâmica molecular (Lee & Richards, 1971). Entretanto, estes cálculos podem não incluir todos os aspectos da acessibilidade como hidratação e interações hidrofóbicas, de van der Waals ou eletrostáticas (Teng & Bryant, 2004). Diferentes autores na literatura têm reportado valores de acessibilidade seguindo metodologias distintas e obtendo resultados divergentes (Souza *et al.*, 1999, Strohalm *et al.*, 2004 e Sharp *et al.*, 2004). Para a RNase foi encontrada uma referência (Souza *et al.*, 1999) que empregou o programa PDB e Swiss-Prot/TrEMBL para o cálculo da % de acessibilidade do solvente aos aminoácidos de interesse. Para nossas análises consideramos valores da área exposta encontrados no banco de dados para RNase (1KF2) e lisozima (1LZ8) (Tabela 10) complementados com as informações sobre desenovelamento disponíveis na literatura.

Considerando os dados de acessibilidade das tirosinas da RNase (Tabela 10), pode-se concluir que o peroxinitrito oxidou mais o resíduo de acessibilidade intermediária (Tyr¹¹⁵). Pode-se também presumir que a Tyr⁷⁶ e a Tyr⁹² são os principais alvos dos oxidantes nos fragmentos trípticos que os contém porque a Tyr⁷³ e a Tyr⁹⁷ são praticamente inacessíveis ao solvente. O fato do sistema MPO/H₂O₂/NO₂⁻ promover alterações na maioria dos resíduos da RNase deve estar relacionado à tendência dessa proteína se desenovelar com a diminuição do pH (Burgess & Scheraga, 1975). Também deve contribuir a conhecida desestabilização da estrutura terciária da RNase em resposta ao ataque de oxidantes na Tyr⁹². Isso pode levar à exposição de resíduos de tirosina internos seguida de suas modificações oxidativas. Como descrito anteriormente (Xu *et al.*, 2006), uma mudança na Tyr⁹² afeta a interação rígida entre seu anel aromático e o da Pro⁹³, ocorrendo desestabilização do “loop” onde se encontram e da ponte dissulfeto. A modificação de outros resíduos expostos, como a Tyr⁷⁶ e a Tyr¹¹⁵ acarreta forte desestabilização da proteína como um todo podendo levar a um desenovelamento cooperativo que altera inclusive as acessibilidades dos resíduos menos expostos (Navon *et al.*, 2001). Desta forma, quando a Tyr⁹² é alterada há uma desestabilização geral da proteína e as tirosinas menos expostas (como a Tyr²⁵) também se tornam alvos ocasionando a inespecificidade dos oxidantes. Mesmo com redução das concentrações de nitrito esta inespecificidade foi observada. Este fenômeno não é observado com o peroxinitrito haja vista a maior estabilidade da proteína a pH 7,4 e ao fato da proteína ser exposta aos radicais derivados do peroxinitrito por um curto intervalo de tempo (devido à rápida decomposição do peroxinitrito e de sua adição em bolus, ou seja, de uma única vez). No tratamento com MPO, os oxidantes são gerados em fluxo por tempos suficientes para a ocorrência do desenovelamento.

Tabela 10. Valores de acessibilidade dos resíduos de tirosina e triptofano para a lisozima (PDB 1LZ8) e RNase (PDB 1KF2). Estes valores representam a somatória da acessibilidade de cada posição do aminoácido.

Proteína	Resíduo	Acessibilidade (Å ²)	Proteína	Resíduo	Acessibilidade (Å ²)
Lisozima	Tyr ²⁰	60,1	RNase	Tyr ²⁵	14,4
	Tyr ²³	21,5		Tyr ⁷³	33,2
	Tyr ⁵³	16,9		Tyr ⁷⁶	99,9
	Trp ²⁸	0		Tyr ⁹²	66,9
	Trp ⁶²	134,8		Tyr ⁹⁷	0,6
	Trp ⁶³	28,1		Tyr ¹¹⁵	51,3
	Trp ¹⁰⁸	8,0			
	Trp ¹¹¹	12,8			
	Trp ¹²³	46,9			

No caso da lisozima, além dos produtos de nitração, verificou-se a formação de produtos de oxidação como quinurenina, N-formilquinurenina, ditirosina, hidroxitirosina e hidroxitriptofano. Outros estudos realizados com diferentes proteínas (mioglobina e Cu,Zn-SOD) também mostraram a formação de alguns desses produtos em oxidações mediadas por MPO e/ou peroxinitrito (Herold *et al.*, 2002; Yamakura *et al.*, 2005).

A lisozima possui 129 resíduos de aminoácidos e tamanho molecular aparente de 14 kDa. A estrutura cristalina obtida por raios-X indica a presença de 4 α -hélices e 3 folhas- β . Os 6 resíduos de triptofano se encontram nas posições 28, 62, 63, 108, 111 e 123 e os resíduos de tirosina nas posições 20, 23 e 53. Esta proteína

globular possui regiões de loops muito flexíveis sendo que a região de maior mobilidade contém o Trp⁶².

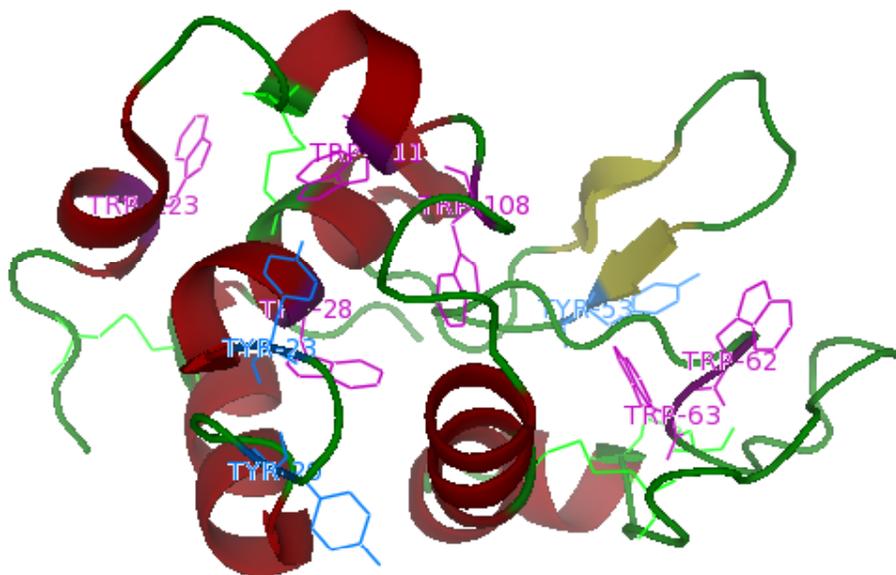


Figura 37. Estrutura terciária da lisozima com os resíduos de tirosina e triptofano identificados.

Como várias formas cristalinas da enzima foram descritas, os valores de acessibilidade apresentam muitas discrepâncias. Segundo nossos dados, o peroxinitrito parece capaz de difundir pela proteína atingindo resíduos de diversas acessibilidades. O fragmento contendo Tyr²³/Trp²⁸ foi preferencialmente nitrado (Fig. 15). A formação de outros produtos de oxidação do triptofano parece também ser importante no tratamento com peroxinitrito (dados da digestão completa e tríplica). No caso da MPO, a preferência da nitração ocorreu no fragmento contendo Trp⁶²/Trp⁶³. Também é interessante notar que na lisozima, a maioria dos resíduos de triptofano aparece modificada (nitrada ou formando adutos de DMPO e DNBNS) por ambos sistemas e independentemente de suas exposições ao solvente.

Além das alterações nas cadeias laterais de resíduos aromáticos, a lisozima também sofreu fragmentação no tratamento com MPO/H₂O₂/NO₂⁻ em todos os pHs

estudados (Fig. 12. Este comportamento tem sido descrito na literatura (Hawkins & Davies, 2005) e parece estar relacionado a regiões que contém Asp serem enfraquecidas após oxidação de His, Trp e Tyr, resultando no desenovelamento, fragmentação, agregação e inativação da proteína. Foram identificados dois fragmentos de aproximadamente 10 kDa e 4 kDa sendo que este padrão de fragmentação foi também descrito em doenças amilóides (Mishra *et al.*, 2007; Aso *et al.*, 2007) e na proteína tratada com HBrO (Hawkins & Davies, 2005). Esta fragmentação não foi verificada no tratamento da lisozima com peroxinitrito e nem na RNase independente do tratamento e do pH.

Estudo de modificações oxidativas em lisozima são importantes em ambientes inflamatórios. Nessas condições, além de mieloperoxidase, neutrófilos ativados liberam uma variedade de enzimas para lise, entre elas lisozima e várias proteases, a partir dos grânulos intracelulares. A ação dessas enzimas em conjunto, forma um sistema de defesa encadeado (Jesaitis & Dratz, 1992). Já é conhecido que a lisozima é oxidada e inativada por HClO (Vissers & Winterbourn, 1987; Naskalski, 1994) e nossos resultados indicaram um grande número de alterações nesta proteína na presença de MPO/H₂O₂/NO₂⁻. Desta forma, as modificações oxidativas verificadas na lisozima podem alterar sua funcionalidade levando inclusive à inativação.

Comparando-se o rendimento dos produtos de oxidação gerados nas duas proteínas estudadas verifica-se que a RNase foi mais oxidada provavelmente devido à exposição de resíduos de tirosina ao solvente. Relacionando os valores de acessibilidade com as modificações observadas pode-se inferir algumas tendências. Os resíduos nitrados foram os mais expostos ao solvente no caso do tratamento com MPO (RNase – Tyr¹¹⁵/Tyr⁹²/Tyr⁷⁶ e lisozima – Trp^{62/63}) do que no caso do peroxinitrito (RNase – Tyr¹¹⁵ e lisozima – Tyr²³/Trp²⁸). Esta tendência está de acordo com a possibilidade do peroxinitrito se difundir pela proteína e decompor-se em radicais livres nitrantes no

interior da mesma. Estudos anteriores de oxidação de RNase e lisozima por peroxinitrito/ CO_2 e MPO/ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{NO}_2^-$ a pH 7,4 reportaram a nitração de um e dois resíduos de tirosina na RNase (Tyr¹¹⁵) e lisozima (Tyr²³ e Tyr²⁰), respectivamente (Souza *et al.*, 1999). Esses resultados divergem dos nossos que enfatizam a importância de resíduos de triptofano como alvo de oxidantes derivados do óxido nítrico. A oxidação de resíduos de triptofano em proteínas começa a ser reconhecida como um processo importante, inclusive para a agregação de proteínas em processos neuodegenerativos (Zhang *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2007). Os produtos de oxidação de resíduos de triptofano e as conseqüências de suas formações para a estrutura e função das proteínas que os contenham permanecem pouco explorados. Contribui para isso tanto a complexidade das reações do triptofano como a ausência de metodologias simples para detectar seus produtos de oxidação em condições fisiológicas. Esse cenário deve mudar no futuro próximo.

Para estudar os efeitos do tempol sobre a nitração de proteínas mediada por peroxidases, escolhemos a RNase como alvo pela ausência de resíduos de triptofano na proteína e pelo fato de que os efeitos protetores do tempol na injúria tecidual em modelos animais de inflamação terem sido acompanhados da redução dos níveis de nitração de proteína-tirosilas (Thiemermann, 2003). Todavia, os efeitos do tempol na nitração de proteína-tirosinas mediada por MPO permaneceram inexplorados, embora a MPO seja fundamental em várias condições infecciosas e inflamatórias (Arnhold *et al.*, 2003; Nicholls & Hazen, 2005). Nosso estudo contribui para preencher esse hiato.

Mostramos que o tempol inibe eficientemente a nitração da RNase mediada por MPO, agindo quase como um verdadeiro catalisador (Fig. 25). Também, mostramos que o tempol reage com MPO-I, MPO-II, HRP-I e HRP-II com constantes de velocidade de segunda ordem (Tabela 6) que são várias ordens de magnitude maiores que as

reportadas para a ferrila-mioglobina ($1,6 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Krishna *et al.*, 1996). Apesar das constantes de velocidade de segunda ordem determinadas não serem excepcionalmente altas, suportam sugestões prévias de que análogos do tempol não seriam excelentes substratos para peroxidases (Borisenko *et al.*, 2004). Embora melhor substrato para a MPO que para a HRP, as constantes de velocidade de segunda ordem das reações do tempol com MPO-I e MPO-II estão na faixa daquelas de metabólitos endógenos, como tirosina (Tabelas 6, 7 e 8).

Concluimos que os efeitos inibitórios do tempol na nitração da RNase não dependeram de sua reação com MPO-I e MPO-II. Essa conclusão foi baseada na quantificação do consumo de substratos e formação de produtos na presença e ausência do tempol (Fig. 27 e 28) e nos resultados de suas simulações cinéticas (Fig. 31 e 32). Para simular nossos dados, consideramos que a RNase teria pelo menos um resíduo de tirosina altamente exposto que poderia reagir com MPO-I e MPO-II tão rapidamente quanto o aminoácido livre (Tabela 7 reações 4 e 5) para competir com o excesso de H_2O_2 e NO_2^- . Propusemos que os efeitos inibitórios do tempol podem ser atribuídos principalmente à sua reação com dióxido de nitrogênio gerando o cátion oxamônio (Tabela 7, reação 13) que, então, recicla a tempol pela reação com H_2O_2 (Tabela 7, reação 14) e ânion radical superóxido (Tabela 7, reação 15). Outra reação relevante do tempol é com o radical tirosila da RNase (Tabela 7, reação 16) que consome o nitróxido impedindo sua ação catalítica (Fig. 27 e 28). Este mecanismo tem similaridades com o proposto para explicar os efeitos do tempol redirecionando a reatividade de peroxinitrito/dióxido de carbono de nitração de resíduos de tirosina para nitrosação de resíduos de cisteína *in vitro* e em células (Fernandes *et al.*, 2005). Neste caso foi proposto que o tempol reage com dióxido de nitrogênio e radical carbonato produzindo o cátion oxamônio que é reciclado a tempol oxidando o peroxinitrito

remanescente a óxido nítrico e oxigênio. Nesse caso, o tempol também foi parcialmente consumido em reações de recombinação que foram atribuídas a radical tiila protéicos.

Em suma, propusemos que o tempol inibe a nitração da RNase principalmente devido à sua reação com dióxido de nitrogênio. Embora os experimentos tenham sido realizados com concentrações não fisiológicas de NO_2^- e H_2O_2 , o mecanismo proposto também pode ocorrer em condições fisiológicas. De fato, é improvável que as concentrações de tempol alcançadas em fluidos biológicos possam competir com metabólitos endógenos pela MPO-I e MPO-II, pois as constantes de velocidade de reação são comparáveis. Todavia, não é possível excluir que concentrações de tempol possam se tornar altas em ambientes localizados e então, as constantes de velocidades de segunda ordem determinadas neste trabalho e os dados da literatura podem ser empregados para simular uma variedade de condições fisiológicas hipotéticas (Tabelas 6-9).

Nosso estudo adiciona importantes informações para esclarecer os mecanismos pelos quais os nitróxidos atenuam a toxicidade de oxidantes derivados do óxido nítrico, cuja formação deve depender de reações catalisadas por hemeperoxidases de mamíferos como MPO e peroxidase eosinófila (EPO) entre outros mecanismos. Recentemente, foi proposto que a atividade peroxidásica da endoperoxidase H sintase da prostaglandina (COX-2) (Palazzolo-Ballance *et al.*, 2007) e o domínio oxigenase da óxido nítrico sintase induzível (Maréchal *et al.*, 2007) também são fontes de dióxido de nitrogênio em mamíferos. Como a MPO é uma hemeperoxidase muito reativa, a demonstração de que o tempol reage com MPO-I e MPO-II com velocidades comparáveis àquelas de substratos endógenos pode ser extrapolada para outras peroxidases de mamíferos. Exceto em casos de acentuado impedimento estérico, as constantes de velocidade de segunda ordem aqui determinadas também devem ser similares a de outros nitróxidos, pois estrutura eletrônica e delocalização de elétrons têm

pouca influência nas reações dos nitróxidos (Novak *et al.*, 2004). A demonstração de que a reação de recombinação do tempol com radicais tirosila em proteínas é uma importante via para o consumo do nitróxido também é relevante. O decaimento de nitróxidos por reações de recombinação com radicais tiila de proteínas (Fernandes *et al.*, 2005) e da glutathionila (Borisenko *et al.*, 2004) foram previamente propostos. Tem sido considerado que a redução do nitróxido à correspondente hidroxilamina é a principal rota de decaimento para estes compostos *in vivo*, mas a contribuição das reações de recombinação precisa ser melhor avaliada.

Com base neste e em trabalhos anteriores (Fernandes *et al.*, 2005; Goldstein *et al.*, 2003a e b; Bonini *et al.*, 2002; Goldstein *et al.*, 2004; Goldstein *et al.*, 2006), podemos propor que os nitróxidos atenuam os efeitos tóxicos de oxidantes derivados de óxido nítrico principalmente devido à sua capacidade de reagir rapidamente com dióxido de nitrogênio e/ou radical carbonato ($k = 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) que iriam de outra forma atacar uma variedade de alvos biológicos, incluindo resíduos de tirosina em proteínas. No processo, o nitróxido é oxidado ao cátion oxamônio correspondente, que pode ser reciclado ao nitróxido por reação com precursores do dióxido de nitrogênio e do radical carbonato como peroxinitrito e peróxido de hidrogênio produzindo espécies “upstream” como óxido nítrico, radical superóxido e oxigênio (Fig. 38). *In vivo*, é provável que o cátion oxamônio possa ser reciclado por redutores celulares, mas estas reações ainda precisam ser exploradas (Goldstein *et al.*, 2003a). Devido à eficiência do tempol na redução de danos inflamatórios em condições fisiológicas genuínas, especificamente em modelos animais, é provável que direcionar nitróxidos aos sítios de produção de oxidantes derivados de óxido nítrico se configure numa estratégia terapêutica efetiva. Uma prova do conceito são os resultados promissores obtidos na redução da formação de espécies derivadas do oxigênio por direcionamento de nitróxidos a mitocôndrias e membranas mitocondriais (Kagan *et al.*, 2007; Dhamasekaran *et al.*, 2005).

6. Conclusões

Os oxidantes derivados do peroxinitrito e de peroxidases, como mieloperoxidase, e os danos que promovem em proteínas tem ganhado relevância pelos papéis em processos inflamatórios infecciosos e outros. Desta forma, os resultados obtidos neste trabalho para as duas proteínas modelos, RNase e lisozima, contribuem para o esclarecimento dos mecanismos tóxicos dos oxidantes derivados do óxido nítrico. A identificação de produtos derivados de tirosina e triptofano oxidados/nitrados mediados por peroxinitrito e MPO/H₂O₂/NO₂⁻ bem como a estimativa dos rendimentos de 3-OH-Tyr, nitrados de tirosina e triptofano e dímeros de tirosina amplia o conhecimento das modificações pós-translação promovidas por oxidantes derivados de óxido nítrico. Análise da estrutura terciária quanto à acessibilidade dos resíduos modificados sugerem que a RNase foi preferencialmente nitrada nos resíduos Tyr¹¹⁵ > Tyr^{92/97} > Tyr^{73/76} por peroxinitrito. Já o sistema MPO/H₂O₂/NO₂⁻ foi pouco específico nas modificações oxidativas que promove, notando-se ligeira preferência pelos resíduos mais acessíveis. No caso da lisozima, o peroxinitrito oxidou/nitrou preferencialmente o fragmento tríptico contendo os resíduos Trp^{62/63} gerando produtos nitrados, hidroxilados, dimerizados e quinurenina. O sistema MPO/H₂O₂/NO₂⁻ nitrou o fragmento contendo os resíduos Tyr²³/Trp²⁸ e nitrou Trp^{62/63}, que também foi oxidado a dímeros e quinurenina. Além dessas alterações, ocorreu fragmentação da lisozima tratada com MPO. Desta forma, verifica-se que o triptofano, além da tirosina, é um alvo importante para oxidantes derivados do óxido nítrico. Em geral, o peroxinitrito foi capaz de difundir para o interior da proteína, mostrando-se menos específico que o sistema com MPO/H₂O₂/NO₂⁻.

Paralelamente, examinou-se os efeitos do nitróxido tempol na nitração da RNase mediada por MPO ou HRP/H₂O₂/NO₂⁻. De fato, as interações de tempol com peroxidases são pouco conhecidas apesar da eficiência do nitróxido em reduzir a injúria e os níveis de 3-nitrotirosina em proteínas de tecidos animais submetidos a condições inflamatórias. As constantes de velocidade da reação do tempol com os intermediários oxidantes da MPO e HRP determinadas neste estudo poderão auxiliar na análise de sistemas biológicos mais complexos. Além disso, a simulação dos nossos resultados indicou que o tempol inibe a nitração da RNase mediada por peroxidases principalmente pela sua capacidade de reagir rapidamente com dióxido de nitrogênio com formação de nitrito e do cátion oxamônio que, por sua vez, recicla tempol reagindo com peróxido de hidrogênio para produzir oxigênio.

7. Referências

- Abu-Soud, H.M.; Hazen, S.L. (2000) Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* **275**: 5425-5430.
- Agner, K. (1958) Crystalline Myeloperoxidase. *Acta Chem. Scand.* **12**: 89-94.
- Albrich, J.M.; McCarthy, C.A.; Hurst, J.K. (1981) Biological reactivity of hypochlorous acid: implications for microbicidal mechanisms of leukocyte myeloperoxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**: 210-214.
- Alvarez, B.; Rubbo, H.; Kirk, M.; Barnes, S.; Freeman, B.A.; Radi, R. (1996) Peroxynitrite-dependent tryptophan nitration. *Chem. Res. Toxicol.* **9**: 390-396.
- Alves, R.; Antunes, F.; Salvador, A. (2006) Tools for kinetic modeling of biochemical networks. *Nat. Biotechnol.* **24**: 667-672.
- Arnhold, J.; Furtmüller, P.G.; Obinger, C. (2003) Redox properties of myeloperoxidase. *Redox Report* **8**: 179-186.
- Aso, Y.; Shiraki, K.; Takagi, M. (2007) Systematic analysis of aggregates from 38 kinds of non disease-related proteins: identifying the intrinsic propensity of polypeptides to form amyloid fibrils. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**: 1313-1321.
- Augusto, O. (2006) Radicais livres: bons, maus e naturais. Oficina de Textos, São Paulo, Brasil.
- Augusto, O.; Bonini, M.G.; Amanso, A.M.; Linares, E.; Santos, C.C.X.; de Menezes, S.L. (2002) Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: Two emerging radicals in biology. *Free Radical Biol. Med.* **32**: 841-859.
- Augusto, O.; Muntz Vaz, S. (2007) EPR spin trapping of protein radicals to investigate biological oxidative mechanisms. *Amino Acids* **32**: 535-542.
- Banham, H.A.L.; Haldane, J.S.; Savage, T. (1925) The presence of post mortem of nitric-oxide-haemoglobin. *Br. Med. J. Aug.* **1**: 187-189.
- Beckman, J.S.; Beckman, T.W.; Chen, J.; Marshall, P.A.; Freeman, B.A. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 1620-1624.
- Boccini, F.; Herold, S. (2004) Mechanistic studies of the oxidation of oxyhemoglobin by peroxynitrite. *Biochemistry* **43**: 16393-16404.
- Bonini, M.C.; Fernandes, D.C.; Augusto, O. (2004) Albumin oxidation to diverse radicals by the peroxidase activity of Cu,Zn-superoxide dismutase in the presence of bicarbonate or nitrite: diffusible radicals produce cysteinyl and solvent-exposed and -unexposed tyrosyl radicals. *Biochemistry* **43**: 344-351.

Bonini, M.G.; Mason, R.P.; Augusto, O. (2002) The mechanism by which 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidene-1-oxyl (tempol) diverts peroxynitrite decomposition from nitrating to nitrosating species. *Chem. Res. Toxicol.* **15**: 506-511.

Bonini, M.G.; Radi, R.; Ferrer-Sueta, G.; Da, C.; Ferreira, A.; Augusto, O. (1999) Direct EPR detection of the carbonate radical anion produced from peroxynitrite and carbon dioxide. *J. Biol. Chem.* **274**: 10802-10806.

Borisenko, G.G.; Martin, I.; Zhao, Q.; Amoscato, A.A.; Kagan, V.E. (2004a) Nitroxides scavenge myeloperoxidase-catalyzed thiyl radicals in models and in cells. *J. Am. Chem. Soc.* **126**: 9221-9232.

Borisenko, G.G.; Martin, I.; Zhao, Q.; Amoscato, A.A.; Tyurina, Y.Y.; Kagan, V.E. (2004b) Glutathione propagates oxidative stress triggered by myeloperoxidase in HL-60 cells. Evidence for glutathionyl radical-induced peroxidation of phospholipids and cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* **279**: 23453-23462.

Bredt, D.S.; Hwang, P.M.; Snyder, S.H. (1990) Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* **347**: 768-770.

Bredt, D.S.; Snyder, S.H. (1989) Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 9030-9033.

Bredt, D.S.; Snyder, S.H. (1990) Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 682-685.

Brennan, M.L.; Hazen, S.L. (2003) Emerging role of myeloperoxidase and oxidative stress markers in cardiovascular risk assessment. *Curr. Opin. Lipidol.* **14**: 353-359.

Brennan, M.L.; Penn, M.S.; van Lente, F.; Nambi, V.; Shishehbor, M.H.; Aviles, R.J.; Goormastic, M.; McErlean, E.S.; Topol, E.J.; Nissen, S.E.; Hazen, S.L. (2003) Prognostic values of myeloperoxidase in patients with chest pain. *N. Engl. J. Med.* **349**: 1595-1604.

Brennan, M.L.; Wu, W.; Fu, X.; Shen, Z.; Song, W.; Frost, H.; Vadseth, C.; Narine, L.; Lenkiewicz, E.; Borchers, M.T.; Aldons, J.L.; Lee, J. J.; Lee, N.A.; Abu-Soud, H.M.; Ischiropoulos, H.; Hazen, S. L. (2002) A tale of two controversies: defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. *J. Biol. Chem.* **277**: 17415-17427.

Burgess, A.W.; Scheraga, H.A. (1975) A hypothesis for the pathway of the thermally-induced unfolding of bovine pancreatic ribonuclease. *J. Theor. Biol.* **53**: 403-20.

Burner, U.; Furtmüller, P. G.; Kettle, A. J.; Koppenol, W. H.; Obinger, C. (2000) Mechanism of reaction of myeloperoxidase with nitrite. *J. Biol. Chem.* **275**: 20597-20601.

Castro, L.; Rodriguez, M.; Radi, R. (1994) Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **269**: 29409-29415.

Chen, Y.-R.; Chen, C.-L.; Chen, W.; Zweier, L.; Augusto, O.; Radi, R.; Mason, R.P. (2004) Formation of protein tyrosine ortho-semiquinone radical and nitrotyrosine from cytochrome c-derived tyrosyl radical. *J. Biol. Chem.* **279**: 18054-18062.

Claiborne, A. (1995) in *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research* (Greenwald, R. A., Ed.) pp 283-284, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.

Denicola, A.; Souza, J.M.; Radi, R. (1998) Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 3566-3571.

Dhanasekaran A.; Kotamraju, S.; Karunakaran, C.; Kalivendi, S.V.; Thomas, S.; Joseph, J.; Kalyanaraman, B. (2005) Mitochondria superoxide dismutase mimetic inhibits peroxide-induced oxidative damage and apoptosis: role of mitochondrial superoxide. *Free Radic. Biol. Med.* **39**: 567-583.

Dunford, H.B. (1999) Heme Peroxidases, pp. 349-385, Wiley-VCH, New York.

Eiserich, J.P.; Hristova, M.; Cross, C.E.; Jones, A.D.; Freeman, B.A.; Halliwell, B.; van der Vliet, A. (1998) Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* **391**: 393-397.

Esposito, E.; Cuzzocrea, S. (2007) The role of nitric oxide synthases in lung inflammation. *Curr Opin Investig Drugs.* **8**: 899-909.

Exner, M.; Herold, S. (2000) Kinetic and mechanistic studies of the peroxynitrite-mediated oxidation of oxymyoglobin and oxyhemoglobin. *Chem. Res. Toxicol.* **13**: 287-293.

Feelish, M.; Rassaf, T.; Mnaimneh, S.; Singh, N.; Bryan, N.S.; Jour'd'Heuil, D.; Kelm, M. (2002) Concomitant S-, N-, and heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo. *FASEB J.* **16**: 1775-1785.

Fernandes, D.C.; Medinas, D.B.; Alves, M.J.; Augusto, O. (2005) Tempol diverts peroxynitrite/carbon dioxide reactivity toward albumin and cells from protein-tyrosine nitration to protein-cysteine nitrosation. *Free Radic. Biol. Med.* **38**: 189-200.

Furchgott, R.F.; Zawadzki, J.V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**: 373-376.

Furtmüller, P.G.; Obinger, C.; Hsuanyu, Y.; Dunford, H.B. (2000) Mechanism of reaction of myeloperoxidase with hydrogen peroxide and chloride ion. *Eur. J. Biochem.* **267**: 5858-5864.

Furtmüller, P.G.; Zederbauer, M.; Jantschko, W.; Helm, J.; Bogner, M.; Jatopitsch, C.; Obinger, C. (2006) Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases. *Arch. Biochem. Biophys.* **445**: 199-213.

Ghibaudi, E.; Laurenti, E. (2003) Unraveling the catalytic mechanism of lactoperoxidase and myeloperoxidase. A reflection on some controversial features. *Eur. J. Biochem.* **270**: 4403-4412.

Gieseg, S.P.; Simpson, J.A.; Charlton, T.S.; Duncan, M.W.; Dean, R.T. (1993) Protein-Bound 3,4-Dihydroxyphenylalanine is a major reductant formed during hydroxyl radical damage to proteins. *Biochemistry* **32**: 4780-4786.

Goldstein, S.; Czapski, G.; Lind, J.; Merenyi, G. (1998) Mechanism of Decomposition of Peroxynitric Ion (O(2)NOO(-)): Evidence for the Formation of O(2)(*-) and (*)NO(2) Radicals. *Inorg. Chem.* **37**: 3943-3947.

Goldstein, S., Merenyi G.; Russo, A. Samuni A. (2003a) The role of oxoammonium cation in the SOD-mimic activity of cyclic nitroxides. *J. Amer. Chem. Soc.* **125**: 789-795.

Goldstein, S., Samuni A., Russo, A. (2003b) Reaction of cyclic nitroxides with nitrogen dioxide: the intermediacy of the oxammonium cations. *J. Amer. Chem. Soc.* **125**: 8364-8370.

Goldstein, S., Samuni A., Merenyi G. (2004) Reactions of nitric oxide, peroxynitrite, and carbonate radicals with nitroxides and their corresponding oxoammonium cations. *Chem. Res. Toxicol.* **17**: 250-257.

Goldstein, S., Samuni A., Hideg K.; Merenyi G. (2006) Structure-activity relationship of cyclic nitroxides as SOD mimics and scavengers of nitrogen dioxide and carbonate radicals. *J. Phys. Chem. A* **110**: 3679-3685.

Goldstein, S.; Samuni, A. (2007) Kinetics and mechanism of peroxy radical reactions with nitroxides. *J. Phys. Chem.* **111**: 1066-1072.

Greenacre, S.A.; Ischiropoulos, H. (2001) Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction. *Free Radic. Res.* **34**: 541-581.

Halliwell, B; Gutteridge, J.M.C. (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th. edition. Oxford University Press Inc., New York, USA.

Hamilton, L.; Nielsen, B.R.; Davies, C.A.; Symons, M.C.R.; Winyard, P.G. (2003) Purity of different preparations of sodium 3,5-dibromo-4-nitrosobenzenesulphonate and their applicability for EPR spin trapping. *Free Rad. Res.* **37**: 41-49.

Harrison, J.E.; Schultz, J. (1976) Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* **251**: 1371-1374.

Hawkins, C.L.; Davies, M.J. (2005) The role of aromatic amino acid oxidation, protein unfolding, and aggregation in the hypobromous acid-induced inactivation of trypsin inhibitor and lysozyme. *Chem. Res. Toxicol.* **18**: 1669-1677.

Hazen, S.L.; Heinecke, J.W. (1997) 3-chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. *J. Clin. Invest.* **99**: 2075-2081.

Hazen, S.L.; Hsu, F.F.; Gaut, J.P.; Crowley, J.R.; Heinecke, J.W. (1999) Modification of proteins and lipids by myeloperoxidase. *Methods Enzymol.* **300**: 88-105.

Heinecke, J.W. (2002) Tyrosyl radical production by myeloperoxidase: a phagocyte pathway for lipid peroxidation and dityrosine cross-linking of proteins. *Toxicology* **177**:11-22. Review.

Hensley, K.; Maitt, M.L.; Pye, Q.N.; Stewart, C.A.; Wack, M.; Tabatabaie, T.; Floyd, R.A. (1997) Quantitation of protein-bound 3-nitrotyrosine and 3,4-dihydroxyphenylalanine by high-performance liquid chromatography with electrochemical array detection. *Anal. Biochem.* **251**: 187-195.

Hernández-Ruiz, J.; Arnao, M.B.; Hiner, A.N.; García-Cánovas, F.; Acosta, M. (2001) Catalase-like activity of horseradish peroxidase: relationship to enzyme inactivation by H₂O₂. *Biochem. J.* **354 (Pt 1)**: 107-114

Herold, S.; Shivashankar, K.; Mehl, M. (2002) Myoglobin scavenges peroxynitrite without being significantly nitrated. *Biochemistry* **41**: 13460-13472.

Hoffman, B.M.; Eames, T.B. (1969) Protonated nitroxide free radical. *J. Am. Chem. Soc.* **91**: 2169-2170.

Hofmann, B.; Hecht, H-J.; Flohé, L. (2002) Peroxiredoxins. *Biol. Chem.* **383**: 347-364.

Huie, R.E.; Padmaja, S. (1993) The reaction rate of nitric oxide with superoxide. *Free Rad. Res. Commun.* **18**: 195-199.

Hunter, E.P.; Desrosiers, M.F.; Simic, M.G. (1989) The effect of oxygen, antioxidants, and superoxide radical on tyrosine phenoxyl radical dimerization. *Free Radic. Biol. Med.* **6**: 581-585.

Ignarro, L.J.; Adams, J.B.; Horwitz, P.M.; Wood, K.S. (1986) Activation of soluble guanylate cyclase by NO-hemoproteins involves NO-heme exchange. *J. Biol. Chem.* **261**: 4997-5002.

Ikeda, K.; Hiraoka, B.Y.; Iwai, H.; Matsumoto, T.; Mineki, R.; Taka, H.; Takamori, K.; Ogawa, H.; Yamakura, F. (2007) Detection of 6-nitrotryptophan in proteins by western blot analysis and its application for peroxynitrite-treated PC12 cells. *Nitric Oxide* **16**: 18-28.

Ischiropoulos, H. (1998) Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch. Biochem. Biophys.* **356**: 1-11.

Ishii, Y.; Ogara, A.; Katsumata, T.; Umemura, T.; Nishikawa, A.; Iwasaki, Y.; Ito, R.; Saito, K.; Hirose, M.; Nakazawa, H. (2007) Quantification of nitrated tryptophan in proteins and tissues by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Pharmac. Biomed. Acta* **44**: 150-159.

Jacob, J.S.; Cistola, D.P.; Hsu, F.F.; Muzaffar, S.; Mueller, D.M.; Hazen, S.L.; Heinecke, J.W. (1996) Human phagocytes employ the myeloperoxidase-hydrogen peroxide system to synthesize dityrosine, trityrosine, pulcherosine, and isodityrosine by a tyrosyl radical-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **271**: 19950-19956.

Jantschko, W.; Furtmüller, P.G.; Allegra, M.; Livrea, M.A.; Jakopitsch, C.; Regelsberger, G.; Obinger, C. (2002) Redox intermediates of plant and mammalian peroxidases: a comparison transient kinetic study of their reactivity toward indole derivatives. *Arch. Biochem. Biophys.* **398**: 12-22.

Jantschko, W.; Furtmüller, P.; Zederbauer, M.; Lanz, M.; Jakopitsch, C.; Obinger, C. (2003) Direct conversion of ferrous myeloperoxidase to compound II by hydrogen peroxide: an anaerobic stopped-flow study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312**: 292-298.

Jesaitis, A.J.; Dratz, E.A. (1992) The molecular basis of oxidative damage by leukocytes, CRC Press, Boca Raton, FL.

Jin, F.; Leitich, J.; von Sonntag, C. (1993) *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 1583-1588.

Job, D.; Dunford, H.B. (1978) Kinetics of formation of the primary compound (compound I) from hydrogen peroxide and turnip peroxidases. *Can. J. Biochem.* **56**: 702-707.

Juminaga, W.J.; Wedemeyer, R.; Garduño-Júarez R.; McDonald, M.A.; Scheraga, H.A. (1997) Tyrosyl interactions in the folding of bovine pancreatic ribonuclease A: a study of tyrosine-to-phenylalanine mutants. *Biochemistry* **36**: 10131-10145.

Kagan, V.E.; Jiang, J.; Bayir, H.; Stoyanovsky, D.A. (2007) Targeting nitroxides to mitochondria: location, location, location, and ...concentration: highlight commentary on "Mitochondria superoxide dismutase mimetic inhibits peroxide-induced oxidative damage and apoptosis: role of mitochondrial superoxide". *Free Radical Biol. Med.* **43**: 348-350.

Kaur, H.; Leung, K. H.W.; Perkins, M.J. (1981) A water soluble nitroso-aromatic spin-trap. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **3**: 142-143.

Kettle, A.J.; Sangster, D.F.; Gebicki, J.M.; Winterbourn, C.C. (1988) A pulse radiolysis investigation of the reactions of myeloperoxidase with superoxide and hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta.* **956**: 58-62.

Kettle, A.J.; Winterbourn, C.C. (1994) Superoxide-dependent hydroxylation by myeloperoxidase. *J. Biol. Chem.* **269**: 17146-17151.

Kettle, A.J.; Winterbourn, C.C. (1997) Myeloperoxidase: a key regulator of neutrophil oxidant production. *Redox. Rep.* **3**: 3-15.

Kettle, A.J.; Winterbourn, C.C. (2001) A kinetic analysis of the catalase activity of myeloperoxidase. *Biochemistry* **40**: 10204-10212.

Kettle, A.J.; Anderson, R.F.; Hampton, M.B.; Winterbourn, C.C. (2007) Reactions of superoxide with myeloperoxidase. *Biochemistry* **46**: 4888-4897.

King, D.A.; Sheafor, M.W.; Hurst, J.K. (2006) Comparative toxicities of putative phagocyte-generated oxidizing radicals toward a bacterium (*Escherichia coli*) and a yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Free Radic. Biol. Med.* **41**: 765-774.

Kissner, R.; Nauser, T.; Bugnon, P.; Lye, P.G.; Koppenol, W.H. (1997) Formation and properties of peroxyxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis. *Chem. Res. Toxicol.* **10**: 1285-1292.

Klebanoff, S.J. (1967) A peroxidase-mediated antimicrobial system in leukocytes. *J. Clin. Invest.* **46**: 1078.

Klebanoff, S.J.; Waltersdorff, A.M.; Rosen, H. (1984) Antimicrobial activity of myeloperoxidase. *Methods Enzymol.* **105**: 399-403.

Krishna, M.C.; Grahame D.A.; Samuni A.; Mitchell J.B.; Russo, A. (1992) Oxoammonium cation intermediate in the nitroxide-catalyzed dismutation of superoxide. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 5537-5541.

Krishna, M.C.; Samuni, A.; Taira, J.; Goldstein, S.; Mitchell, J.B.; Russo, A. (1996) Stimulation by nitroxides of catalase-like activity of heme proteins. Kinetics and mechanism. *J. Biol. Chem.* **271**: 26018-26025.

Lancaster JR Jr. (2006) Nitroxidative, nitrosative, and nitrative stress: kinetic predictions of reactive nitrogen species chemistry under biological conditions. *Chem. Res. Toxicol.* **19**: 1160-1174.

Lardinois, O.M.; Ortiz de Montellano, P.R. (2000) EPR spin-trapping of a myeloperoxidase protein radical. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**: 199-202.

Lee, B.; Richards, F.M. (1971) The interpretation of protein structures: estimation of static accessibilities. *J. Mol. Biol.* **55**: 379-400.

Linares E.; Giorgio, S.; Mortara, R.A.; Santos C.X.; Yamada, A.T.; Augusto O. (2001) Role of peroxyxynitrite in macrophage microbicidal mechanisms in vivo revealed by protein nitration and hydroxylation. *Free Radic. Biol. Med.* **30**: 1234-1242.

Liochev, S.I.; Fridovich, I. (2002) Copper, zinc superoxide dismutase and H₂O₂. Effects of bicarbonate on inactivation and oxidations of NADPH and urate, and on consumption of H₂O₂. *J. Biol. Chem.* **277**: 34674-34678.

Loegager T.; Sehested, K. (1993) Formation and decay of peroxyxynitric acid: a pulse radiolysis study. *J. Phys. Chem.* **97**: 10047-10052

Maehly, A.C.; Chance, B. (1954) The assay of catalases and peroxidases. *Methods Biochem. Anal.* **1**: 357-424.

Mallard, W.G.; Ross, A.B.; Helman, W.P. *Nist Standard References Database 40*, Version 3.0, 1998.

Malle, E.; Buch, T.; Grone, H-J. (2003) Myeloperoxidase in kidney disease. *Kidney Intern.* **64**: 1956-1967.

Maréchal, A.; Mattiolo, T.A.; Stuehr, D.J.; Santolini, J. (2007) Activation of peroxyxynitrite by inducible nitric-oxide synthase: a direct source of nitrative stress. *J. Biol. Chem.* **282**: 14101-14112.

Marquez, L.A., Dunford, H.B. (1995) Kinetics of oxidation of tyrosine and dityrosine by myeloperoxidase compounds I and II. Implications for lipoprotein peroxidation studies. *J. Biol. Chem.* **270**: 30434-30440.

Marquez, L.A.; Dunford, H.B.; Van Mart, H. (1990) Kinetic studies on the reaction of compound II of myeloperoxidase with ascorbic acid. Role of ascorbic acid in myeloperoxidase function. *J. Biol. Chem.* **265**: 5666-5670.

Marquez, L.A.; Huang, J.T.; Dunford, H.B. (1994) Spectral and kinetic studies on the formation of myeloperoxidase compounds I and II: roles of hydrogen peroxide and superoxide. *Biochemistry* **33**: 1447-1454.

Maskos, Z.; Rush, J.D.; Koppenol, W.H. (1992) The hydroxylation of tryptophan. *Arch. Biochem. Biophys.* **296**: 514-520.

Mendes, P (1997) Biochemistry by numbers: simulation of biochemical pathways with GEPASI 3. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 361-363.

Mishra, R.; Sörgjerd, K.; Nyström, S.; Nordigarden, A.; Yu, Y.C.; Hammarström, P. (2007) Lysozyme amyloidogenesis is accelerated by specific nicking and fragmentation but decelerated by intact protein binding and conversion. *J. Mol. Biol.* **366**: 1029-1044.

Monzani, E.; Roncone, R.; Galliano, M.; Koppenol, W.H.; Casella, L. (2004) Mechanistic insight into the peroxidase catalyzed nitration of tyrosine derivatives by nitrite and hydrogen peroxide. *Eur. J. Biochem.* **271**: 895-906.

Moncada, S.; Herman, A.G.; Vanhoutte, P.M. (1987) Endothelium-derived relaxing factor is identified as nitric oxide. *Trends Pharmacol. Sci.* **8**: 365-368.

Muniappan, L.; Ozcan, S. (2007) Induction of insulin secretion in engineered liver cells by nitric oxide. *BMC Physiol.* **7**: 11 (in press).

Naskalski, J.W. (1994) Oxidative modification of protein structures under the action of myeloperoxidase and the hydrogen peroxide and chloride system. *Ann. Biol. Clin.* **52**: 451-456.

Navon, A.; Ittah, J.H.; Scheraga, H.A.; Haas, E.; Gussakovsky, E.E. (2001) Local and long-range interactions in the thermal unfolding transition of bovine pancreatic ribonuclease A. *Biochemistry* **40**: 93-104.

Nicholls, S.J.; Hazen, S.L. (2005) Myeloperoxidase and cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**: 1102-1111.

Novak, I.; Harrison, L.J.; Kovac, B.; Pratt, L.M. (2004) Electronic structure of persistent radicals: nitroxides. *J. Org. Chem.* **69**: 7628-7634.

Pacher, P; Beckman, J.S.; Liaudet, L. (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* **87**: 315-424. Review

Palacios-Callender, M.; Hollis, V.; Mitchison, M.; Frakich, N.; Unitt, D.; Moncada, S. (2007) Cytochrome c oxidase regulates endogenous nitric oxide availability in respiring cells: A possible explanation for hypoxic vasodilation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (in press).

Palazzolo-Balance A.M.; Suquet, C.; Hurst, J.K. (2007) Pathways for intracellular generation of oxidants and tyrosine nitration by a macrophage cell line. *Biochemistry* **46**: 7536-7548.

Paz, M.A.; Flückiger, R.; Boak, A.; Kagan, H.M.; Gallop, P.M. (1991) Specific detection of quinone-proteins by redox-cycling staining. *J. Biol. Chem.* **266**: 689-692.

Podrez, E.A.; Abu-Soud, H.M.; Hazen, S.L. (2000) Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radic. Biol. Med.* **28**: 1717-1725.

Podrez, E.A.; Schmitt, D.; Hoff, H.F.; Hazen, S.L. (1999) Myeloperoxidase-generated reactive nitrogen species convert LDL into an atherogenic form in vitro. *J. Clin. Invest.* **103**: 1547-1560.

Praissman, M.; Rupley, J.A. (1968) Comparison of protein structure in the crystal and in solution. 3. Tritium-hydrogen exchange of lysozyme and a lysozyme-saccharide complex. *Biochemistry* **7**: 2446-2450.

Prutz, W.A.; Monig, H.; Butler, J.; Land, E.J. (1985) Reactions of nitrogen dioxide in aqueous model systems: oxidation of tyrosine units in peptides and proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **243**: 125-134.

Bryan, W.P.; Nielsen, S.O. (1969) Hydrogen--deuterium exchange of bovine plasma albumin. *Biochemistry* **8**: 2572-2579.

Radi, R. (2004) Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 4003-4008.

Ralston, I.M.; Dunford, H.B. (1980) Horseradish peroxidase. XLII. Oxidations of L-tyrosine and 3,5-diiodo-L-tyrosine by compound II. *Can. J. Biochem.* **58**: 1270-1276.

Ramezani, M.S.; Padmaja, S.; Koppenol, W.H. (1996) Nitration and hydroxylation of phenolic compounds by peroxynitrite. *Methods Enzymol.* **269**: 195-201. Review.

Ramirez, D.C.; Chen, Y.R.; Mason, R.P. (2003) Immunochemical detection of hemoglobin-derived radicals formed by reaction with hydrogen peroxide: involvement of a protein-tyrosyl radical. *Free Radic. Biol. Med.* **34**: 830-839.

Rhee, G.H.; Chae, H.Z.; Kim, K. (2005) Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic. Biol. Med.* **38**: 1543-1552. Review.

Roman, R.; Dunford, H.B. (1973) Studies on horseradish peroxidase XII. A kinetic study of the oxidation of sulfite and nitrite by compounds I and II. *Can. J. Chem.* **51**: 588-596.

Sampson, J.B.; Ye, Y.; Rosen, H.; Beckman, J.S. (1998) Myeloperoxidase and horseradish peroxidase catalyze tyrosine nitration in proteins from nitrite and hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **356**: 207-213.

Santos, C.X.C.; Bonini, M.G.; Augusto, O. (2000) Role of the carbonate radical anion on tyrosine nitration and hydroxylation by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* **377**, 147-152.

Schonbaum, G.R.; Lo, S. (1972) Interaction of peroxidases with aromatic peracids and alkyl peroxides. Product Analysis. *J. Biol. Chem.* **247**: 3353-3360.

Strohalm, M.; Santrucek, J.; Hynek, R.; Kodíček, M. (2004) Analysis of tryptophan surface accessibility in proteins by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **323**: 1134-1138.

Sharp, J.S.; Becker, J.M.; Hettich, R.L. (2004) Analysis of protein solvent accessible surfaces by photochemical oxidation and mass spectrometry. *Anal. Chem.* **76**: 672-683.

Shibasaki, M.; Durand, S.; Davis, S.L.; Cui, J.; Low, D.A.; Keller, D.M.; Crandall, C.G. (2007) Endogenous nitric oxide attenuates neutrally-mediated cutaneous vasoconstriction. *J. Physiol.* (in press).

Soule B.P.; Hyodo, F.; Matsumoto, K.; Simone, N.L.; Cook, J.A.; Krishna, M.C.; Mitchell, J.B. (2007) The chemistry and biology of nitroxide compounds. *Free Radical Biol. Med.* **42**: 1632-1650.

Souza, J.M.; Daikhin, E.; Yudkoff, M.; Raman, C.S.; Ischiropoulos, H. (1999) Factors determining the selectivity of protein tyrosine nitration. *Arch. Biochem. Biophys.* **371**: 169-178.

Strohalm, M.; Santrucek, J.; Hynek, R.; Kodíček, M. (2004) Analysis of tryptophan surface accessibility in proteins by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **323**:1134-1138.

Suzuki, T.; Mower, H. F.; Friesen, M. D.; Gilibert, I.; Sawa, T.; Ohshima, H. (2004) Nitration and nitrosation of N-acetyl-L-tryptophan and tryptophan residues in proteins by various reactive nitrogen species. *Free Radic. Biol. Med.* **37**: 671-681.

Taylor, D.M.; Gibbs, B.F.; Kabashi, E.; Minott, S.; Durham, H.D.; Agar, J.N. (2007) Tryptophan 32 potentiates aggregation and cytotoxicity of a copper/zinc superoxide dismutase mutant associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Biol. Chem.* **282**: 16329-16335.

Teng, C.L.; Bryant, R.G. (2004) Mapping oxygen accessibility to ribonuclease A using high-resolution NMR relaxation spectroscopy. *Biophys. J.* **86**: 1713-1725.

Thiemermann C. (2003) Membrane-permeable radical scavengers (tempol) for shock, ischemia-reperfusion injury, and inflammation. *Crit. Care Med.* **31**: S76-84.

Tien, J. (1999) Myeloperoxidase-catalysed oxidation of tyrosine. *Arch. Biochem. Biophys.* **367**: 61-66.

Vissers, M.C.M.; Winterbourn, C.C. (1987) Myeloperoxidase-dependent oxidative inactivation of neutrophil neutral proteinases and microbicidal enzymes. *Biochem. J.* **245**: 277-280.

Weiss, S.J.; Test, S.T.; Eckmann, C.M.; Roos, D.; Regiani, S. (1986) Brominating oxidants generated by human eosinophils. *Science* **234**: 200-203.

Winterbourn, C.C.; Garcia, R.C.; Segal, A.W. (1985) Production of the superoxide adduct of myeloperoxidase (compound III) by stimulated human neutrophils and its reactivity with hydrogen peroxide and chloride. *Biochem J.* **228**: 583-92.

Winterbourn, C.C.; Vissers, M.C.M.; Kettle, A.J. (2000) Myeloperoxidase. *Curr. Opin. Hemat.* **7**: 53-58.

Wise, D.L.; Houghton, G. (1968) Diffusion coefficients of neon, krypton, xenon, carbon monoxide, and nitric oxide in water at 10-60°C. *Chem. Eng. Sci.* **23**: 1211-1216.

Wright, P.J.; English, A.M. (2003) Scavenging with TEMPO* to identify peptide- and protein-based radicals by mass spectrometry: Advantages of spin scavenging over spin trapping. *J. Am. Chem. Soc.* **125**: 8655-8665.

Xu, G; Narayan, M.; Kurinov, I.; Ripoll, D.R.; Welker, E.; Khalili, M.; Ealick, S.E.; Scheraga, H.A. (2006) A localized specific interaction alters the unfolding pathways of structural homologues. *J. Am. Chem. Soc.* **128**: 1204-1213.

Yamakura, F.; Matsumoto, T.; Ikeda, K.; Taka, H.; Fujimura, T.; Murayama, K.; Watanabe, E.; Tamaki, M.; Imai, T.; Takamori, K. (2005) Nitrated and oxidized products of a single tryptophan residue in human Cu,Zn-superoxide dismutase treated with either peroxynitrite-carbon dioxide or myeloperoxidase-hydrogen peroxide-nitrite. *J. Biochem.* **138**: 57-69.

Zeng, J.; Fenna, R.E. (1992) X-ray crystal structure of canine myeloperoxidase at 3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **226**: 185-207.

Zhang, H.; Joseph, J.; Crow, J.; Kalyanaraman, B. (2004) Mass spectral evidence for carbonate-anion-radical-induced posttranslational modification of tryptophan to kynurenine in human Cu, Zn superoxide dismutase. *Free Radic. Biol. Med.* **37**: 2018-2026.

Zhang, H.; Joseph, J.; Felix, C.; Kalyanaraman, B. (2000) Bicarbonate enhances the hydroxylation, nitration, and peroxidation reactions catalyzed by copper, zinc superoxide dismutase. Intermediacy of carbonate anion radical. *J. Biol. Chem.* **275**:14038-14045.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Sandra Muntz Vaz
Local e data de nascimento: São Paulo, 18/09/1969

EDUCAÇÃO

Colégio de Santa Inês, São Paulo, 1986.

Universidade de São Paulo, São Paulo, 1990.
Graduação em Química

Universidade de São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 1995.
Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear.
“Análise de Extratos de Plantas Medicinais pelo Método de Ativação com Nêutrons”

OCUPAÇÃO

Bolsista de Doutorado, FAPESP, de 2003-2007.

OUTRAS ATIVIDADES

Funcionária da indústria alimentícia Nestlé durante o período de 1992 a 2002.

PUBLICAÇÕES (Artigos Completos e Resumos em Congressos)

Artigos Completos

Vaz, SM ; Augusto, O. Inhibition of myeloperoxidase-mediated protein nitration by tempol: kinetics, mechanisms and implications. Submetido

Augusto, O ; VAZ, SM. EPR spin-trapping of protein radicals to investigate biological oxidative mechanisms. Amino Acids (Wien), v. 32, p. 535-542, 2007.

VAZ, SM ; Saiki M ; Vasconcellos, MBA ; Sertié, JAA. Neutron-activation analysis of medicinal plant-extracts. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, v. 195, p. 185-193, 1995.

Resumos em Congressos

VAZ, SM; Augusto, O. Comparison of Protein Oxidation/Nitration by Myeloperoxidase and Peroxynitrite. In: V Meeting of SFRBM – South American Group. V International Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species, 2007, Montevideo.

VAZ, SM; Augusto, O. The Mechanism by which Tempol Inhibits Peroxidase-mediated Protein Nitration. In: V Meeting of SFRBM – South American Group. V International Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species, 2007, Montevideo.

VAZ, SM ; Augusto, O. The Mechanism by which Tempol Inhibits Peroxidase-mediated Protein Nitration. In: SFRBM 2006 - 13th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine, 2006, Denver. Free Radical of Biology and Medicine, 2006. v. 41. p. S142-S143.

VAZ, SM ; Augusto, O. Detection and Characterization of Protein Radicals by Spin Trapping, MS, Proteolysis and Peptide Mapping exemplified with Lysozyme treated with Peroxynitrite and Myeloperoxidase/H₂O₂/NO₂⁻. In: 1o. Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas - BrMASS, 2005, Campinas. Anais do 1o. Congresso BrMASS, 2005.

VAZ, SM ; Augusto, O. Inhibitory Effects of tempol on Protein-Tyr Nitration mediated by Peroxidase/H₂O₂/NO₂⁻. In: IV Meeting of the South American Group of the Society for Free Radical Biology and Medicine, 2005, Águas de Lindóia. Anais do Meeting, 2005.

VAZ, SM ; Augusto, O. Comparison of Protein-Tyr Nitration and Hydroxylation by Peroxynitrite and Myeloperoxidase. In: SFRR's 12th Biennial Meeting, 2004, Argentina. Free Radical Biology & Medicine. Maryland : Elsevier, 2004. v. 36. p. S71-S72.

VAZ, SM ; Detweiler, CD ; Mason, RP ; Augusto, O. Immuno- and MS-detection of Ribonuclease Radicals produced from Peroxynitrite and Myeloperoxidase/H₂O₂/NO₂⁻. In: SFRR's 12th Biennial Meeting, 2004, Argentina. Free Radical Biology & Medicine. Maryland : Elsevier, 2004. v. 36. p. S72-S72.

VAZ, SM ; Augusto, O. Comparison of Protein-Tyr Nitration and Hydroxylation by Peroxynitrite and Myeloperoxidase. In: XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2004, Caxambú. Anais do XXXIII Congresso da SBBq, 2004.

Prêmio Recebido

Young Investigator Award no V Meeting of SFRBM – South American Group. V International Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species, 2007, The Mechanism by which Tempol Inhibits Peroxidase-mediated Protein Nitration.