UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

VALESCA ANSCHAU

Caracterização cinética da redução das 1-Cys Peroxirredoxinas por ascorbato

Kinetic characterization of the reduction of 1-Cys Peroxiredoxins by ascorbate

São Paulo 2016

VALESCA ANSCHAU

Caracterização cinética da redução das 1-Cys Peroxirredoxinas por ascorbato

Kinetic characterization of the reduction of 1-Cys Peroxiredoxins by ascorbate Versão corrigida: O original se encontra disponível para consulta no Instituto de Biociências

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para obtenção de Título de Doutor em Ciências, na Área de Biologia/Genética.

Orientador: Luis Eduardo Soares Netto

São Paulo 2016

Ficha Catalográfica

Anschau, Valesca.

Caracterização cinética da redução das 1-Cys Peroxirredoxinas por ascorbato / Valesca Anschau; orientador Luis Eduardo Soares Netto --São Paulo, 2016.

154 f.

Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Biologia Evolutiva e Genética.

1. Peroxirredoxinas. 2. Atividade dependente de ascorbato. 3. Ácido sulfênico. 4. Processos redox. I. Netto, Luis Eduardo Soares. II. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Biologia Evolutiva e Genética. III. Título.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Orientador

Dedicatória

A minha família: minha mãe e minha irmã

Epígrafe

"Uma descoberta consiste em ver o que todo mundo já viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou." (Albert von Szent-Gyorgyi)

"A persistência é o menor caminho do êxito". (Charles Chaplin) Este agradecimento especial é para a meu orientador Luis Eduardo Soares Netto, por seu comprometimento com a minha formação, ensinos constantes sem necessidade de hora marcada para conversar mesmo quando estava atarefado. Gostaria de agradecer por ter tido uma orientação tão próxima, por ter me proporcionado conhecer o mundo através da ciência e por acreditar em mim. Eu nunca duvidei que você sempre tivesse as melhores intenções em sua mente. Eu me sinto muito sortuda por você ter me encorajado a participar de conferências, a me preparar para a carreira na ciência e ajudar no meu crescimento profissional. Além disso, pelo exemplo de cientista sério e disposto a colaborar e expandir o conhecimento para novas áreas. Meu muito obrigado!

Agradeço a todos meus amigos que conheci durante toda essa trajetória enriquecendo minha vida com conselhos, em especial a minha amiga Marina que desde que vivo em São Paulo foi meu anjo da guarda. Sem ela, tudo teria sido mais complicado. A Lorena que fez parte dos meus fins de semana durante esses anos. A Sophia minha amiga grega-english pela amizade verdadeira e incansáveis aulas de Portuguese-English.

A Faculdade de Ciências de Montevidéu por me receber com muito amor o tempo que vivi nessa cidade e por ser um dos melhores grupos que já trabalhei. Aos colegas de laboratório por fazer nossos dias mais divertidos. A Stephanie, que foi minha segunda família quando estive no Uruguai e ao professor Gerardo Ferrer-Sueta que fez parte do desenvolvimento de técnicas que ajudaram a enriquecer meu doutorado e meu conhecimento sobre cinética.

A Universidade de Sevilha - Espanha e aos colegas de laboratório pela paciência e pela disponibilidade de me ajudar nos ensaio de Western Blot, qPCR e com o portunhol. Ao Francisco Javier Cejudo pela oportunidade de poder trabalhar durante seis meses com seu grupo de pesquisa e a Pablo que me fez enamorme por Sevilha e aguentar todo o meu "bom" humor durante a escrita desta tese.

A todos os meus colegas de laboratório (Alegria, Anita, Andressa, Aleixo, César, Cris, Diogo, Edu, Fernando, Flávio, Julia, Renata, Renato, Rogério, Sushi, Vanessa) pelas risadas, bolos de aniversário e pela convivência por todo esse tempo. Eu desejo a todos o melhor em suas vidas profissionais e pessoais.

Agradeço em especial a todas as pessoas que me cederam gentilmente as construções das proteínas recombinantes ou os plasmídeos, e que fizeram com que essa tese ficasse ainda mais linda. Ao Fernando Gomes (1-Cys Prx de *S. cerevisiae*); a Renata Bannitiz Fernandes (1-Cys Prx de *A. fumigatus*), Gilberto Kaihami (1-Cys Prx de *P. aeruginosa*); ao Carlos Tairum Jr. (2-Cys Prx de *S. cerevisiae*); Dr. Francisco Javier Cejudo (1-Cys Prx de *T. aestivum*).

Aos membros da banca de defesa da tese, por participar da avaliação do meu trabalho, podendo contribuir para a melhoria da qualidade dos meus resultados.

À FAPESP pelo apoio financeiro com a bolsa de doutorado (processo: 2012/00629-3).

A CAPES pelo apoio financeiro com a bolsa de doutorado sanduíche no exterior – Uruguai (processo: 10605-14-2)

Ao CNPq pelo apoio financeiro com a bolsa de doutorado sanduíche no exterior - Espanha (processo: 202718/2015-8).

É muito difícil agradecer a todos sem esquecer, inevitavelmente, de alguém...

Resumo

Peroxirredoxinas (Prxs) são enzimas que desempenham papéis centrais no metabolismo redox celular, são proteínas abundantes reduzindo peróxidos com uma velocidade extraordinária. As Prxs estão presentes em todos os grupos taxonômicos, possuem várias isoformas com diferentes funções, tais como antioxidantes, chaperonas moleculares e reguladores da transdução de sinal. São peroxidases tióis dependentes baseadas em um resíduo de cisteína catalítico podendo ser divididas em 1-Cys ou 2-Cys, dependendo do número de resíduos de cisteínas envolvidos na catálise. Inicialmente a redução das Prxs foi descrita por ser estritamente dependente de tióis, no entanto nosso grupo demonstrou que o ascorbato também poderia reduzir o sulfênico intermediário das 1-Cys Prx (1-Cys Prx-SOH) em diferentes organismos. Esses dados representam um quebra no paradigma antioxidante tiól específico, mostrando que o ascorbato pode reduzir os ácidos sulfênicos nas 1-Cys Prx. Para obter evidências que o ascorbato possa ser considerado um redutor biológico das 1-Cys Prx, foi necessário determinar a constante de segunda ordem, uma vez que em células, outros compostos podem competir com este antioxidante. Devido a problemas técnicos, este foi um desafio por muitos anos. Neste trabalho, descrevemos a caracterização cinética da redução de ácidos sulfênicos por ascorbato em diferentes proteínas. Primeiramente, a redução das 1-Cys Prx-SOH foi analisado usando a enzima de A. fumigatus (AfPrxA) que apresenta similaridade de 37% com a Prdx6 (1-Cys Prx humana) e foi considerada uma enzima bastante estável. Inicialmente, realizamos a análise bi-substrato utilizando eletrodos específicos para H₂O₂ (Free Radical Analyzer 4100 da World Precision Instruments Inc.), através de uma abordagem de estado estacionário. AfPrxA decompõem H2O2 em uma reação ascorbato dependente com boa eficiência ($k_{cat}/K_{M asc} = 7,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), através de um mecanismo Bi-Bi Ping-Pong. Para apoiar ainda mais esses resultados, desenvolvemos uma abordagem cinética independente, baseada na competição entre diclorofenolindofenol (DCPIP) e ácidos sulfênicos por ascorbato. DCPIP é um sensor redox, cuja a coloração azul é perdida quando reduzido. Primeiramente, confirmamos que o DCPIP foi reduzido por ascorbato com uma constante de segunda ordem de 718 M⁻¹s⁻¹, similar a valores descritos na literatura anteriormente. Este método validou nossas condições de ensaio, permitindo determinar a constante de segunda ordem de reação entre AfPrxA-SOH e ascorbato (1,4 x 10³ M⁻¹s⁻¹) a pH 7,44, 25°C através da abordagem de pseudo-primeira ordem. Portanto, por dois métodos diferentes, demonstramos que o ascorbato reduz a AfPrxA-SOH com constantes de velocidade na ordem de 10³ M⁻¹s⁻¹. Este ensaio também nos permitiu determinar as constantes de segunda ordem para as 1-Cys Prx de diferentes organismos como bactéria, levedura, planta e mamíferos. Em todos os casos, as constantes de velocidade foram na ordem de 10³ M⁻¹s⁻¹. Posteriormente, analisamos se a 2-Cys Prx de levedura (Tsa1), que possui uma mutação na cisteína de resolução por um resíduo de serina (Tsa1-C170S) poderia adquiri atividade ascorbato dependente. Novamente, a forma ácido sulfênico da Tsa1-C170S foi reduzida por ascorbato na mesma ordem de grandeza de 10³ M⁻¹s⁻ ¹. Em adição, decidimos investigar a redução dos Cys-SOH por ascorbato em outras proteínas como Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e Papaína que também possuem um ácido sulfênico como produto da oxidação. A constante de segunda ordem obtida da reação com ascorbato foi novamente à mesma ordem de grandeza (10³ M⁻¹s⁻¹). Em conclusão, a redução de ácidos sulfênicos presentes nas Prxs por ascorbato pode ser considerada relevante em compartimentos subcelulares em que este redutor esteja presente em grandes quantidades. Além disso, o ascorbato pode reduzir ácidos sulfênicos de outras proteínas, e esta interação pode representar uma nova via na biologia redox que ainda precisa ser explorada in vivo.

Abstract

Peroxiredoxins (Prxs) are enzymes that play central roles in cellular redox metabolism, since they reduce peroxides with extraordinary rates and are abundant proteins. Prxs are found in all kingdoms with multiple isoforms, performing multiple functions such as antioxidants, molecular chaperones, and regulators of signal transduction. Prxs are Cys-based, thiol-dependent peroxidases with remarkable catalytic efficiency that can be divided into 1-Cys or 2-Cys, depending on the number of Cys residues involved in catalysis. Initially, reduction of Prxs was described to be strictly dependent on thiols, but later we showed that ascorbate can also reduce the sulfenic intermediate of 1-Cys Prx (1-Cys Prx-SOH) from various organisms. These data represented a breakthrough in the thiol-specific antioxidant paradigm, as ascorbate can also reduce sulfenic acids in 1-Cys Prx. To gain evidences that ascorbate could be a biological reductant for 1-Cys Prx it was necessary to determinate the respective second order rate constant, since in cells other compounds might compete with this antioxidant. Due to technical issues, this was a challenge for many years. In this work, we describe the kinetic characterization of sulfenic acid reduction by ascorbate in several proteins. Firstly, the reduction of 1-Cys Prx-SOH by ascorbate was analyzed using an enzyme from A. fumigatus (AfPrxA) that is 37% similar to PRDX6 (human 1-Cys Prx) and was quite stable. Initially, a steady-state, bi-substrate approach was followed by means of a specific H₂O₂ electrode (Free Radical Analyzer 4100, World Precision Instruments Inc.). AfPrxA decomposed H_2O_2 in an ascorbate dependent manner with good efficiency $(k_{cat}/K_{M asc} = 7.4 \times 10^3)$ M⁻¹s⁻¹), through a Bi-Bi Ping-Pong mechanism. To further support these findings, we developed an independent, competitive kinetic approach based on the competition between dichlorophenolindophenol (DCPIP) and sulfenic acid to ascorbate. DCPIP is a redox sensor, whose blue color is lost when reduced. Firstly, we confirmed that in our conditions DCPIP was reduced by ascorbate with a second-order rate constant of 718 M⁻¹s⁻¹, similar to values previously described. This procedure validated our assay conditions and allowed us to proceed in the competitive method for the determination of the second order rate constant of the reaction of AfPrxA-SOH with ascorbate (1,5 $x10^{3}M^{-1}s^{-1}$) at pH 7.44, 25°C by pseudo first order approach. Therefore, by two independent approaches, we showed that ascorbate reduced AfPrxA-SOH with rate

constants in the $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ range. It also allowed us to determine the second order rate constants for the reduction 1-Cys Prxs from other organisms such as bacteria, yeast, plant and mammal. In all cases, the rate constants were in the 10^3 M⁻¹s⁻¹ range. Subsequently, we analyzed whether a recombinant yeast 2-Cys Prx (Tsa1), whose resolving Cys (Cys_r) was mutated to a serine residue (Tsa1-C170S) acquired the ascorbate dependent activity. Again, the sulfenic acid form of Tsa1-C170S was reduced by ascorbate in the same 10³ M⁻¹s⁻¹ range. In addition, we decided to investigate the reduction of Cys-SOH by ascorbate in other proteins like glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and Papain that also have a sulfenic acid as product of their oxidation. The second order rate constants obtained for the reaction with ascorbate were again in the same range $(10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1})$. In conclusion, the reduction of sulfenic acids present in Prx by ascorbate might be relevant in the subcellular compartments in which this reductant is present at high levels, capable to compete with other reductants. Furthermore, ascorbate can reduce sulfenic acid in other proteins, and this interaction may represent a new route in redox biology that has yet be explored in vivo.

Lista de Abreviaturas e Siglas

AhpC: Alquil hidroperóxido redutase subunidade C **APX:** Ascorbato peroxidase **ASC:** Ascorbato Cyp: Ciclofilina CysS-: Ânion tiolato Cys_p: Cisteína peroxidásica Cys_r: Cisteína de resolução Cys_p-SOH: Ácido sulfênico Cys_p-SO₂H: Ácido sulfínico Cysp-SO₃H: Ácido sulfônico DCPIP: 2,6 Diclorofenolindofenol **DHA:** Deidroascorbato DTDPy: 4,4 Ditiodipiridina **DTPA:** Ácido dietilenotriamina pentacético **DTT:** 1,4-ditiotreitol **EAA:** Eritroascorbato FADH: Dinucleotídeo de flavina e adenina reduzido GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase Gpx: Glutationa peroxidase Grx: Glutarredoxina **GS:** Glutamina sintetase **GSH:** Glutationa **GST:** Glutationa-S-transferase HCIO: Ácido hipocloroso HO': Radical hidroxila HO₂: Radical peridroxil H₂O₂: Peróxido de hidrogênio **IPTG:** Isopropil Δ -D-tiogalactopiranosídeo NADH: β-nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido NADPH: β-nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido 2'-fosfato reduzido **NEM:** *N*-etilmaleimida

NTR: Tiorredoxina redutase dependente de NADPH ORF: Open reading frame O₂⁻: Radical ânion superóxido PMSF: Fluoreto de fenilmetilsulfonila Prx: Peroxirredoxina ROO': Radical Peroxil ROS: Espécies Reativas de Oxigênio (Reactive Oxygen Species) SDS: Dodecil sulfato de sódio SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida sob condição desnaturante Srx: Sulfirredoxinas Tris: Tris (hidroximetil) aminometano Trx: Tiorredoxinas TSA: Thiol specific antioxidante Figura 1: Formação de ROS através da reação de transferência de elétrons.23

Figura 2: Reação de redução de peróxidos catalisada por tióis peroxidases......25

Figura 8: Biossíntese do ácido ascórbico (AscH₂) em plantas (direita) e animais (esquerda). O precursor inicial de ambas as vias é a glicose, que através de uma sequência de reações que evolve gasto de energia pela célula, sintetiza o AscH₂. As reações são catalisadas pelas seguintes enzimas: Plantas: 1', Glicose-6-fosfato isomerase; 2', Manose-6-fosfato isomerase; 3', fosfomanomutase; 4', GDP-manose fosforilase; 5' GDP-D-manose-3,5-epimerase; 6' GDP-L-Galactose-fosforilase; 7' L-galactose-1-fosfato; 8', L-Galactose desidrogenase; 9', L-Galactonono-1,4-lactona desidrogenase. Animais: 1, Fosfoglucomutase; 2, UDP-glicose pirofosforilase; 3, UDP-glicose-6-desidrogenase; 4, UDP-glucuronato-1-fosfato uridililtransferase; 5, glucuroquinase; 6, glucoronato redutase; 7, gulonolactonase; 8, L-gulono- γ -lactona oxidase. A última enzima da biossíntese do L-ácido ascórbico não é sintetizada por

Figura 9: Dados originais do aparelho *Free Radical Analyzer 4100* da *World Precision Instruments*. Calibração efetuada mostrando o aumento crescente da concentração de H_2O_2 . Para calibração foi utilizado tampão Tris/HCl 20 mM pH 7,4 contendo azida 100 μ M e DTPA 100 μ M e diferentes concentrações de H_2O_2 (0-400 μ M).

Figura 11: Gel SDS-Page da purificação mostrando a 1-Cys de *A. fumigatus* (AfPrxA) utilizando DTT como redutor na concentração final de 250 mM......60

Figura 14: Gráfico de velocidade de consumo de 200 μ M H₂O₂ (μ M/s) *versus* a quantidade de AfPrxA adicionada e 1 mM de ascorbato como redutor. Ensaio utilizado para determinação da atividade específica da AfPrxA, utilizado o tampão Tris/HCl 20 mM pH 7,4 contendo 100 μ M de azida e 100 μ M de DTPA......62

Figura 24: Cursos temporais tratados com a equação integral de primeira ordem (médias $n \ge 4$) de redução do DCPIP acompanhado pela absorção a 522 nm com diferentes concentrações AfPrxA-SOH (0-9,5 μ M), e concentrações fixas de ascorbato (4 μ M) e DCPIP (45 μ M). Condições experimentais: pH 7,44 ± 0,1, temperatura 24 °C. Tampão fosfato de potássio 50 mM contendo NaCl 50 mM e DTPA 100 μ M. Nessas condições, $kobs = k_1 * [DCPIP] + k_2 * [AfPrxA-SOH]......75$

Figura 29: Gel SDS-Page da purificação mostrando a 1-Cys de *P. aeruginosa* (LsfA e LsfA-C45A) utilizando DTT como redutor na concentração final de 250 mM80

Figura 38: Gráfico de segunda ordem obtido por regressão linear dos cursos temporais com diferentes concentrações de (A) Tsa1-C170S-SOH (0-8 μ M) e (B) Tsa1 (0-6 μ M) com concentrações fixas de ascorbato (4 μ M) e DCPIP (44 μ M).

 Tabela 2: Coeficientes de extinção molar a 280 nm e massa molecular (considerandoa cauda de histidina) das 1-Cys Prx de fungo, levedura, planta, bactéria, fungo emamífero, 2-Cys típica de levedura e das proteínas GAPDH e Papaína que não fazemparte da família Peroxirredoxinas.53

Tabela 3: Constantes cinéticas aparentes para a redução do ácido sulfênico da 1-Cys

 AfPrxA por ascorbato, determinadas através da regressão não-linear de gráficos de

 Michaelis Menten.
 64

Tabela 4: Constantes cinéticas reais para a redução da 1-Cys AfPrxA por ascorbato, obtidas através dos gráficos secundários de 1/ V_{máx}^{app} versus 1/[Ascorbato]......66

Sumário

I. Introdução	22
1.1 Uma breve história do Oxigênio	22
1.2 Espécies Reativas de Oxigênio	22
1.3 Tióis peroxidases	24
1.4 Peroxirredoxinas	26
1.4.1 Processos catalítcos e classificação das Prxs	27
1.5 Vitamina C	35
1.5.1 Breve história sobre o escorbuto	
1.5.2 Estrutura	
1.5.3 Mecanismo de ação	
1.5.4 Transporte indireto via GLUTs e direto via SVCTs	41
1.5.5 Bioquímica redox do ascorbato	41
II Objetivo	44
21 Objetivo Corol	·····
2.1 Objetivo Geral	
III. Materiais e Métodos	45
3.1 Materiais	45
3.2 Linhagens bacterianas de expressão	45
3.3 Vetores de clonagem e expressão	46
3.4 Meio de Cultura para bactérias	46
3.5 Preparação de bactérias eletrocompetentes	46
3.6 Mini preparação plasmidial	47
3.7 Transformação bacteriana por eletroporação	47
3.8 Expressões das proteínas recombinantes	48
3.8.1 1-Cys Prx de A. fumigatus	48
3.8.2 1-Cys Prx de S. cerevisiae	48
3.8.3 1-Cys Prx de P. aeruginosa	49
3.8.4 1-Cys Prx de R. novergicus	49
3.8.5 1-Cys Prx de T. aestivum	49
3.8.6 2-Cys Prx de S. cerevisiae (2-Cys Típicas)	50
3.9 Proteínas que não pertencem à família das Peroxirredoxinas	50

3.9.1 Papaína – <i>C. papaya</i>	50
3.9.2 Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH)	51
3.10 Purificações das proteínas recombinantes por cromatografia d	le afinidade
a metais	51
3.11 Géis desnaturante de poliacrilamida (SDS-Page)	52
3.12 Determinação da concentração de proteína	52
3.14 Quantificação de cisteínas reduzidas pelo ensaio do DTDPy	55
3.15 Determinação dos valores de pKa das cisteínas de AfPrxA	56
3.16 Cinética competitiva entre ácido sulfênico proteico com 2,6-	
diclorofenolindofenol por ascorbato	57
3.17 Simulações cinéticas	58
IV. Resultados e Discussões	59
4.1 Caracterização da redução de 1-Cys Prx de <i>A. fumigatus</i> (AfPr	xA) por
ascorbato acoplada a oxidação por H2O2	59
4.1.1 Expressão e purificação da 1-Cys Prx de A. fumigatus (AfPrxA)60
4.1.2 Atividade específica da AfPrxA.	60
4.1.3 Cinética de Bi-substrato	63
4.2 Determinação dos valores de pK _a da AfPrxA	67
4.3 Determinações de constantes de segunda ordem da redução de	1-Cys Prx
por ascorbato, usando ensaios de competição	70
4.2.1 Análises das reduções de 1-Cys Prx	70
4.2.1.1 1-Cys Prx de A. fumigatus (AfPrxA)	70
4.2.1.2 1-Cys Prx de S. cerevisiae (Prx1)	77
4.2.1.3 1-Cys Prx de P. aeruginosa (LsfA)	80
4.2.1.4 1-Cys Prx de R. novergicus (Prdx6)	
4.2.1.5 1-Cys Prx de T. aestivum (TaPER1)	85
4.2.2 Análise da redução de 2-Cys Prx por ascorbato	91
4.2.2.1 2-Cys Prx típica de S. cerevisiae (Tsa1)	91
4.2.3 Análise da Redução de Ácidos Sulfênicos em Proteínas que não	o fazem
parte da família Prx	94
4.2.3.1 Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (GAPDH)	94
4.2.3.2 Papaína (<i>C. papaya</i>)	96
V. Conclusões	

VI. Perspectivas	
Referências Bibliográficas	104
Anexos	

1.1 Uma breve história do Oxigênio

O oxigênio molecular (O_2) apareceu em quantidades significativas na atmosfera por volta de 2,2 bilhões de anos atrás, devido a ação de organismos fotossintetizadores (cianobactérias). Esses organismos utilizavam a energia luminosa do sol e a partir de moléculas simples compostas de carbono e oxigênio (CO_2) conseguiam gerar carboidratos e O_2 . Portanto, esse processo provocou profundas alterações na história evolutiva dos seres vivos.

Organismos anaeróbicos existem ainda hoje (Halliwell, 2013), mas seu crescimento é inibido e frequentemente morrem devido à exposição a altos níveis de O_2 presente na atmosfera. Portanto, se por um lado a disponibilidade de O_2 para reações químicas apresentou uma enorme vantagem em termos energéticos para aqueles organismos que podiam utilizá-lo, por outro lado a toxicidade desse gás também foi um impulso para uma extinção catastrófica de toda a vida que não poderia lidar com o O_2 . A forte pressão de seleção foi um importante gargalo evolucionário primitivo, os seres vivos que desenvolveram sistemas antioxidantes, obtiveram importante vantagem adaptativa, o que influenciou no desenvolvimento de vida na Terra e de seus processos bioquímicos (Halliwell, 2012).

1.2 Espécies Reativas de Oxigênio

O grande sucesso evolutivo dos eucariontes se deve em parte ao desenvolvimento das cadeias respiratórias mitocondriais (Mailloux, 2016). A mitocôndria produz 80% ou mais do ATP necessário pelas células animais (Halliwell, 2013). Durante o transporte de elétrons na cadeia respiratória da mitocôndria, o O_2 recebe quatro elétrons provenientes do complexo IV, reduzindo-se em duas moléculas de água. Todavia, cerca de 0,1% a 0,01% das transferências eletrônicas, o O_2 é apenas parcialmente reduzido, o que provoca a formação de espécies reativas de oxigênio.

ROS ("Reactive Oxygen Species") é um termo que descreve um conjunto de moléculas, incluindo intermediários radicalares da redução de O₂ como radical

hidroxila (HO[•]), radical ânion superóxido (O_2^{\bullet}) e sua forma protonada (radical peridroxil, HO₂[•]) e espécies não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e ácido hipocloroso (HClO; Halliwell, 2007; Kembro e col., 2013; Mailloux, 2016; Figura 1). As mitocôndrias são consideradas as principais fontes de ROS e estima-se que o complexo I e o complexo III são responsáveis em converter 1-2% das moléculas de O₂ consumidas em O₂[•] sob condições normo ou hiperbáricas (Turrens, 2007; Halliwell, 2007).



Figura 1: Formação de ROS através da reação de transferência de elétrons.

Além da mitocôndria, existem sistemas enzimáticos que produzem ROS como produto principal tais como: NADPH oxidases (gerando O_2^{\bullet} e H₂O₂ através da transferência de elétrons do NADPH para o FAD), lipoxigenases (gerando hidroperóxidos orgânicos) e citocromo P450 (Nathan, 2013). O efeito biológico das ROS foi primeiramente apresentado por Henry John Horstman Fenton em 1894. Ele demonstrou que o H₂O₂ em combinação com Fe²⁺ era capaz de oxidar biomoléculas. Esta reação hoje chamada de Reação de Fenton leva a formação de HO[•] (Halliwell, 2007).

Em particular, o H₂O₂, o HO[•] e o O₂[•] têm sido relacionados por provocar lesões oxidativas em lipídeos, DNA e proteínas e outros componentes celulares (Hampton, 2016). O HO[•] é uma das espécies químicas mais reativas que se conhece, reagindo rápida e indistintamente com a maioria das biomoléculas. Comparado ao HO[•], o O₂^{•-} é muito menos reativo, porém, é capaz de lesar diversas enzimas na sua forma protonada (HO₂[•]), podendo iniciar a peroxidação de ácidos graxos (Yin, 2011; Phaniendra, 2014). Já o H₂O₂ é muito difusível, podendo reagir com resíduos de cisteínas presente em proteínas causando alterações estruturais, podendo ocasionar danos celulares em concentrações relativamente baixas (10µM). O H₂O₂ não tem efeito direto no DNA, mas pode danificar o DNA através da produção de HO[•] na presença de metais de transição (Finkel, 2000). A reatividade do H_2O_2 é geralmente atribuída à baixa energia da ligação O-O (47 kcal/mol). O H_2O_2 é um oxidante moderado, e em células os principais alvos de oxidação são os tióis por meio de substituição nucleofílica de dois elétrons (Gupta, 2014).

O número de evidências que indicam que a interação de ROS com biomoléculas é crescente e está implicada em vários processos patológicos como a diabetes, envelhecimento, distrofia muscular, injúria causada por isquemia-perfusão, cataratas, arteriosclerose e câncer (Halliwell, 2007; Brieger e col., 2012). Dessa forma, as enzimas antioxidantes desempenham um importante papel na manutenção da homeostase celular.

A primeira linha de defesa parece ser comum para todos os organismos com exceção de alguns anaeróbios (Jenney e col., 1999). A superóxido dismutase (SOD), converte duas moléculas de O_2^{-} em O_2 e H_2O_2 . Um dos produtos desta reação, o H_2O_2 , pode ser removido em reações mediadas pela catalase que decompõe duas moléculas de H_2O_2 em H_2O e O_2 ; a glutationa peroxidase que tem sua atividade dependente de GSH, reduzindo o H_2O_2 em H_2O formando GSSG. Existem também as enzimas que atuam na manutenção dos níveis basais de GSH no organismo, fazendo a conversão da GSSG a GSH (Marsella e col., 2005; Halliwell, 2012). Essa reação é catalisada pela glutationa redutase. O NADPH consumido nesta reação é suprimido principalmente pela via das pentoses.

No final dos anos 90, as Peroxirredoxinas (Prxs) foram descobertas sendo posteriormente descritas como peroxidases baseadas em resíduos de cisteína e dependentes de tiól (Kim e col., 1988; Chae e col., 1994a; Netto e col., 1996). A importância de tais enzimas que serão descritas a seguir na defesa redox é refletida na sua ampla conservação em todos os reinos, enfatizando que embora o O_2 seja útil em muitas reações químicas, precisa ser fortemente regulado de modo que intermediários de sua redução (como H₂O₂) não provoquem danos celulares.

1.3 Tióis peroxidases

Enzimas antioxidantes participam de reações redox, catalisando a remoção de ROS. Para desempenhar essa função, muitas enzimas utilizam-se de cofatores como NAD⁺, FAD, heme, selênio, íons de ferro e outros metais de transição (Winterbourn, 2015). Em contraste, algumas proteínas utilizam aminoácidos de sua própria cadeia polipeptídica em reações de transferência de elétrons, principalmente cisteína. A cisteína é um aminoácido não essencial, hidrofóbico que tem como característica principal possuir um grupamento tiól (RSH) em sua cadeia lateral que em sua forma desprotonada é um agente nucleófilo (Karplus, 2015).

Cisteína livre possui pouca reatividade para participar de reações redox, pois seu pK_a é de aproximadamente 8.3 (Yuan, 2010; Gupta, 2014). O mesmo ocorre com a maioria dos resíduos de cisteínas presentes em proteínas que em pH fisiológico se encontram na forma protonada, muito menos nucleófila do que sua forma desprotonada (ânion tiolato) (Poole, 2015). Em algumas proteínas, o enovelamento proteico pode gerar um ambiente favorecendo a reatividade das cisteínas (Karplus, 2015). Cisteínas reativas estão envolvidas em uma série de reações redox como redução e formação de pontes dissulfetos, glutationilação proteica e redução de peróxidos (Reddie, 2008).

Qualquer proteína que reage com peróxidos via tiól pode ser chamada de tiól peroxidase, por exemplo, as anexinas (Dalal e col., 2014). Contudo, dois grupos de enzimas, as Glutationa peroxidases (Gpx) e as Peroxirredoxinas (Prxs) são consideradas tióis peroxidases *stricto sensu* devido sua alta reatividade por peróxidos. Nosso estudo está centrado na compreensão da função biológica de Prxs que são enzimas capazes de detoxificar diferentes peróxidos como H_2O_2 e alquil hidroperóxidos e também peroxinitrito (Winterbourn, 2008; Poole, 2015). Essas enzimas têm como característica, o fato de não necessitarem de cofatores e grupos prostéticos para catálise. Ao invés disso, as Prxs possuem um resíduo de cisteína conservado em seu sítio ativo que reage com os peróxidos, detoxificando-os aos seus respectivos alcoóis e/ou água como produto final (Figura 2).

 $2 \text{ RSH} + \text{ROOH} \longrightarrow \text{RS-SR} + \text{ROH} + H_2\text{O}$

Figura 2: Reação de redução de peróxidos catalisada por tióis peroxidases.

1.4 Peroxirredoxinas

As Prxs foram descobertas no final dos anos 90, no laboratório de Earl Stadtman pelo grupo do Dr. Sue Goo Rhee como um fator proteico que protegia a glutamina sintetase (GS) da inativação oxidativa pelo sistema Fe³⁺/O₂/tióis (Kim e col., 1988). Devido ao fato dessa enzima somente proteger a GS da inativação na presença de tióis como ditiotreitol (DTT) e glutationa (GSH), e não na presença de outros agentes redutores não-tiólicos, foi denominada TSA (*Thiol specific antioxidante*).

Estudos demonstravam que essas enzimas não possuem homologia em sua sequência de aminoácidos quando comparado com catalases, superóxido dismutases ou outras peroxidases como as glutationa peroxidase que apresentam um resíduo de cisteína contendo selênio em substituição ao enxofre (Rhee, 2005). Essas enzimas foram então renomeadas como Tiorredoxinas peroxidases (Chae e col., 1994a; Netto e col., 1996). Em paralelo, outras Prxs foram descritas pelo grupo de Bruce Ames como a alquil hidroperóxido redutase subunidade C (AhpC) em bactéria (Jacobson e col., 1989). Posteriormente, a triparredoxina peroxidase em tripanossomatídeos foi descrita (Nogoceke e col., 1997). Assim, com o avanço da tecnologia de sequenciamento se tornou evidente que todas estas diferentes proteínas estão relacionadas e compõem a enorme família de peroxidases chamada de Prxs (Chae e col., 1994b).

O nome Peroxirredoxina foi proposto inicialmente por Chae e colaboradores (1994b) e rapidamente transformou-se no nome mais utilizado em toda a literatura. As enzimas agrupadas nesse estudo incluíram naquele momento, a enzima TSA de levedura e de rato e a AhpC de *S. typhimurium* (Chae e col., 1994a). As Prxs são uma família de peroxidases com peso molecular entre 20-30 kDa altamente conservadas (Chae e col., 1994b) e presentes em todos os grupos taxonômicos como bactérias, protozoários, fungos, invertebrados, plantas e mamíferos. É muito difundida em toda filogenia, e um ou mais membros são geralmente expressos em níveis elevados e em diferentes tipos celulares (Hall, 2009; Hanschmann e col., 2013). Em leveduras, as Prxs são muito mais abundantes em relação aos níveis de transcritos primários que outras peroxidases como a catalase e glutationa peroxidase (Ghaemmaghami e col., 2003).

Essas peroxidases têm sido relacionadas por atuarem como enzimas citoprotetoras, ou seja, protegendo as células contra efeitos deletérios gerados fisiologicamente e patologicamente por H_2O_2 (Perkins e col., 2015). Kinnula e colaboradores (2002) reportaram que a expressão das Prxs foi aumentada significativamente na inflamação aguda pulmonar, provavelmente relacionado a produção de H_2O_2 gerado durante a inflamação. Da mesma forma, as Prxs têm chamado a atenção de pesquisadores na área de câncer por sua função na supressão da formação de tumores, e seus elevados níveis de expressão em vários tecidos cancerígenos e em linhagens de células imortalizadas, características que parecem estar conectadas com a resistência destes tumores a tratamentos quimioterápicos (Ishii, 2012, Shichita e col., 2012). Também já foram relacionadas com envelhecimento, (Kim e col., 2008; Irwin, 2013), doenças neurodegenerativas como Alzheimer (Yoshida e col., 2009), cardiovasculares (Choi e col., 2005; Woo e col., 2010), doenças metabólicas (Abbasi e col., 2014), isquemía e injúria cerebral (Reed e col., 2009).

1.4.1 Processos catalítcos e classificação das Prxs

Todas as Prxs possuem uma cisteína (Cys) no domínio N-terminal altamente reativa denominada de cisteína peroxidásica (Cys_p), qual reage com peróxidos gerando um ácido sulfênico (Cys_p-SOH), com a liberação de álcool correspondente ao hidroperóxido reduzido, ou água no caso de H_2O_2 (Fisher, 2011). A sequência PXXX(T/S)XXC localizada no centro ativo é essencialmente invariável na família das Prxs (Hofmann, 2002; Nelson e col., 2011).

Em adição, as Prxs contém um resíduo de arginina e treonina que juntamente com a Cys_p forma a tríade catalítica. Esse resíduo de Arg é altamente conservado e juntamente com os outros resíduos ativa a Cys_p na sua forma desprotonada chamada de ânion tiolato ($CysS^-$), e também ativa o peróxido estabilizando o estado de transição durante a reação (Hall e col., 2010; Karplus, 2015). A função destes resíduos de aminoácidos ainda não está completamente elucidada (Karplus, 2015).

Prxs são comumente divididas em dois grandes subgrupos de acordo com o mecanismo catalítico: 2-Cys Prx e 1-Cys Prx (Figura 3), sendo que a principal diferença entre as duas classes é o número de cisteínas envolvidos na catálise. No caso das 2-Cys Prx, o ácido sulfênico sofre condensação com a sulfidrila de outra

cisteína denominada cisteína de resolução (Cys_r) que leva à formação de uma ponte dissulfeto. Esse dissulfeto pode ser intermolecular (2-Cys típicas – Figura 3A) ou intramolecular (2-Cys atípicas – Figura 3B), sendo em mamíferos Prdx 1-4 representantes do primeiro grupo e Prdx5 do segundo (Flohé, 2007). As 1-Cys Prx não possuem a Cys_r (Figura 3C) e uma proteína com tiól reativo ou outro redutor de baixo peso molecular substitui esse resíduo no processo de reciclagem (Nelson e col., 2011).

Os Cys_p-SOH formados são instáveis e susceptíveis à inativação por altas concentrações de peróxido (Wood, 2003; Hall e col., 2010) e são considerados intermediários para outros estados de oxidação (Netto e col., 1996; Poole, 2008). De acordo com Wood (2003), a estabilização da chamada conformação FF (*"fully folded"*) poderia promover a contínua oxidação do Cys_p-SOH por outras moléculas de peróxido, originando formas superoxidadas como ácido sulfínico (Cys_p-SO₂H) e ácido sulfônico (Cys_p-SO₃H), levando a inativação das Prxs. No entanto, existem ainda poucos estudos sobre a superoxidação das 1-Cys Prx. Em muitos eucariontes (incluindo humanos), existem as Sulfírredoxinas (Srx) que são enzimas responsáveis pela redução do Cys_p-SO₂H somente em 2-Cys Prxs típicas, restabelecendo sua atividade peroxidásica (Biteau, 2003; Lowther, 2011; Perkins, 2014).

As Prxs também podem ser reguladas por outras modificações póstraducionais incluindo nitração da tirosina, fosforilação da Ser e Thr, acetilação no Nterminal ou C-terminal, S-nitrosilação, glutationilação dos resíduos de cisteínas catalíticos e não catalíticos (Chae e col., 2012; Riquier e col., 2014).

(A) 2-Cys Típicas



Figura 3: Mecanismos catalíticos das Peroxirredoxinas (Prxs): 2-Cys típicas (A), 2-Cys atípicas (B) e 1-Cys Prx (C). A diferença entre os mecanismos 2-Cys típico e 2-Cys atípico está relacionado com o fato da ligação dissulfeto ser (B) intra (atípica) ou (A) inter (típica) molecular. O ácido sulfênico derivado da 1-Cys Prx é diretamente regenerado por um doador de elétrons (nesse caso o ascorbato) para a forma tiol (C). Abreviações: Cyp: Ciclofilina; Grx: Glutarredoxina; GSH: Glutationa; ROOH: Peróxido (Adaptado de: Barranco-Medina, 2009).

As 1-Cys Prxs de fungo, levedura, bactéria, planta e mamífero utilizadas nesse projeto, apresentam um motivo altamente conservado (Val-Cys-Thr-Thr-Glu) no domínio amino N-terminal onde está presente o resíduo de cisteína reativo, o qual é característico das 1-Cys Prx (Figura 4).

A.: S.0 T.3 P.3 H.9 R.1	fumigatus cerevisiae aestivum aeruginosa sapiens novergicus	MFSRICSAQLKRTAWTLPKQAHLQSQTIKTFATAPILCKQFKQSDQPRLRINSDAPNFDA MPGLTIGDTVPNLEL MSLRLGDIAPDFEQ MPGGLLLGDVAPNFEA MPGGLLLGDEAPNFEA
А. S. T. P. H. R.	fumigatus cerevisiae aestivum aeruginosa sapiens novergicus	MGHMLFKSLASNQRNHKYMKSGRLHPVCTTELADLAKHQSEFAKRGVKLIGLSANSI DTTVGKINFYDYLGDSWGVLFSHPADFTPVCTTEVSAFAKLKPEFDKRNVKLIGLSVEDV DSTHGKIRIHDYVGNGYVILFSHPGDFTPVCTTELAAMANYAKEFEKRGVKLLGISCDDV DSSEGRIRLHEWLGDSWGVLFSHPADFTPVCTTELGFTAKLKDQFAQRGVKVLALSVDPV NTTVGRIRFHDFLGDSWGILFSHPRDFTPVCTTELGRAAKLAPEFAKRNVKLIALSIDSV NTTIGHIRFHDFLGDSWGILFSHPRDFTPVCTTELGRAAKLAPEFAKRNVKLIALSIDSV *:::::::::::::::::::::::::::::::::::
А. S. T. P. H. R.	fumigatus cerevisiae aestivum aeruginosa sapiens novergicus	ESHDGWINDITEIAGCSLTFLVIGDEDRKIAHTYDMLDHQDVTVGARGIAYTIRSV ESHEKWIQDIKEIAKVKNVGFPIIGDTFRNVAFLYDMVDAEGFKNINDGSLKTVRSV QSHKEWTKDIEAYKPGSKVTYPIMADPDRSAIKQLNMVDPDEKDAEG-QLPSRTL DSHLKWIDDINETQDTRVNFPIIADADRKVSELYDLIHPNANDTLTVRSL EDHLAWSKDINAYNCEEPTEKLPFPIIDDRNRELAILLGMLDPAEKDEKGMPVTARVV EDHFAWSKDINAYNGAAPTEKLPFPIIDDKDRDLAILLGMLDPAEKDEKGMPVTARVV :.* *.** :::: * *. ::: * *:
А. S. T. P. H. R.	fumigatus cerevisiae aestivum aeruginosa sapiens novergicus	FIIDPNKVIRLIQAYPASTGRSTTELLRVVDSLLVTDKYSVNTPANWEPGDDVVVPAGLT FVIDPKKKIRLIFTYPSTVGRNTSEVLRVIDALQLTDKEGVVTPINWQPADDVIIPPSVS HIVGPDKKVKLSFLYPSCTGRNMDEVVRAVDSLLTAAKHKVATPANWNPGECVVIAPGVS FIIDPNKKVRLIITYPASTGRNFNEILRVIDSLQLTDEHKVATPANWEDGDEVVIVPSLK FVFGPDKKLKLSILYPATTGRNFDEILRVVISLQLTAEKRVATPVDWKDGDSVMVLPTIP FIFGPDKKLKLSILYPATTGRNFDEILRVVDSLQLTASNPVATPVDWKKGESVMVLPTLP .:. *.* ::* **: .**: *::* : * : * : * **: *::
А. S. T. P. H. R.	fumigatus cerevisiae aestivum aeruginosa sapiens novergicus	AEE-AQVKYPNMETVKPYLRFIPLARHHLYQH NDE-AKAKFGQFNEIKPYLRFTKSK DDE-AKKMFPQGFETADLPSKKGYLRFTKV DEEEIKRRFPKGYRAVKPYLRLTPQPNR EEE-AKKLFPKGVFTKELPSGKKYLRYTPQP :* : : : * ***

Figura 4: Alinhamento das sequências de aminoácidos das 1-Cys Prx de *H. sapiens, A. fumigatus, S. cerevisiae, T. aestivum, R. novergicus, P. aeruginosa* e *H. sapiens.* O símbolo (*) - representa os resíduos idênticos em todas as sequências no alinhamento; (:) - representa substituições conservadas no alinhamento; (.) – representa substituições semi-conservadas no alinhamento. Em azul estão destacados os aminoácidos que fazem parte do centro ativo conservado em todas as Prxs. O alinhamento foi realizado pelo método de Clustal Ômega.

Outra característica que varia ao longo da família das Prxs inclui seu estado oligomérico. As Prxs estão descritas como monômeros, dímeros do tipo-A, dímeros do tipo-B e também na forma decamérica ou dodecamérica (Karplus, 2015). Já foram reportadas estruturas na forma de octâmeros (Li e col., 2005; Quiu e col., 2012) em *Plasmodium* e *M. tuberculosis*. A atividade de algumas Prxs (Kim e col., 2009; Jang e

col., 2004; König e col., 2013; Pan, 2014) está relacionada com a propriedade de essas enzimas serem capazes de se organizar em grandes complexos oligoméricos de forma reversível (Schröder e col., 2000). Apesar dos distintos estados oligoméricos, a estrutura terciária das Prxs é muito similar entre os grupos. Exceto pela presença de inserções de elementos de estrutura secundária, todas possuem um enovelamento característico conhecido como enovelamento Tiorredoxina (enovelamento Trx). Este enovelamento não é exclusivo das Prxs, estando presente em um grande número de proteínas com variadas atividades enzimáticas (Copley, 2004).

O enovelamento Trx consiste em uma folha β central, geralmente composta por quatro ou cinco fitas β que estão flanqueadas por α hélices, na configuração β 1- α 1- β 2- α 2- β 3- α 3- β 4- β 5- α 4 (Figura 5A; Schröder, 1998; Pan, 2006). Em geral, as Prxs possuem, no mínimo, sete fitas β e cinco α hélices (Figura 5B). Na forma reduzida da Prx, a Cys_p está localizada na primeira volta da hélice α 2, dentro de uma cavidade acessível ao solvente, formada por um motivo estrutural loop-hélice e cercada por três resíduos conservados em todas as classes: uma prolina, uma treonina e uma arginina (Figura 5C; Flohé e col., 2011).

A cadeia lateral da Pro limita a acessibilidade do solvente e do hidroperóxido à Cys_p , aparentemente protegendo o Cys_p -SOH formado após reação com o hidroperóxido de sofrer superoxidação. A cadeia principal e a lateral da Thr posicionam o próton do grupamento tiól da Cys_p para abstração por uma base catalítica ainda não identificada, e a cadeia lateral da Arg facilita essa abstração, através da estabilização da carga negativa formada no enxofre da Cys_p (Wood, 2003; Netto e col., 2007; Karplus, 2015).



Figura 5: Características estruturais das Prxs. (A): Estrutura da Trx de *E. coli* (PDB ID: 1XOA; Jeng e col., 1994), representando o enovelamento Trx; (B) Estrutura da 2-Cys PrxV de *H. sapiens* (PDB ID: 1HD2; Declercq e col., 2001). (C): Sítio ativo da PrxV de *H. sapiens* indicando a cadeia lateral dos principais grupos envolvidos no sítio ativo (Flohé e col., 2011).

Diferentes propostas de classificação das Prxs já foram utilizadas, resultando em divisões que compreende entre quatro a sete famílias (Hofmann, 2002; Copley, 2004; Mizohata e col., 2005; Rouhier, 2005; Sarma, 2005; Karplus, 2007; Knoops, 2007; Cha, 2007). A classificação mais recente foi proposta por Nelson e colaboradores (2011), na qual as enzimas foram divididas em seis famílias (AhpC/Prx1, BCP/PrxQ, Tpx, Prx5, AhpE e Prx6), através de uma ferramenta de bioinformática chamada DASP (*Deacon Active Site Profiler*), que concentra fragmentos da sequência funcionalmente relevantes que se posicionam próximos ao resíduos chaves necessários para a atividade da proteína (Hall e col., 2011; Soito e col., 2011), como variação no estado de oligomerização, conformação, elementos da estrutura secundária e reatividade da cisteína presente no sítio ativo.

Família AhpC/Prx1: Também conhecidas como 2-Cys Prxs típicas, é a maior subfamília e a mais amplamente distribuída, com membros encontrados em archea, bactérias e todas as classes de eucariontes (Nelson e col., 2011). Os membros desta subfamília incluem as proteínas AhpC de *S. typhimurium*, triparredoxinas peroxidases, 2-Cys Prxs de plantas, incluindo *A. thaliana* e Bsa1 de cevada, Tsa1 e Tsa2 (leveduras) e as 2-Cys Prxs humana (I, II, III, e IV). Além da estrutura comum das Prx, os membros desta subfamília possuem uma Cys_r conservada na região C-terminal, que forma uma ponte dissulfeto intermolecular com o Cys_p com interface de tipo B (Hall e col., 2011), Embora possam reagir com H₂O₂ rapidamente com constantes de ~10⁷ M⁻¹s⁻¹ (Bang e col., 2012) podem ser superoxidadas em altas concentrações de peróxidos a Cys_p-SO₂H e Cys_p-SO₃H. Membros desta subfamília têm sido vinculados com papéis importantes na sinalização celular (Rhee, 2005).

Família BCP/PrxQ: BCP significa ("*Bacterioferitin comigratory protein*") devido ao fato de co-migrarem como bacterioferritina. Estas proteínas são predominantemente bacterianas (Jeong, 2000), contudo estão presentes em alguns eucariontes como leveduras e plantas (Kong e col., 2000). Embora a maioria destas proteínas se encontre na forma monomérica, existem dois exemplos de membros desta subfamília na forma dimérica (dímero do tipo-A – PDB 2cx4 e 2ywn). Essas proteínas possuem dois resíduos de cisteína na região N-terminal separados por alguns aminoácidos e tendem a formar ponte dissulfeto intramolecular com um intermediário oxidado estável, semelhante ao mecanismo catalítico 2-Cys-Prx atípico. Para PrxQ de bactérias e de plantas os valores estão na ordem de aproximadamente $10^4 - 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para H₂O₂ (Reeves e col., 2011). Mas empregando as análises cinéticas de reações individuais, é possível observar que a reatividade dessas enzimas com peróxidos é ainda maior, como é o caso de PrxQ de *X. fastidiosa* que possui uma constante de segunda ordem 4,5 x $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Horta e col., 2010).

Família TPx: Os membros da subfamília da Tpx são todos de bactéria e quase exclusivamente 2-Cys Prx com a Cys_r localizada na mesma subunidade da proteína. A

localização da Cys_r (>99%) é C-terminal. Embora monoméricas, todas as Tpx estudadas formam dímeros de interface-A aparentemente independente do estado redox. As Tpx são reduzidas pelo sistema Trx de *E. coli* e possui valores de k_{cat} /K_M para redução de hidroperóxido de cumeno na ordem de 3 x 10⁶ M⁻¹ s⁻¹ e um baixo K_M (9 μ M) que demonstra uma maior especificidade pelo substrato quando comparado a H₂O₂ (K_M>1,7 mM) (Baker, 2003).

Família Prx5: Esta subfamília foi nomeada após a descoberta da 2-Cys Prx humana (PrxV). Os membros desta subfamília Prx5 estão amplamente distribuídos e já foram descritos em bactérias, mamíferos, plantas, fungos e leveduras (Hofmann, 2002; Knoops, 2007). Formam dímeros do tipo A, e possuem uma Cys_r conservada na mesma subunidade (Hall e col., 2010; Sarma e col., 2005). A PrxV humana é um pouco menos reativa com H_2O_2 quando comparada a PrxI e PrxII, mas é muito eficiente com hidroperóxidos orgânicos (Trujillo e col., 2007a) e peroxinitrito (Trujillo e col., 2007b).

Família AhpE: As proteínas AhpE foram todas encontradas em bactérias gram-positivas da ordem Actinomicetos (Li e col., 2005). Incluem membros apresentando mecanismo do tipo 1-Cys Prx e 2-Cys Prx. A AhpE de *M. tuberculosis* reage aproximadamente duas ordens de magnitude mais lenta com H₂O₂ que os membros da subfamília AhpC/Prx1 (~10⁵ vs ~10⁷ M⁻¹s⁻¹, respectivamente) e o redutor fisiológico ainda permanece desconhecido (Hugo e col., 2009).

Família Prx6: Esta subfamília foi nomeada de Prx6 após a cristalização da primeira Prx em humanos, anteriormente conhecida como "ORF6" (Choi e col., 1998). Membros desta subfamília incluem proteínas Prx6 de bactérias, 1-Cys Prx de *A. thaliana* e de cevada (chamadas de Per1), Prx1 de *S. cerevisiae* (mitocondrial) e a Prdx6 humana. Possuem baixa similaridade com a subfamília AhpC/Prx1, possui somente um resíduo de cisteína conservado na região N-terminal localizado em um motivo VCT (Val-Cys-Thr). Formam dímeros do tipo B e em alguns casos grandes estados oligoméricos (Hall e col., 2010). A maioria das enzimas dessa subfamília possui atividade catalítica do tipo 1-Cys Prx.

Abordagens de bioinformática também têm sido utilizadas para analisar a prevalência e localização da Cys_r entre os membros das subfamílias (Tabela 1).

Subfamília	Distribuição filogenética	Interfaces e estados oligoméricos	Localização e conservação da Cyr (quando presente)
Prx1	Archea, bactéria, plantas e outros eucariontes	Dímeros tipo-B, decâmeros, dodecâmeros através de uma interface-A	C- terminal da subunidade
Prx6	Archea, bactéria, plantas e outros eucariontes	Dímeros tipo-B, alguns decâmeros através de uma interface-A	Maioria 1-Cys Prx
Prx5	Bactéria, plantas e outros eucariontes (não em archea)	Dímeros do tipo-A	α -hélice 5 (~14%) Entre β 1 e β 2 no N-terminal (~16%)
BCP/PrxQ	Archea, bactéria, plantas e fungos (não em animais)	Monômero e dímeros do tipo-A	α-hélice 2 (~62%) α-hélice 3 (~6%)
Трх	Bactéria	Dímeros do tipo-A	α-hélice 3 (>96%)
AhpE	Bactéria	Dímeros do tipo-A	1-Cys/incerto

Tabela 1: Resumo das subfamílias das Prxs, distribuição filogenética e estrutural (Adaptado de Karplus, 2015).

Quando comparado com as outras subfamílias descritas anteriormente, as 1-Cys Prxs têm sido pouco estudadas, devido ao fato de que na maior parte dos casos seu redutor biológico permanece desconhecido, com exceção da Prx1 de *S. cerevisiae* e 1-Cys Prx de mamíferos (Prdx6) (Pedrajas e col., 2000; Manevich, 2005). Muitas 1-Cys Prx não são reduzidas eficientemente pelo sistema Trx, Grx, Srx ou GSH e a possibilidade do ascorbato ser um redutor fisiológico das 1-Cys Prx foi proposta primeiramente pelo nosso grupo (Monteiro e col., 2007), evidenciando que esse par redox ascorbato/ácido sulfênico possa ser relevante em processos *in vivo*.

1.5 Vitamina C

1.5.1 Breve história sobre o escorbuto

Relatos encontrados em hieróglifos demonstraram que os egípcios tinham conhecimento do escorbuto. Na idade Média o escorbuto desempenhou um papel importante em alguns conflitos onde gregos e romanos tiveram seus exércitos severamente afetados por essa enfermidade (Sharman, 1974). Era uma doença conhecida das zonas nórdicas, especialmente durante os invernos pobres em alimentos frescos. A primeira descrição do termo "*scurvy*" em uma publicação em
inglês foi encontrada nos registros de Richard Hakluyt em 1589 (Carpenter, 1986). A doença foi melhor descrita e popularizada nas viagens marítimas no século XVIII, onde os marinheiros que permaneciam a bordo sem renovar seus suprimentos alimentares morriam pelo aumento significativo dessa afecção que evidenciou a importância da vitamina C (Carpenter, 1986).

Desencadeada pela deficiência de vitamina C no organismo, o escorbuto tem como primeiros sintomas, manifestações hemorrágicas (petéquias, equimoses, sangramento das gengivas) dores nas articulações, fadiga, anorexia, alterações cutâneas, infecções e morte (Lind, 1953). James Lind (1716-1794), um cirurgião escocês que servia a Marinha Britânica, foi o primeiro a correlacionar a alta morbidade e mortalidade dos marinheiros ingleses com a deficiência da vitamina C (Lind, 1953). Em 1747, documentou a ingestão de sucos de laranja e limão no tratamento do escorbuto, realizando o primeiro estudo clínico de que se tem notícia na Medicina. Os resultados de sua experiência foram publicados em 1753 e em 1795 tornou-se obrigatória a ingestão diária de frutas cítricas na Marinha Britânica.

A vitamina C foi isolada primeiramente de glândulas suprarrenais, limões e laranjas por um fisiologista húngaro chamado Albert von Szent-Gyorgyi (1893-1986) em 1928 (Szent-Gyorgy, 1928; Waugh, 1932). Szent-Gyorgyi não conseguiu identificá-la, descrevendo a molécula como um açúcar com propriedades ácidas, e a batizou de "ignose", tendo o seu primeiro artigo rejeitado pela revista *Biochemical Journal*. Devido à discordância com o nome proposto, a molécula passou a se chamar ácido hexurônico (Szent-Gyorgy, 1963).

Szent-Gyorgyi juntamente com Hirst e Haworth em 1933, anunciaram a estrutura da vitamina C e sugeriram a mudança do nome para ácido ascórbico, por inferência a suas propriedades antiescorbúticas (Sharman, 1974). No mesmo ano de 1933, Reichstein e colaboradores publicaram a síntese do ácido L-ascórbico, que ainda hoje forma a base da produção industrial da vitamina C. Em 1937, Haworth (Química) e Szent-Gyorgyi (Medicina) são agraciados com o Prêmio Nobel por seus trabalhos com a vitamina C (Carpenter, 1986).

1.5.2 Estrutura

O ácido ascórbico (AscH₂) também denominado vitamina C é um composto hidrossolúvel que corresponde a uma forma oxidada da glicose, $C_6H_8O_6$ (176,13

g/mol), sendo uma alfacetolactona de seis átomos de carbono, formando um anel lactona com cinco membros e um grupo enadiol bifuncional com um grupo carbonilo adjacente (Figura 6; May, 1998). Além disso, existem três outros esteroisômeros: D-



ácido ascórbico, D-ácido isoascórbico e L-ácido isoascórbico.

Figura 6: Estrutura molecular do ácido ascórbico (AscH₂). Retirado de Buettner, 2004.

O ácido ascórbico é um diácido e em condições fisiológicas, 99,95% da vitamina C está presente como monânion ascorbato ou somente "ascorbato" (AscH⁻). Assim a forma antioxidante da vitamina C é o ascorbato (Buettner, 2004). As primeiras duas etapas da oxidação do ascorbato são reversíveis, permitindo redução novamente a ascorbato. A oxidação do ascorbato pode ocorrer diretamente pela perda de um átomo de hidrogênio (May, 1998) ou pela perda de um elétron seguida de uma rápida desprotonação. Essa reação dá origem ao radical ascorbil (AscH⁻). Embora esta molécula possa reagir com outros radicais livres, o AscH⁻ geralmente decai a deidroascorbato (DHA) através de uma reação do tipo de desproporcionamento (Buettner, 2004).

O AscH' e DHA, produtos da oxidação do ascorbato por um e dois elétrons, respectivamente, podem ser reduzidos de volta à vitamina C por ação de redutases específicas e por elétrons da glutationa, NADH ou NADPH no ciclo ascorbato-glutationa (Foyer, 2011). Por outro lado, o DHA pode sofrer uma série de oxidações que resultam na formação oxalato e L-treonato que são excretados na urina (Rebec, 1994). A Vitamina C tem várias formas, dependendo do pH e do estado de oxidação (Figura 7).



Figura 7: O equilíbrio das espécies redox no sistema ácido ascórbico e deidroascorbato. AscH₂ (ácido ascórbico), AscH- (monoânion ascorbato), Asc²⁻ (diânion ascorbato), AscH[•] (radical ascorbil), Asc⁻ (radical ascorbato), DHA (deidroascorbato) (Retirado de Buettner, 2004).

1.5.3 Mecanismo de ação

O ácido ascórbico é sintetizado a partir da glicose em diversos organismos como em animais e plantas (Figueroa-Méndez, 2015). Em animais, a síntese ocorre no fígado dos mamíferos (com exceção dos primatas) ou nos rins dos répteis e aves. Devido ao fato dessa produção ser concentrada em um órgão específico, os demais órgãos apresentam mecanismos para a captação, transporte e estocagem dentro dos tecidos. Entretanto, humanos, cobaias, algumas espécies de morcegos e pássaros não são capazes de sintetizar essa vitamina (Rice, 2000). Os organismos incapazes de sintetizar o ácido ascórbico possuem um gene não funcional para a enzima L-Gulono- γ -lactona oxidase, uma enzima associada com a membrana do retículo endoplasmático (Linster, 2007), que é requerida no último passo de biossíntese do ácido ascórbico (Figura 8). Essa mutação não é fatal entre outros motivos, porque a vitamina C é prontamente encontrada e disponibilizada na dieta desses organismos (Davey e col., 2000).

Após a sua ingestão, a absorção ocorre na mucosa bucal, estômago e intestino delgado. Os sistemas de transporte associados à membrana plasmática celular determinam sua distribuição entre os fluídos intra e extracelulares (Figueroa-Méndez, 2015). Assim sendo, o fluxo de ascorbato para dentro e fora das células é essencialmente controlado por difusão facilitada e transporte ativo, os quais são mediados por proteínas de membranas de classes distintas, conhecidos como transportadores de glicose (GLUT – *glucose transportes*) e transportadores de vitamina C dependentes de sódio (SVCT – *sodium vitamin C co-transporters*; Li, 2007).

Já em plantas, o passo final da biossíntese do ascorbato é realizado na membrana mitocondrial, através da enzima L-Gulono-γ-lactona desidrogenase, que está associada ao complexo I da mitocôndria. A enzima oxida o substrato Galactono-1,4-lactona utilizando o citocromo C oxidado como aceptor final de elétrons (Smirnoff, 2000; Szarka, 2013). Posteriormente o ascorbato é oxidado a DHA pela enzima ascorbato peroxidase (APX) e transferido para a matriz mitocondrial pelos GLUT. O DHA é regenerado pela GSH utilizando elétrons provenientes do NADPH e posteriormente transportado para outros compartimentos celulares (Szarka, 2013).



Figura 8: Biossíntese do ácido ascórbico (AscH₂) em plantas (direita) e animais (esquerda). O precursor inicial de ambas as vias é a glicose, que através de uma sequência de reações que evolve gasto de energia pela célula, sintetiza o AscH₂. As reações são catalisadas pelas seguintes enzimas: Plantas: 1', Glicose-6-fosfato isomerase; 2', Manose-6-fosfato isomerase; 3', fosfomanomutase; 4', GDP-manose fosforilase; 5' GDP-D-manose-3,5-epimerase; 6' GDP-L-Galactose-fosforilase; 7' L-galactose-1-fosfato; 8', L-Galactose desidrogenase; 9', L-Galactonono-1,4-lactona desidrogenase. Animais: 1, Fosfoglucomutase; 2, UDP-glicose pirofosforilase; 3, UDP-glicose-6-desidrogenase; 4, UDP-glucuronato-1-fosfato uridililtransferase; 5, glucuroquinase; 6, glucoronato redutase; 7, gulonolactonase; 8, L-gulono- γ -lactona oxidase. A última enzima da biossíntese do L-ácido ascórbico não é sintetizada por humanos, cobaias, algumas espécies de morcegos e pássaros (Adaptado de Linster, 2007).

1.5.4 Transporte indireto via GLUTs e direto via SVCTs

O DHA passa através da membrana por um mecanismo passivo de difusão facilitada (a favor do gradiente) mediada pelo transportador GLUT. Este mecanismo é usado indiretamente pela célula para transportar ascorbato para o seu interior através de três passos: oxidação extracelular com formação do DHA; seguida do transporte por GLUT para o interior da célula e posteriormente, a redução intracelular do DHA em ascorbato (Wilson, 2005; Li, 2007).

Estudos realizados comprovam que entre as várias isoformas de GLUT, as GLUT1 e GLUT3 são responsáveis pelo influxo do DHA. Em mamíferos, estas estão essencialmente presentes nos osteoblastos, células musculares e retinianas, mediando assim o influxo do DHA nas mesmas (Li, 2007). As GLUT1 são também expressas nas células endoteliais da barreira hemato-encefálica e são parcialmente responsáveis pela acumulação de ascorbato no cérebro. No entanto, a acumulação de ascorbato nas células endoteliais da barreira hemato-encefálica depende principalmente dos transportadores SVCT (Wilson, 2005; Li, 2007) que realizam o transporte direto e ativo (dependente de ATP) de ácido ascórbico para o interior das células.

Os transportadores SVCT também possuem distintas isoformas. SVCT1 expressa-se predominantemente nas células epiteliais do intestino, rim e fígado, e pode transportar quantidades de ascorbato superiores às necessidades destas células. Por outro lado, o SVCT2 está presente em células especializadas e metabolicamente ativas, tais como, células do cérebro, olhos e placenta. Além disso, acredita-se estar envolvido na manutenção dos níveis intracelulares de ascorbato vitais para a função neuronal e proteção contra o estresse oxidativo (Li, 2007).

1.5.5 Bioquímica redox do ascorbato

O ascorbato apresenta diversas funções biológicas relacionadas ao seu baixo potencial redox, podendo doar um ou dois elétrons para uma variedade de oxidantes, como radicais peroxila, hidroxila, superóxido, oxigênio molecular livre e óxido nítrico, além de ser capaz de reduzir o radical livre da vitamina E (α -tocoferol), que previne a oxidação das membranas biológicas (Rice, 2000). Em adição, atua no ciclo ascorbato-glutationa, desempenhando um papel na prevenção da atividade de enzimas que contém íons metálicos prostéticos de transição (Gratão e col., 2005).

Também funciona como importante cofator para duas enzimas essenciais na biossíntese do colágeno: a lisil e a prolil hidroxilases. Essas enzimas catalisam reações que levam a adições de grupos hidroxila em resíduos de prolina e lisina, estabilizando a tripla hélice do colágeno (Manela-Azulay e col., 2003).

Na ausência do ascorbato, ocorrem problemas na síntese de hidroxi-lisina e hidroxi-prolina e o escorbuto se desenvolve caracterizado por hemorragias subcutâneas, fraqueza muscular, gengivas edemaciadas e amolecimento nos dentes. Além de atuar como importante cofator para enzimas, tem sido demonstrado que o ascorbato regula também a síntese de colágeno tipo I e III, pelos fibroblastos dérmicos humanos (Welch e col., 1993). Outras enzimas que utilizam o ascorbato como cofator são a dopamina β -hidroxilase, enzima que catalisa a conversão de dopamina em norepinefrina e a 7 α -hidroxilase, enzima do primeiro passo para a síntese de ácidos biliares, que converte o colesterol a 7 α -hidroxicolesterol (Mayes, 1999).

O ascorbato é capaz de exercer funções importantes no sistema nervoso, como influenciar na formação da bainha de mielina em células de Schwann, estando envolvido na síntese de colágeno do tipo IV (Carey, 1987; Eldridge, 1987). O ascorbato também apresenta funções específicas na retina (Neal, 1999). Em plantas o ascorbato é quantitativamente o antioxidante mais predominante nas células. Foi encontrado em todos os compartimentos celulares, em uma concentração média de 2-50 mM principalmente no estroma e cloroplasto (Foyer, 1993; Smirnoff, 2000; Foyer, 2009). O ascorbato tem um importante papel na fotossíntese, sinalização redox, defesa contra patógenos, detoxificação de metais e xenobióticos, crescimento e regulação (Foyer, 2011).

Paradoxalmente, o ascorbato pode atuar como pró-oxidante podendo contribuir para a formação de ROS através da Reação de Fenton, ou seja, reduzido Fe^{3+} em Fe^{2+} que por sua vez reduz o H₂O₂, num processo designado ciclo redox, que pode gerar 'OH, causando danos a lipídeos, DNA e proteínas (Hampton, 2016). Contudo, as reações de Fenton mediadas por ascorbato, podem ser controladas no sangue humano devido à eficiência de sequestro do ferro por enzimas como as ferritinas e transferrinas (Carr, 1999; Li e col., 2010).

O ascorbato também pode modular o crescimento e diferenciação celular, reduzindo ou estimulando o crescimento de células tumorais dependendo do tipo celular (Alcain, 1994). A combinação de ascorbato e α -tocoferol, induz a proliferação e síntese do DNA em células endoteliais arteriais humanas (Ulrish-Merzenich e col.,

2002). Assim, essa combinação pode atuar "preventivamente" na formação de placas ateroscleróticas promovendo a re-endotelização inibindo a proliferação vascular aterosclerótica (Ivanov, 1997).

A possibilidade de o ascorbato ser um redutor fisiológico das 1-Cys Prx foi proposta primeiramente pelo nosso grupo (Monteiro e col., 2007), mas ainda faltam dados cinéticos detalhados mostrando a relevância do processo. Nesse trabalho apresentaremos resultados caracterizando cineticamente a redução das 1-Cys Prx por ascorbato, o que servirá de apoio para possíveis considerações sobre a relevância biológica desse processo.

2.1 Objetivo Geral

Compreender a relevância biológica da redução de 1-Cys Prx por ascorbato que foi inicialmente descrita por nosso grupo (Monteiro e col., 2007), através da determinação de parâmetros cinéticos da atividade peroxidásica 1-Cys Prx dependente de ascorbato. Esse objetivo se justifica já que existem outros redutores celulares que em princípio também poderiam executar esse papel. A relevância biológica de distintos redutores deve levar em conta tanto as constantes de segunda ordem e também as concentrações relativas de cada um dos possíveis redutores.

3.1 Materiais

Ácido-L-ascórbico, Ampicilina, azida sódica, bis-acrilamida (N,N'-metilenobis-acrilamida), canamicina, DTNB (ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico)), DCPIP (2,6-diclorofenolindofenol), DTPA (Ácido dietillenetriaminepentaacético), DTT (1,4ditiotreitol), NEM (N-etilmaleimida), PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila), tetraciclina, Tris (tris(hidroximetil) aminometano) foram obtidos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Missouri, USA). Peróxido de hidrogênio foi obtido da Merck KGaA (Darmstadt, Alemanha). Imidazol e SDS (dodecil sulfato de sódio) foram obtidos da USB Corporation (Cleveland, Ohio, USA). Marcadores de massa molecular (BenchMark Protein Ladder) foram obtidos da Invitrogen Corporation (Carlsbad, Califórnia, USA). Coomassie brilliant blue G-250 foi obtido da Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, Califórnia, USA). Acetonitrila grau HPLC foi obtido da J. T. Baker (Mallinckrodt Baker, Inc., Phillipsburg, New Jersey, USA). Todos os demais reagentes empregados eram graus analíticos. Todas as soluções foram preparadas em água tratada no sistema Milli-Q (Millipore Corporate, Billerica, Massachusetts, USA).

3.2 Linhagens bacterianas de expressão

DH5 α - *E. coli* [endA1, hsdR17 ($r_k^- m_k^+$), supE44, thi-1, recA1, gyrA (Na 1^r), relA1, Δ (lacZYA-argF)_{U169} (m80lacZ Δ M15)]: linhagem de clonagem (Novagen EMD Biosciences, Inc., Merck KgaA).

BL21(*DE3*) – *E. coli* [F⁻ *ompT hsdS*_B ($r_B^- m_B^-$) *gal dcm* (DE3)]: linhagem de expressão (Novagen EMD Biosciences, Inc.).

BL21(*DE3*) **pLysS** - *E. coli* [F⁻ *ompT* $hsdS_B$ ($r_B^- m_B^-$) gal dcm (DE3) pLysS (Cm^R]: linhagem de expressão (Novagen EMD Biosciences, Inc.).

Origami(*DE3*) – *E. coli* Δ (*ara*–*leu*)7697 Δ *lacX*74 Δ *phoA PvuII phoR araD*139 *ahpC* galE galK rpsL F'[lac⁺ lacI^q pro] (DE3) gor522::Tn10 trxB (KanR, StrR, TetR): linhagem de expressão (Novagen EMD Biosciences, Inc.).

3.3 Vetores de clonagem e expressão

 - pET15b (Novagen EMD Biosciences, Inc.): vetor de expressão com o promotor viral T7lac que é desreprimido por IPTG. Quando gene de interesse é inserido em sítios de restrição apropriados, sua expressão resulta em proteína recombinante com uma cauda de poli-histidina N-terminal.

 - pET16b (Novagen EMD Biosciences, Inc.): vetor de expressão com o promotor viral T7lac que é desreprimido por IPTG. Quando gene de interesse é inserido em sítios de restrição apropriados, sua expressão resulta em proteína recombinante com uma cauda de poli-histidina N-terminal.

 - pET29b (Novagen EMD Biosciences, Inc.): vetor de expressão com o promotor viral T7lac que é desreprimido por IPTG. Quando gene de interesse é inserido em sítios de restrição apropriados, sua expressão resulta em proteína recombinante com uma cauda de poli-histidina C-terminal.

- pProEX HTa (Invitrogem[™]): vetor de expressão com o promotor viral Tcr que é desreprimido por IPTG. Quando gene de interesse é inserido em sítios de restrição apropriados, sua expressão resulta em proteína recombinante com uma cauda de polihistidina N-terminal.

3.4 Meio de Cultura para bactérias

LB: (1% triptona, 0,5% extrato de levedura e 1% NaCl). *Os meios de cultura foram solidificados com a adição de ágar em uma concentração final de 2%.

3.5 Preparação de bactérias eletrocompetentes

As bactérias foram crescidas em 1L de meio LB até atingirem OD₆₀₀ entre 0,6 e 0,8. O frasco contendo as bactérias foi mantido em gelo por 30 minutos. Depois as células foram centrifugadas (15 min/4°C/5000 r.p.m) e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* resultante foi ressuspendido em 1L de água gelada, centrifugado e o sobrenadante removido. Novamente, o *pellet* foi ressuspendido em 500 mL de água gelada, centrifugado e ressuspendido em 20 mL de glicerol 10% gelado. Posteriormente, foi feita uma nova centrifugação, o sobrenadante foi removido e o *pellet* remanescente foi ressuspendido em 2 mL de glicerol 10% gelado. Frações de 40 μ L foram aliquotadas em gelo seco e estocadas em freezer a -80°C. Todo o processo de manipulação foi realizado em ambiente estéril. Este procedimento foi realizado seguindo o protocolo descrito por Ausebel e colaboradores (1987).

3.6 Mini preparação plasmidial

Para obter o plasmídeo das colônias desejadas foi utilizada a mini preparação plasmidial, as colônias de interesse foram cultivadas em 5 mL de LB contendo antibiótico de resistência do plasmídeo a 37° C, sob agitação por 18 horas. Posteriormente, as culturas bacterianas foram centrifugadas a 10000 x g por 5 minutos e foi utilizado o kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Hilden, Germany). A extração ocorreu conforme as instruções indicadas pelo fabricante. O DNA foi eluído em 50 uL de tampão contendo Tris/HCl 10 mM pH 8,5 e armazenado a -20°C.

3.7 Transformação bacteriana por eletroporação

Para transformar as bactérias, adicionamos cerca de 30 ng do plasmídeo em 40 μ L de células eletrocompetentes (em fluxo laminar), previamente preparadas como descrito na seção 3.5. As bactérias foram colocadas em uma cubeta (Bio-rad, 0,2 cm), a qual foi introduzida em um eletroporador (Gene pulser II - Bio-rad), e sobre a mesma foi aplicado um pulso (1,5 kV, 25 μ F). Após este pulso, as células foram recuperadas em 1 mL de meio LB estéril e incubadas a 37 °C por 1 hora sob agitação. Finalmente, o meio LB com as células foram plaqueados, em meio sólido de acordo com o antibiótico específico de cada proteína utilizada e incubado overnight a 37°C. Este procedimento foi realizado seguindo o protocolo descrito por Ausebel e colaboradores (1987).

3.8 Expressões das proteínas recombinantes

3.8.1 1-Cys Prx de A. fumigatus

A linhagem de *E. coli* BL21 (*DE3*) contendo o plasmídeo de expressão (pET15b, Novagen) e a região codificadora para a proteína 1-Cys Prx de *A. fumigatus* (AfPrxA), foi construída pela aluna Renata Bannitz Fernandes (atualmente doutoranda em nosso laboratório) durante seu programa de iniciação científica no laboratório do Prof. Dr. Marcos Antônio de Oliveira da Universidade Estadual Paulista (UNESP). Para a obtenção da proteína AfPrxA, as células foram inoculadas em meio LB/carbenicilina (50 µg/ml) e cultivadas por 16 h/37°C/200 r.p.m em agitador orbital. Após este período a cultura foi centrifugada e o precipitado transferido para 1L de meio LB/ampicilina (100 µg/ml) e cultivada até OD₆₀₀= 0,6 a 0,8 a 37°C/200 r.p.m. Neste momento foi adicionado IPTG (isopropil Δ -D-tiogalactopiranosídeo) na concentração final de 0,3 mM para a indução da expressão do gene clonado, e a cultura foi mantida sob agitação a 37°C por 4 horas. O *pellet* de células obtido foi lavado com água MilliQ e novamente centrifugado (20 min/4°C/5000 r.p.m). O *pellet* final foi armazenado a -20°C até a purificação da proteína.

3.8.2 1-Cys Prx de S. cerevisiae

A linhagem de *E. coli* BL21 (*DE3*) contendo plasmídeo de expressão (pET29b, Novagen) e a região codificadora para a proteína 1-Cys Prx *S. cerevisiae* foi construído pelo aluno de doutorado Fernando Gomes e não possui a sequência de endereçamento para a mitocôndria. As células foram inoculadas em meio LB/carbenicilina (50 µg/ml) e canamicina (15 µg/ml) e cultivadas por 16 h/37°C/200 r.p.m em agitador orbital. Diluímos a cultura para OD₆₀₀= 0,2 em 1L de meio LB/canamicina (15 µg/ml) mais ampicilina (100 µg/ml)e cultivadas até OD₆₀₀= 0,6-0,8 a 37°C/200 r.p.m. O IPTG foi adicionado na concentração final de 1 mM e mantido sob agitação a 37°C por 3 horas. O *pellet* de células obtido foi lavado com água MiliQ e novamente centrifugado (20 min/4°C/5000 r.p.m). O *pellet* final foi armazenado a -20°C.

3.8.3 1-Cys Prx de P. aeruginosa

A linhagem de *E. coli* BL21 (*DE3*) contendo o plasmídeos de expressão (pProEx HTa, Invitrogen) e as regiões codificadoras para a proteína 1-Cys Prx *P. aeruginosa* (LsfA e LsfA-C45A) foram cedidas gentilmente pela Prof. Dr^a. Regina Lucia Baldini da Universidade de São Paulo – (USP). Para a obtenção da proteína 1-Cys Prx LsfA e da mutante 1-Cys Prx LsfA-C45A, as células foram inoculadas em meio LB/ampicilina (100 µg/ml) e cultivadas por 16 h/37°C/200 r.p.m em agitador orbital. Após este período a cultura foi diluída para OD₆₀₀= 0,1 em 1L de meio LB/ampicilina (100 µg/ml) e cultivadas até OD₆₀₀= 0,5 a 37°C e 200 r.p.m. Neste momento foi adicionado IPTG na concentração final de 0,6 mM e a cultura foi mantida sob agitação a 30°C por 6 horas. O *pellet* de células obtido foi lavado com água MilliQ e novamente centrifugado (20 min/4°C/5000 r.p.m). O *pellet* final foi armazenado a -20°C até a purificação das proteínas.

3.8.4 1-Cys Prx de R. novergicus

A linhagem de *E. coli* BL21 - Origami (*DE3*) contendo plasmídeo de expressão (pET15b) e a região codificadora para a proteína 1-Cys Prx *R. novergicus* (Prdx6) foi gentilmente cedida pelo Dr. Aron Fisher (Universidade da Pensilvânia - EUA). Células dessa linhagem foram inoculadas em meio LB/canamicina (15µg/ml), tetraciclina (12,5 µg/ml) e ampicilina (100 µg/ml) e cultivadas por 16 h/37°C/200 r.p.m em agitador orbital. Diluímos a cultura para OD_{600} = 0,2 em 1L de meio LB contendo os mesmos antibióticos descritos acima e cultivadas até OD_{600} = 0,6-0,8 a 37°C/200 r.p.m. O IPTG foi adicionado na concentração final de 1 mM e mantido sob agitação a 37°C por 4 horas. O *pellet* de células obtido foi lavado com água MiliQ e novamente centrifugado (20 min/4°C/5000 r.p.m). O *pellet* final foi armazenado a - 20°C.

3.8.5 1-Cys Prx de T. aestivum

A linhagem de *E. coli* BL21 (*DE3*) pLysS contendo plasmídeos de expressão (pET16b) e as regiões codificadoras para a proteína 1-Cys Prx *T. aestivum* (TaPER1) selvagem e para as mutantes TaPER1-C46S C72S e C147S foram cedidas

gentilmente pelo Prof. Dr. Francisco Javier Cejudo (Universidade de Sevilha – Espanha). Para a obtenção das proteínas, as células foram inoculadas em meio LB/ampicilina (100 µg/ml) e cloranfenicol (34 µg/ml) e cultivadas por 16 h/37°C/200 r.p.m em agitador orbital. Após este período a cultura foi diluída para $OD_{600}= 0,2$ em 1L de meio LB utilizando os mesmos antibióticos e cultivadas até $OD_{600}= 0,6-0,8$ a 37°C e 200 r.p.m. Neste momento foi adicionado IPTG na concentração final de 1 mM e a cultura foi mantida sob agitação a 37°C por 4 horas para a indução do gene clonado e o *pellet* final foi armazenado a -20°C.

3.8.6 2-Cys Prx de S. cerevisiae (2-Cys Típicas)

A linhagem de *E. coli* BL21 (*DE3*) contendo plasmídeo de expressão (pET15b) e as regiões codificadoras para a proteína 2-Cys Prx de *S. cerevisiae* (Tsa1) e para a mutante Tsa1-C170S (Tairum e col., 2012) foram inoculadas em meio LB/carbenicilina (50 µg/ml) e cultivadas por 16 h/37°C/200 r.p.m em agitador orbital. Diluímos a cultura para OD_{600} = 0,2 em 1L de meio LB/ampicilina (100µg/ml) e cultivadas até OD_{600} = 0,6-0,8 a 37°C/200 r.p.m. O IPTG foi adicionado na concentração final de 1 mM e mantido sob agitação a 37°C por 3 horas. O *pellet* de células obtido foi lavado com água MiliQ e novamente centrifugado (20 min/4°C/5000 r.p.m). O *pellet* final foi armazenado a -20°C.

3.9 Proteínas que não pertencem à família das Peroxirredoxinas

3.9.1 Papaína – C. papaya

A proteína Papaína (*C. papaya* latex) é uma cisteína-protease da família C1 peptidase. Foi adquirida da Sigma (código n. 76218) e foi diluída nas concentrações desejadas no mesmo dia em que foi utilizada para os ensaios.

3.9.2 Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH)

A GAPDH de músculo de rato é uma enzima da via glicolítica e foi adquirida da Sigma (código n. G2267), sendo diluída nas concentrações desejadas no mesmo dia em que foi realizado os ensaios.

3.10 Purificações das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade a metais.

Após expressão das proteínas recombinantes (item 3.8), as células foram ressuspendidas em tampão de lise celular (tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4, NaCl 500 mM e imidazol 20 mM), em um volume de 20 mL de tampão para cada 1L de meio LB/ampicilina utilizado no crescimento. As células forma submetidas a diversos ciclos de sonicação por um período de 15 segundos no aparelho *Branson Digital Sonifier 450* (Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, Connecticut, USA), seguido de 30 segundos de descanso no gelo utilizando PMSF na concentração final de 1 mM. Após a lise, para precipitação de ácidos nucleicos foi utilizado sulfato de estreptomicina na concentração final de 1% com agitação. Após 20 minutos as células foram centrifugadas por 45 min/4°C/12000 r.p.m. O precipitado contendo restos celulares foi descartado, e o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,45 μm (Millipore).

Uma vez que todas as proteínas recombinantes construídas possuem uma cauda de histidina N-terminal, exceto a 1-Cys Prx *S. cerevisiae* que possui a cauda de histidina no C-terminal (devido apresentar uma sequência de endereçamento mitocondrial no N-terminal desta proteína), foram purificadas em coluna de afinidade a níquel (Ni-NTA superflow de 5 mL) com gradiente de imidazol, (Qiagen), utilizando bomba peristáltica *P1* (GE Healthcare, General Eletric Co., Chalfont St. Giles, Reino Unido). As amostras foram purificadas utilizando: tampão de ligação fosfato de sódio 20 mM pH 7,4, NaCl 300 mM e imidazol 20 mM e tampão de eluição (tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4, NaCl 500 mM com gradiente de eluição de 50 até 500 mM de imidazol).

Antes de iniciar a purificação, a coluna foi preparada lavando com 10 volumes de coluna de H_2O , seguido da aplicação de 10 mL de solução de níquel 0,1M e

remoção do excesso de níquel por lavagem com mais 10 volumes de coluna de H_2O . Na purificação, realizada sob fluxo constante de 2 mL/min, a coluna foi equilibrada com 10 volumes de coluna de tampão de ligação e o extrato aplicado. A eluição foi realizada com 5 volumes de coluna de tampão de eluição com gradiente de imidazol, coletando-se em frações de 1 mL.

Cada alíquota foi avaliada pelo reagente de Bradford em relação à presença de proteínas. Para verificar quais frações eluídas da coluna continham proteína, utilizamos o método de detecção por Bradford, adicionando 5 µL da fração coletada em 500 µL da solução de Bradford (Bradford, 1976). A solução de Bradford possui coloração cinza e a reação com proteínas provoca uma alteração da coloração para o azul. As frações que continham a proteína foram aplicadas em Gel SDS-Page com o intuito de verificar se a massa molecular da proteína estava correta e se a mesma se encontrava pura.

3.11 Géis desnaturante de poliacrilamida (SDS-Page)

As proteínas recombinantes purificadas tiveram seu grau de pureza analisado por SDS-Page em condições redutoras. O gel de separação foi feito com 14% de poliacrilamida e o de empacotamento com 5%. O tampão de corrida utilizado foi: Tris-glicina 1x (Tris/HCl 25 mM, glicina 250 mM, SDS 0,1% (p/v) em pH 8,3). As condições da corrida foram: voltagem 140 V, corrente 110-120 mA por 90 minutos. Na alíquota a ser aplicada no gel, foi adicionado tampão de amostra 5x na presença de 1,4 ditiotreitol (DTT) na concentração final de 250 mM. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 6 horas e aplicadas no gel. O padrão de massa molecular utilizado foi o *Bench Mark Protein Ladder* (Invitrogen). As corridas foram realizadas no sistema BioRad e os géis corados com *Coomassie Blue* depois da eletroforese.

3.12 Determinação da concentração de proteína

As frações que continham as proteínas puras foram concentradas por ultracentrifugação em Microcon YM-10. Com o intuito de eliminar o imidazol, que interfere nas medidas espectrofotométricas a 280 nm, trocamos os tampões das proteínas por gel-filtração para fosfato de sódio 20 mM e NaCl 500 mM e DTPA 100 μ M pH 7,4, através de duas passagens consecutivas da amostra por uma coluna *desalting* PD10 (GE-Healthcare). Então determinamos as concentrações das enzimas espectrofotometricamente a 280 nm, utilizando os coeficientes de extinção molar (ϵ) descritos na Tabela 2, de acordo com a Lei de Beer-Lambert. Os valores de ϵ e massa molecular das 1-Cys Prx de fungo, levedura, bactéria, planta e mamíferos (considerando a cauda de histidina) foram calculados com a ferramenta ProtParam do "Expasy Proteomics Server" (www.expasy.org).

Proteínas	εCys reduzidas	εCys oxidadas	Massa molecular	
	$(M^{-1}cm^{-1})$	$(M^{-1}cm^{-1})$	(kDa)	
AfPrxA-WT	21430	21555	24972	
Prx1-WT	23950	23950	28845	
TaPER1-WT	21430	21680	26486	
TaPER1-C46S				
TaPER1-C72S	21430	21555	26469	
TaPER1-C147S				
LsfA-WT	33920	33920	27675	
LsfA-C45A		55720	21013	
Prdx6-WT	26981	22460	22460	
Tsa1				
(2-Cys Prx típica)	23649	23950	23950	
Tsa1-C170S	2304)			
(2-Cys Prx típica)				
GAPDH-tetrâmero	35666 (monômero)	29910	30160	
Papaína	23406	57600	23406	

Tabela 2: Coeficientes de extinção molar a 280 nm e massa molecular (considerando a cauda de histidina) das 1-Cys Prx de fungo, levedura, planta, bactéria, fungo e mamífero, 2-Cys típica de levedura e das proteínas GAPDH e Papaína que não fazem parte da família Peroxirredoxinas.

3.13 Determinação dos parâmetros cinéticos da 1-Cys Prx de *A*. *fumigatus* pelo uso de eletrodos específicos para H₂O₂.

O equipamento *Free Radical Analyzer 4100* da *World Precision Instruments* pode ser acoplado a um eletrodo específico para H₂O₂ (ISO-HPO2). A determinação de H₂O₂ requer um método preciso de calibração e ocorre eletroquimicamente (amperométrica, Figura 9). O sistema mede a quantidade de H_2O_2 oxidado na superfície do eletrodo com uma tensão de equilíbrio de 400 mV.

A oxidação de H_2O_2 na superfície do eletrodo produz uma pequena corrente (pA), que é detectado por um registrador analógico *TBR4100 Four-channel Free Radical Analyzer (World Precision Instruments*, Inc., Sarasota, Flórida, USA). O sinal analógico é transferido para um computador utilizando o *hardware Lab-Trax digital recorder* e analisado pelo programa *DataTrax (World Precision Instruments*, Inc., Sarasota, Flórida, USA). A quantidade de corrente produzida é linearmente proporcional à quantidade de H_2O_2 presente no meio da reação.



Figura 9: Dados originais do aparelho *Free Radical Analyzer 4100* da *World Precision Instruments*. Calibração efetuada mostrando o aumento crescente da concentração de H_2O_2 . Para calibração foi utilizado tampão Tris/HCl 20 mM pH 7,4 contendo azida 100 μ M e DTPA 100 μ M e diferentes concentrações de H_2O_2 (0-400 μ M).

Estudos prévios realizados em nosso grupo indicaram que o eletrodo ISO-HPO-2 não sofre interferência por ascorbato, ou seja, a calibração do eletrodo com H_2O_2 na ausência e presença de ascorbato é essencialmente idêntica. Dessa forma, parâmetros quantitativos relacionados à redução de ácidos sulfênicos (gerados em 1-Cys Prx por H_2O_2) por ascorbato para a enzima AfPrxA, foram calculados utilizando cinética de estado estacionário (*steady-state kinetic*).

As reações foram iniciadas pela adição de H_2O_2 que foi quantificado previamente (ε_{240nm} = 43.6 M⁻¹cm⁻¹) utilizando tampão Tris/HCl 20 mM pH 7,4, contendo DTPA 100 µM e azida 100 µM a temperatura de 30°C. Durante o ciclo catalítico, a 1-Cys Prx interage com dois substratos: o H_2O_2 que será reduzido pela Cys_p e o ascorbato irá reduzir o Cys-SOH. Portanto as análises cinéticas devem ser feitas por abordagem bissubstrática, ou seja, a velocidade inicial da reação depende das concentrações de ambos os substratos. As velocidades iniciais foram corrigidas subtraindo a medida da reação controle sem a enzima.

3.14 Quantificação de cisteínas reduzidas pelo ensaio do DTDPy.

Em uma reação de troca tiól-dissulfeto, o produto resultante da reação do tiól (RSH) ou tiolato (RS⁻) com o dissulfeto artificial 4,4' ditiodipiridina (DTDPy), gera um composto chamado tiopiridona que pode ser quantificado por espectrofotometria a 324nm (Grasseti, 1967). Neste ensaio, a proteína foi previamente reduzida com 20 mM de DTT por 120 minutos em pH neutro e temperatura ambiente. O excesso de DTT foi removido por exclusão molecular usando a coluna HiTrap dessalting (GE Healthcare) em ÄKTAprime Plus Chromatography System (GE Healthcare). Após a determinação da concentração da proteína a 280 nm, o DTDPy foi adicionado na concentração final de $\geq 50\mu$ M. Como branco, foram utilizados apenas DTDPy e água, sem adição da proteína. A absorbância da tiopiridona foi mensurada a 324 nm (Figura 10) e o coeficiente de extinção molar de 21400 M⁻¹cm⁻¹ foi utilizado para determinar sua concentração.





3.15 Determinação dos valores de pKa das cisteínas de AfPrxA

O valores de pK_a das cisteínas AfPrxA foram obtidas pelo método de alquilação com o reagente fluorescente monobromobimano (mBBr) (Sardi e col., 2013). Inicialmente, AfPrxA foi pré-reduzida com DTT 20 mM por 120 min a 37°C, e teve sua concentração determinada. Neste experimento, as concentrações iniciais de AfPrxA e mBBr são similares ou menores (1-10 μ M), e as reações são iniciadas simultaneamente ao longo da faixa de pH estudada. Nesse ensaio, utilizamos 17 reações em diferentes pHs e todas preparadas em quadriplicatas em uma placa preta de 384 poços. Os poços continham tampão Tris/Acético/MES, proteína, quantidades de HCl e NaOH, e também água para completar o volume final de 100 uL. A reação foi iniciada pela adição de mBBr utilizando o *dispenser* automático do leitor de microplaca.

A fluorescência foi monitorada através da fluorescência direta do produto (λ ex = 396 nm, λ em = 475 nm). As leituras de fluorescência de cada poço foram realizadas a cada 25 segundos durante aproximadamente 120 min. A velocidade de alquilação do mBBr foi obtida a partir da regressão linear da curva, que representava a formação do produto fluorescente *versus* tempo, no seu trecho de maior inclinação. A inclinação foi normalizada pela concentração inicial de mBBr e de proteína, nos casos onde concentrações diferentes foram utilizadas. Para obter as constantes de velocidade da reação entre AfPrxA e mBBr se determinou a constante aparente a pH=7,65. Esta determinação se fez em condições de pseudo-primeira ordem com excesso de mBBr com [AfPrxA-SH]_o < 1 μ M e [mBBr]_o entre 24 e 79 μ M. A reação segue por formação do produto fluorescente com λ_{ex} = 396 nm, λ_{em} = 475nm. Os cursos temporais se ajustaram a uma equação de primeira ordem (Eq. 1).

$$F = (F_0 - F_\infty) exp(-k_{obs}t) + F_\infty - bt \qquad \text{Eq. (1)}$$

Onde *F* é a emissão de fluorescência, (k_{obs}) é a constante de pseudo-primeira ordem, *b* é a inclinação onde se observa o desaparecimento do produto fluorescente e *t* é o tempo. Os valores de k_{obs} obtidos desta maneira, são plotados em função da [mBBr] para obter a k_{app} versus pH do experimento (7,65 ± 0,03), como descrito anteriormente (Sardi e col., 2013). Utilizando esta constante é possível obter um fator de proporcionalidade entre a velocidade e a k_{app} a um pH determinado. Desta forma, utilizando o perfil de pH de velocidade e o fator de proporcionalidade é possível extrapolar k_{app} em todo o intervalo de pH. Posteriormente o gráfico de k_{app} em função de pH é ajustado a uma função de duas constantes de ionização para obter as constantes de velocidade de alquilação independentes de pH.

3.16 Cinética competitiva entre ácido sulfênico proteico com 2,6diclorofenolindofenol por ascorbato.

Esse experimento possibilitou a determinação direta da constante de segunda ordem de reação entre ácidos sulfênicos em proteínas e ascorbato. O princípio do método é a competição entre a proteína AfPrxA na forma oxidada (AfPrxA-SOH) e 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) por ascorbato. Os experimentos de cinética rápida foram realizados utilizando espectrofotômetro acoplado a dispositivo de fluxo interrompido (*stopped-flow Applied Photophysics RX. 2000* e no *stopped-flow TgK Scientific SFA-20*) a temperatura de 24,4 ± 0,1 °C, empregando o modo de mistura simultânea em pH 7,44. Para os ensaios, AfPrxA foi pré reduzida com DTT (como descrito em Materiais e Métodos item 3.14) e oxidada estequiometricamente (1:1) com H₂O₂, obtendo a proteína oxidada (AfPrxA-SOH). A concentração de DCPIP ($\varepsilon_{600nm} = 21500 \text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$), ascorbato ($\varepsilon_{265nm} = 14500 \text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) e AfPrxA-SOH ($\varepsilon_{280nm} = 21555 \text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$), foram determinadas espectrofotometricamente.

Neste ensaio, para determinação da constante de segunda ordem da AfPrxA-SOH e ascorbato, foram utilizadas concentrações fixas de ascorbato (4 μ M) na primeira seringa e na segunda seringa foram adicionados DCPIP (45 μ M) e variações crescentes de AfPrxA-SOH. As reações foram monitoradas a 522 nm o qual é o ponto isosbéstico para absorção de luz por DCPIP em diferentes valores de pH. Os ensaios cinéticos foram realizados em condições de pseudo-primeira ordem (ver anexo 1 para maiores detalhes). Os valores de k_{obs} (s⁻¹) foram definidos a partir do ajuste das curvas obtidas com a equação integrada de primeira ordem, que será descrito a seguir em Resultados e Discussões. A constante de velocidade de segunda ordem para reação de AfPrxA-SOH e ascorbato foram estabelecidas pelo ajuste linear dos dados de k_{obs} *versus* a concentração de AfPrxA-SOH utilizada. Posteriormente, realizamos o ensaio de competição com as outras proteínas 1-Cys Prx de diferentes organismos na forma oxidada tanto para as selvagens (WT) como para as mutantes (Prx1-SOH, LsfA-SOH, LsfA-C45A, TaPER1-SOH, TaPER1-C46S TaPER1-SOH C72S e TaPER1-SOH C147S e Prdx6-SOH) para 2-Cys Típicas (Tsa1 e Tsa1-C170S) e também para proteínas que não fazem parte da família Prx (Papaína e GAPDH). As constantes de velocidade de segunda ordem de todas essas proteínas foram calculadas como discutiremos a seguir.

3.17 Simulações cinéticas

Foi empregado o programa de simulação GEPASI 3 (Mendes, 1997), que simula cinética de reações bioquímicas. O programa é de acesso livre na internet (<u>http://gepasi.dbs.aber.ac.uk/softw/gepasi.html</u>), e constitui uma excelente ferramenta para analisar cinéticas bioquímicas. Foram realizadas simulações cinéticas da atividade ascorbato + DCPIP (disponíveis na literatura) e também com o sistema de competição completo (ascorbato + DCPIP + 1-Cys Prx-SOH), mostrando a possibilidade de realização do método.

4.1 Caracterização da redução de 1-Cys Prx de *A. fumigatus* (AfPrxA) por ascorbato acoplada a oxidação por H₂O₂

Inicialmente, avaliamos a redução de AfPrxA-SOH por ascorbato (Reação 2), acoplando essa reação à oxidação dessa enzima por H_2O_2 (Reação 1) de acordo com o esquema abaixo:

Reação 1:

AfPrxA-S' + H_2O_2 AfPrxA-SOH + H_2O Reação 2:AfPrxA-SOH + AscorbatoAfPrxA-SOH + AscorbatoAfPrxA-S' + DHA

Sendo que a soma das reações 1 e 2, temos:

Reação 3:

Ascorbato + $H_{2}O_{2}$ \rightarrow $H_{2}O + DHA$

Como as reações das Prxs com peróxidos (similares a Reação 1) ocorrem em velocidades extremamente rápidas (com constantes de segunda ordem entre 10^6 a 10^8 M⁻¹ s⁻¹; Trujillo e col., 2007b), é de se esperar que a velocidade da Reação 3, dependa da Reação 2 que é o alvo de estudo desse trabalho. Dessa forma, podemos acompanhar as reações pelo consumo de H₂O₂, utilizando eletrodos específicos para esse oxidante. Para obter parâmetros cinéticos, empregamos abordagens de Michaelis-Menten, analisando dois substratos (ascorbato e H₂O₂) em condições de estado estacionário.

4.1.1 Expressão e purificação da 1-Cys Prx de A. fumigatus (AfPrxA).

A ORF *Afu5g15070* que codifica para a AfPrxA é uma proteína de localização citosólica que possui 205 aminoácidos e peso molecular de 22.950 kDa. Com a cauda de histidina na porção N-terminal da proteína, 20 aminoácidos a mais são adicionados, passando para um peso molecular de 24.972 kDa. A expressão do gene em questão resultou em uma proteína com massa similar a predita (Figura 11). A expressão dessa proteína apresenta um bom rendimento, sendo obtidos na média entre 8 a 9 mg de AfPrxA por 2L de cultura de células induzidas. Além disso, AfPrxA é uma proteína bastante estável o que nos ajudou na padronização dos ensaios.



Figura 11: Gel SDS-Page da purificação mostrando a 1-Cys de *A. fumigatus* (AfPrxA) utilizando DTT como redutor na concentração final de 250 mM.

4.1.2 Atividade específica da AfPrxA.

Para calibração prévia do equipamento, sempre foram feitas medidas de velocidade inicial em concentrações crescentes de H_2O_2 . As reações foram acompanhadas no equipamento *Free Radical Analyzer 4100* da *World Precision Instruments*, Inc., Sarasota, Flórida, USA. Uma curva representativa mostrando o consumo do H_2O_2 em função do tempo é apresentada na Figura 12.



Figura 12: Dados originais do aparelho *Free Radical Analyzer 4100 da World Precision Instruments, Inc.*, mostrando o consumo de H_2O_2 na concentração final de 150 μ M (observada pela queda do sinal) em função do tempo (s). A partir de dados como este, foram calculadas as velocidades iniciais nos trechos de maior inclinação. Para esse ensaio foi utilizado o tampão Tris/HCl 20 mM pH 7,4 contendo 100 μ M de azida e 100 μ M de DTPA, AfPrxA 2,5 μ M e ascorbato 500 μ M.

As velocidades das reações foram determinadas a partir da regressão linear das curvas μ M/s *versus* tempo (s), nos trechos lineares de maior declive e com velocidade constante utilizando o programa GraphPad Prism 5[®]. Para todas as medidas de velocidade feitas nesse projeto foi subtraída a velocidade da reação controle (sem AfPrxA) e também a reação de oxidação espontânea do H₂O₂. Para obter a atividade específica, foi construído um gráfico de velocidade inicial (μ M/s) *versus* a quantidade de AfPrxA (μ M) adicionada. O coeficiente angular da reta corresponde à atividade específica da enzima. O primeiro ensaio foi realizado com DTT (Figura 13), para saber se o sistema estava funcionando e posteriormente comparar com a atividade específica da AfPrxA na presença de ascorbato como redutor (Figura 14).

A AfPrxA apresentou uma atividade específica molar como peroxidase utilizando o ascorbato como redutor de $0,45 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$, enquanto utilizando o DTT foi de $0,39 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$. Essa observação adiciona uma evidência desta 1-Cys Prx possuir capacidade de decompor H₂O₂ usando ascorbato como redutor (Monteiro e col., 2007).



Figura 13: Gráfico de velocidade de consumo de 200 μ M de H₂O₂ (μ M/s) *versus* a quantidade de AfPrxA adicionada e 500 μ M de DTT como redutor. Ensaio utilizado para determinação da atividade específica da AfPrxA, utilizado o tampão Tris/HCl 20 mM pH 7,4 contendo 100 μ M de azida e 100 μ M de DTPA.



Figura 14: Gráfico de velocidade de consumo de 200 μ M H₂O₂ (μ M/s) *versus* a quantidade de AfPrxA adicionada e 1 mM de ascorbato como redutor. Ensaio utilizado para determinação da atividade específica da AfPrxA, utilizado o tampão Tris/HCl 20 mM pH 7,4 contendo 100 μ M de azida e 100 μ M de DTPA.

4.1.3 Cinética de Bi-substrato

Para melhor caracterizar a atividade da AfPrxA, foi realizada uma abordagem cinética bi-substrato para determinação dos seus parâmetros cinéticos. Como temos dois substratos para a AfPrxA (H₂O₂ e ascorbato) é necessário realizar a variação da concentração de um dos substratos, em concentrações fixas do outro substrato, para inicialmente determinarmos valores de K_M e V_{máx} aparentes e posteriormente, determinarmos valores de K_M reais para ambos os substratos e a velocidade máxima real (V_{máx}) da reação de acordo com procedimento descrito por Segel (1993).

Dessa forma, variamos a concentração de H_2O_2 em concentrações fixas de ascorbato (Figura 15), e determinamos as constantes aparentes da reação (Tabela 2). Cada curva corresponde a média de três experimentos independentes e são a média \pm desvio padrão. A partir da regressão não-linear das curvas de Michaelis-Menten determinamos as constantes aparentes para o substrato H_2O_2 nas diferentes concentrações de ascorbato utilizando o programa GraphPad Prism 5[®].



Figura 15: Gráfico de velocidade inicial *versus* a concentração de H_2O_2 para AfPrxA (2,5 μ M) em diferentes concentrações de ascorbato (0,5-2,5 mM). Para esse ensaio foi utilizado o tampão Tris/HCl 20 mM pH 7,4 contendo 100 μ M de azida e 100 μ M de DTPA.

[Asc] (mM)	$K_M^{app}(\mu M)$	k_{cat}^{app} (s ⁻¹)
0,5	$126,7 \pm 0,16$	$0,91 \pm 0,01$
1	$147,3 \pm 0,16$	$1,\!41 \pm 0,\!01$
1,5	$176,8\pm0,30$	$1,61 \pm 0,02$
2,5	$199,1 \pm 0,40$	$2,01 \pm 0,02$

Tabela 3: Constantes cinéticas aparentes para a redução do ácido sulfênico da 1-Cys AfPrxA por ascorbato, determinadas através da regressão não-linear de gráficos de Michaelis Menten.

As constantes aparentes para H_2O_2 também podem ser obtidas a partir dos gráficos de duplo recíproco, segundo tratamento de Lineweaver-Burk (Figura 16). Esse tratamento de dados produziu valores de constantes aparentes semelhantes aos mostrados na Tabela 3 (valores não mostrados).



Figura 16: Gráfico representando o duplo recíproco (Lineweaver-Burk).

Outro interesse que tínhamos na obtenção dos gráficos de duplo recíproco era analisar o perfil das retas em diferentes concentrações de ascorbato, o que possibilitaria fazer inferências a respeito do mecanismo pelo qual a reação se processa. Reações catalisadas que envolvem dois substratos (reações bi-substrato) podem ser classificadas de acordo com o mecanismo pelo qual se processam (Voet, 2004).

Nas reações sequenciais todos os substratos devem ligar-se a enzima antes de qualquer produto ser liberado. Dessa forma, ocorre a formação de um complexo ternário da enzima em ambos os substratos. Mecanismos sequenciais podem ser de dois tipos: ordenados, em que os substratos se ligam à enzima em uma sequência definida, e aleatório que não há uma ordem definida de ligação. Já nas reações Bi-Bi Ping Pong ocorre quando um ou mais produtos da reação são liberados antes de todos os substratos tenham sido combinados à enzima modificada (Berg, 2002).

Como observamos na Figura 16, a presença de retas paralelas para cada concentração de ascorbato indicam que o mecanismo catalítico da AfPrxA é do tipo Bi-Bi Ping Pong. Um modelo que se encaixa bem com esses resultados seria a AfPrxA-SH sendo oxidada a ácido sulfênico (AfPrxA-SOH) pelo substrato H_2O_2 liberando H_2O como produto final. O AfPrxA-SOH seria então reduzido pelo segundo substrato, o ascorbato (ASC), dando origem ao segundo produto, o DHA, desta maneira liberando a enzima para início de um novo ciclo catalítico (Figura 17).



Figura 17: Representação geral do funcionamento do modelo Bi Bi Ping-Pong da AfPrxA utilizando o ascorbato como redutor.

Essa é a primeira descrição do mecanismo catalítico de AfPrxA, utilizando o ascorbato como redutor. A partir dos parâmetros obtidos no gráfico de Michaelis-Menten, construímos um gráfico secundário de 1/ $V_{máx}^{app}$ versus 1/[ASC] e 1/ K_M^{app} versus 1/[ASC], e determinamos o K_M^{H2O2} real, K_M^{ASC} real e a $V_{máx}$ real da reação como descrito por Segel, 1993. Nestes replotes temos: quando y=0, x= -1/ K_M ASC (Figura 18A), e quando x=0 y= 1/ $V_{máx}$ (Figura 18B), os valores obtidos estão descritos na Tabela 4.



Figura 18: Obtenção dos replotes de (A) $1/K_M^{app}$ versus e 1/[Asc] e (B) $1/V_{max}^{app}$ versus 1/[Asc] para 1-Cys AfPrxA.

Tabela 4: Constantes cinéticas reais para a redução da 1-Cys AfPrxA por ascorbato, obtidas através dos gráficos secundários de $1/V_{máx}^{app}$ versus 1/[Ascorbato].

				Ascorbato	H_2O_2
Enzima	K_{M}^{ASC}	K_M^{H2O2}	k _{cat}	$k_{cat}/\mathrm{K}_{\mathrm{M}}$	k_{cat} /K _M
(µM)	(µM)	(µM)	(s^{-1})	$(Ms)^{-1}$	$(Ms)^{-1}$
AfPrxA 2,5	386,1±29,1	220,1±16,6	2,86±0,15	$7,4\pm0,15 \ge 10^3$	$1,3\pm0,07 \ge 10^4$

(B)

Os dados da Tabela 4 mostram as constantes cinéticas reais calculadas da AfPrxA para os dois substratos que a enzima utiliza: ascorbato e H₂O₂ através da abordagem de estado estacionário. A eficiência catalítica pode ser expressa através da constante de especificidade, igual a razão k_{cat} /K_M (M.s)⁻¹. A eficiência catalítica da AfPrxA utilizando o ascorbato como redutor é de k_{cat} /K_M = 7,4 x 10³ M⁻¹s⁻¹. No nosso caso, a AfPrxA mostra o comportamento de Michaelis-Menten clássico para ambos substratos (H₂O₂ e ascorbato) com valores aparentes de K_M e k_{cat} dependente da concentração de substratos.

A eficiência catalítica da redução de H_2O_2 é relativamente baixa (k_{cat}/K_M na ordem de $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) como mostrado acima, levaram muitos autores descreverem as Prxs como proteínas de reatividade moderada com hidroperóxidos, em comparação a outras enzimas detoxificantes de hidroperóxidos, como as glutationa peroxidases dependentes de selênio e catalases (k de aproximadamente $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

Determinações por métodos de estado estacionário subestimam as constantes de segunda ordem da reação de Prxs com os hidroperóxidos (Ogusucu e col., 2007). Além disso, a descrição do ciclo catalítico das Prxs como uma sequência de duas reações bimoleculares (mecanismo do tipo Bi-Bi Ping Pong, como descrito na Figura 17) é a simplificação de um ciclo catalítico complexo que envolve variações estruturais (Hall e col., 2011) que podem de alguma forma resultar em valores diferentes dos observados quando analisamos cada etapa isoladamente. Dessa forma, seria muito conveniente analisarmos a redução de AfPrxA-SOH por ascorbato diretamente, e não através de acoplamento com a oxidação de AfPrxA-S⁻ por H₂O₂.

4.2 Determinação dos valores de pK_a da AfPrxA

Prxs de outros organismos como mamíferos (Trujillo e col., 2007b), bactérias (Nelson e col., 2008) e leveduras (Ogusucu e col., 2007) tiveram os valores de pK_a das cisteínas reativas determinados. Em todos os casos, o valor de pK_a destas cistéinas é bastante inferior ao de cisteínas livres de aproximadamente 8,3 e situa-se entre 3,5 e 6,5. Devido ao baixo pK_a a cisteína N-terminal das Prxs estão predominantemente desprotonadas em pH fisiológico, na forma de tiolato, portanto, apresentando uma reatividade maior que cisteínas livres (Peskin e col., 2007; Winterbourn, 2008).

Por isso, resolvemos determinar os valores de pK_a da AfPrxA que possui a cisteína peroxidásica (Cys 28) e a cisteína 73 (Cys 73) um resíduo não conservado ainda de função desconhecida, mas se cogita a possibilidade de possuir função estrutural, pois aparentemente não possui papel na atividade redox. O método experimental utilizado para determinação do pK_a de duas cisteínas, foi o mesmo desenvolvido pelo grupo do professor Dr. Gerardo Ferrer-Sueta (Faculdade de Ciências, UdelaR – situada em Montevidéu-Uruguai) que se baseia na velocidade de alquilação da cisteína com o reagente fluorescente monobromobimano (MBBr; Kosower e col., 1979; Sardi e col., 2013). Essa reação se dá entre o tiolato (RS⁻) e MBBr, sendo sensível ao pH da reação. Portanto, os dados k_{app} versus pH foram ajustados a um modelo geral para dois pK_a:

$$y = \frac{a_1}{1 + \frac{K_{a1}}{[H^+]} + \frac{K_{a1}K_{a2}}{[H^+]^2}} + \frac{a_2}{\frac{[H^+]}{K_{a1}} + 1 + \frac{K_{a2}}{[H^+]}} + \frac{a_3}{\frac{[H^+]^2}{K_{a1}K_{a2}} + \frac{[H^+]}{K_{a2}} + 1}$$

Onde a_1 , a_2 e a_3 são as constantes independentes de pH para as três espécies ácido-base consideradas: a_1 : 1-Cys AfPrxA(SH)₂, (todas protonadas); a_2 : 1-Cys AfPrxA (SH)(S⁻) (apenas 1 cysteína protonada) e a_3 : 1-Cys AfPrxA(S⁻)₂ (as duas cisteínas desprotonadas). O pK_{a1} e pK_{a2} correspondem a primeira e a segunda ionização de cisteínas, respectivamente.

Os resultados da equação não linear utilizando a equação descrita anteriormente, produziu resultados consistentes com os valores determinados, podendo ser atribuído as reações da Cys 28 (pK_{a1} = $3,9 \pm 0,13$) e a Cys 73 (pK_{a2 =} 8,0 $\pm 0,04$) (Figura 19). O ânion tiolato (Cys-S⁻) é um agente mais nucleofílico que o grupamento sulfidrila (Cys-SH), sendo responsável pelo ataque nucleofílico ao substrato hidroperóxido iniciando o ciclo catalítico (Rhee, 2005; Trujillo e col., 2008). Com base na equação de Henderson-Hasselbalch: pH = pK_a + log [S⁻]/[SH] (Po, 2001) e o valor de pK_a da Cys 28 da AfPrxA, podemos calcular a porcentagem da cisteína que estaria na forma de tiolato em pH 7,4 para AfPrxA. Considerando o valor obtido com MBB, temos que mais de 99% da Cys 28 de AfPrxA está na forma de tiolato em pH 7,4.



Figura 19: Gráficos utilizados para a determinação do pK_a da proteína 1-Cys Prx AfPrxA através do método de alquilação com MBBr. O gráfico é dado k_{app} versus pH.

Pensa-se frequentemente que os tiolatos são extraordinariamente rápidos em suas reações bioquímicas específicas, possuindo um aumento da nucleofilicidade intrínseca complementada com o reconhecimento do substrato. Embora muitas cisteínas catalíticas sejam ácidas, somente o valor baixo de pK_a não parece ser suficiente para explicar a alta reatividade das Prxs com peróxidos como é descrito na literatura (Roos, 2013).

Na verdade, a arquitetura do sítio catalítico das Prxs revela que aspectos estruturais podem ser mais importantes que os pK_a das cisteínas reativas no controle da velocidade de reações de redução de peróxidos (Ferrer-Sueta e col., 2011; Hall e col., 2011; Billiet e col., 2012; Karplus, 2015). A presença de aminoácidos conservados que estão posicionados próximos ao sítio ativo como Pro, Arg e Thr estão envolvidos na estabilização do tiolato, baixando o pK_a durante a reação com peróxidos. Os resíduos de Arg e Thr fazem duas ligações de hidrogênio com a Cys_p estabilizando o ânion tiolato, enquanto a Pro limita a acessibilidade do solvente e do peróxido à Cys_p, protegendo o intermediário ácido sulfêncio da superoxidação (Hall e col., 2011; Karplus, 2015).

Neste mecanismo também é proposto que a alta reatividade das Prxs é consequência da estabilização do estado de transição do tipo $S_N 2$ (substituição nucleofílica bimolecular), onde o enxofre da Cys_p ataca o oxigênio terminal (O_A) do

peróxido, promovendo a quebra da ligação entre O_A - O_B , levando a formação Cys-SOH e a liberação de um grupo de saída (Hall e col., 2010; Karplus, 2015). Desta maneira, para uma catálise eficiente, tão importante como a organização do centro ativo e a ativação do nucleófilo, é a estabilização do estado de transição de uma reação do tipo $S_N 2$ e a formação de um bom grupo de saída (Hall e col., 2010).

4.3 Determinações de constantes de segunda ordem da redução de 1-Cys Prx por ascorbato, usando ensaios de competição.

Os resultados apresentados anteriormente representam um grande avanço na caracterização cinética da redução de 1-Cys Prx por ascorbato. No entanto, o método utilizando eletrodos específicos para H_2O_2 para determinar k_{cat}/K_M da AfPrxA é um ensaio bastante difícil e indireto.

Foram necessários mais de um ano de análises e padronizações destes ensaios apenas para descrever os resultados descritos anteriormente com apenas uma proteína, além de ser um equipamento que a maioria dos laboratórios não possui dificultando análises comparativas. Além disso, os eletrodos são importados e possuem uma vida útil curta (14 dias após instalados).

4.3.1 Análises das reduções de 1-Cys Prx

4.3.1.1 1-Cys Prx de A. fumigatus (AfPrxA)

Para melhor caracterizar a redução da AfPrxA por ascorbato, após muitas tentativas sem sucesso em conseguir validar os dados obtidos com o eletrodo, foi possível desenvolver em colaboração com o Dr. Gerardo Ferrer-Sueta, um novo ensaio utilizando uma abordagem cinética de competição, usando um composto chamado DCPIP (2,6-diclorofenolindofenol) que é um sensor redox.

Como descreveremos a seguir, o uso de DCPIP se justifica, pois a redução desse composto por ascorbato é muito bem estudada, inclusive com a determinação de parâmetros cinéticos (Garry e col., 1974; Karayannis, 1976; Rao, 1987). Além disso, é um composto que reage apenas com ascorbato e não com a proteína.

O esquema geral que descreve o princípio do método é o seguinte:



DCPIP e AfPrxA-SOH competem por ascorbato com constantes de segunda ordem k_1 e k_2 , respectivamente. Como foram empregadas condições de pseudoprimeira ordem, temos que $k_{obs} = (k_1 * [DCPIP]) + (k_2 * [AfPrxA-SOH])$. Ou seja, desde que k_1 seja conhecida, juntamente com a concentração inicial dos reagentes e a concentração final de pelo menos um produto, o valor da constante de segunda ordem k_2 pode ser obtido. Portanto, como primeiro passo, determinamos a constante k_1 de segunda ordem de DCPIP com ascorbato, cuja estequiometria é 1:1 (Garry e col., 1974; Karayannis, 1976; Rao, 1987) (Figura 20) em uma reação de óxido-redução.



Figura 20: Reação do ascorbato com DCPIP (2,6-diclorofenolindofenol), formando como produtos DHA (deidroascorbato – ascorbato oxidado) e DCPIP reduzido. Cabe destacar que o substrato DCPIP é azul e o seu produto reduzido é incolor (Karayannis, 1976).

Os experimentos de cinética rápida foram realizados em um espectrofotômetro equipado com *stopped flow* acoplado no modo de mistura simultânea conforme descrito em Materiais e Métodos item 3.16. A reação do DCPIP (46 µM) com
ascorbato (4 μ M) foi acompanhada pelo decaimento da absorção a 522 nm devido à redução de DCPIP (Figura 21).



Figura 21: Dados originais mostrando o gráfico de Abs a 522 nm *versus* tempo (s). A partir de dados como este, calculamos os ajustes de cada curva com a equação integral de primeira ordem das diferentes repetições. Para este gráfico foi utilizado DCPIP na concentração final de 46 μ M e ascorbato (4 μ M).

A partir disso, obtivemos a curva média das múltiplas repetições (médias n \geq 4), e realizamos o ajuste com a equação integrada de primeira ordem (Eq.1) obtendo os valores de absorbância instantânea (Abs), absorbância inicial (Abs_{ini}) e absorbância final (Abs_f). Para obter a constante de pseudo-primeira ordem (k_{obs}), a equação 1 foi derivada como descrito abaixo, obtendo-se a equação 4.

Dessa forma, o gráfico com eixo y igual a: log (Abs - Abs_f)/(Abs_{ini}-Abs_f) em função do eixo x igual ao tempo (t) possui uma reta com ordenada de origem 1 e uma inclinação $-k_{obs}$ (constante observada de pseudo-primeira ordem).

$$Abs = (Abs_{ini}-Abs_f)exp(-k_{obs}t) + Abs_f$$
(Eq.1)

Abs - Abs_f = (Abs_{ini}-Abs_f)exp(- k_{obs} t) (Eq.2)

$$(Abs - Abs_f)/(Abs_{ini}-Abs_f) = exp(-k_{obs}t)$$
(Eq.3)

$$\log ((Abs - Abs_f)/(Abs_{ini}-Abs_f)) = -k_{obs}t$$
(Eq.4)

Essa abordagem de pseudo-primeira ordem é muito conveniente, pois a determinação do k_{obs} se dá em uma equação de primeiro grau, ou seja, utilizando uma reta. Cinéticas representativas de pseudo-primeira ordem são apresentadas para várias concentrações de DCPIP (Figura 22) após o tratamento dos dados brutos.



Figura 22: Cursos temporais tratados com a equação integral de primeira ordem (médias $n \ge 4$) de redução do DCPIP a 522 nm com diferentes concentrações de DCPIP (46-197 µM) e concentração fixa de ascorbato (4 µM). Condições experimentais: pH 7,44 ± 0,1, temperatura 24 ± 0,1 °C. Tampão fosfato de potássio 50 mM contendo NaCl 50 mM e DTPA 100 µM. As retas pretas representam as retas que melhor se ajustam aos dados experimentais (retas coloridas conforme descrito na parte superior a direita). As inclinações dessas retas representam os k_{obs} (s⁻¹) para as diferentes concentrações de DCPIP. Nessas condições, $kobs = k_1 * [DCPIP]$.

Os valores de k_{obs} (s⁻¹) obtidos foram analisados em um novo gráfico em função da concentração de DCPIP para obtenção da constante de segunda ordem entre ascorbato e DCPIP. A inclinação da reta corresponde a constante de segunda ordem da redução de DCPIP por ascorbato ($k = 7,18 \pm 0,012 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ em pH 7,44 a 24,4 °C) (Figura 23). A reação entre ascorbato e DCPIP está bem caracterizada e a constante de velocidade obtida está de acordo com o descrito na literatura (Karayannis, 1976).



Figura 23: Gráfico para obtenção da constante de segunda ordem obtido por regressão linear dos cursos temporais com diferentes concentrações de DCPIP (46-197 μ M) a uma concentração fixa de ascorbato (4 μ M). Condições experimentais: pH 7,44 ± 0,1, temperatura 24 °C. Tampão fosfato de potássio 50 mM contendo NaCl 50 mM e DTPA 100 μ M.

Após determinar a constante de segunda ordem da reação entre ascorbato e DCPIP, realizamos o ensaio de competição entre AfPrxA-SOH e DCPIP por ascorbato. Neste ensaio a concentração de ascorbato é o agente limitante durante todo o curso da reação. Dessa forma, como esperado foi observado o aumento de k_{obs} (s⁻¹) dependente da concentração de AfPrxA-SOH (Figura 24).



Figura 24: Cursos temporais tratados com a equação integral de primeira ordem (médias $n \ge 4$) de redução do DCPIP acompanhado pela absorção a 522 nm com diferentes concentrações AfPrxA-SOH (0-9,5 µM), e concentrações fixas de ascorbato (4 µM) e DCPIP (45 µM). Condições experimentais: pH 7,44 ± 0,1, temperatura 24 °C. Tampão fosfato de potássio 50 mM contendo NaCl 50 mM e DTPA 100 µM. Nessas condições, $kobs = k_1 * [DCPIP] + k_2 * [AfPrxA-SOH].$

Dessa forma, a constante de segunda ordem (k_2) da reação do ascorbato com a AfPrxA-SOH é dada pela inclinação do gráfico k_{obs} (s⁻¹) *versus* concentração de AfPrxA-SOH (μ M) sendo de $k = 1,4 \pm 0,079 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ em pH 7,44 a temperatura de 24,4°C (Figura 25).

Esse resultado mostra claramente que a 1-Cys Prx AfPrxA-SOH utiliza o ascorbato como redutor. Vale salientar que essa é a primeira descrição cinética da redução de 1-Cys Prx utilizando o ascorbato como redutor por dois métodos distintos. Cabe destacar, que a constante de segunda ordem da reação obtida por este método é da mesma ordem de grandeza daquela obtida utilizando a cinética de estado estacionário com o eletrodo específico de H_2O_2 (k_{cat}/K_M ascorbato = 7,4 x 10³ ± 0,15 M⁻¹ s⁻¹). Vale ainda mencionar que organismo possui quarto isoformas de Trxs, e que nenhuma foi capaz de reduzir a AfPrxA (dados não mostrados obtidos pela aluna de doutorado Renata Bannitz Fernandes do nosso grupo).



Figura 25: Gráfico de segunda ordem obtido por regressão linear dos cursos temporais com diferentes concentrações de AfPrxA-SOH (0-9,5 μ M) com concentrações fixas de ascorbato (4 μ M) e DCPIP (45 μ M). Condições experimentais: pH 7,44 ± 0,1; temperatura 24 °C. Tampão fosfato de potássio 50 mM contendo NaCl 50 mM e DTPA 100 μ M.

Ainda é prematuro comparar a relevância biológica do sistema ascorbato em *A. fumigatus*, uma vez que os fungos não sintetizam ascorbato, mas sim um análogo do ascorbato chamado eritroascorbato (EAA), com estrutura e propriedades fisiológicas semelhantes ao ascorbato, sintetizado a partir da D-Arabinose (Huh e col., 1998; Hancock, 2000; Smirnoff, 2001; Figura 26). O EAA pode substituir o ascorbato em muitos processos como na atividade antioxidante (Huh e col., 1998), mas não na atividade anti-escorbuto em humanos (Sauberlich, 1994). O EAA já foi descrito em *Neurospora* (Dumbrava, 1987) e em *Sclerotinia* (Loewus e col., 1995), todos pertencentes ao filo Ascomicetos. *A. fumigatus* utilizada neste estudo faz parte deste mesmo filo, no entanto sua abundância nestes organismos ainda não foi determinada.

Além de EAA, os fungos do filo Basidiomicetos possuem um outro análogo pouco conhecido chamado 6-deoxi-L-ascorbato (Okamura, 1994; 1998), sintetizado a partir da L-Fucose. Em contraste com o ascorbato presente em plantas e animais, o EAA e o 6-deoxiascorbato são glicosilados na posição C5 por uma variedade de açúcares, incluindo glicose, galactose e xilose (Okamura, 1994; Keates e col., 1998), como um possível mecanismo para manter o análogo do ascorbato em uma forma

estável (Keates e col., 1998). Isto sugere que a síntese do EAA e/ou 6-deoxiascorbato existe em fungos e presumivelmente pode ser uma nova via a ser investigada neste organismo.



D- Eritroascorbato

Figura 26: Síntese de D-eritroascorbato em fungos. Enzimas utilizadas nesta via: 1: D-Arabinose desidrogenase; 2: Arabinono-1,4-lactona oxidase (Adaptado de Kim e col., 1998b).

4.2.1.2 1-Cys Prx de S. cerevisiae (Prx1)

Decidimos expandir nosso estudo de caracterização cinética de outras 1-Cys Prx por ascorbato. Em leveduras, investigamos a redução da 1-Cys Prx mitocondrial de *S.cerevisiae* (Prx1) (ORF YBL064C). A proteína possui uma sequência de 261 aminoácidos e uma massa molecular de 28.845 kDa com 3 cisteínas na posição 6, 38 e 91. Devido a região N-terminal desta proteína apresentar uma sequência de 21 resíduos de aminoácidos de endereçamento mitocondrial, a proteína recombinante foi construída a partir do resíduo de aminoácido 39, com uma cauda de histidina presente no C-terminal e apenas 1 Cys em toda a sequência correspondente a Cys_p (Cys 91) (Figura 27).



Figura 27: Gel SDS-Page da purificação mostrando a 1-Cys de *S. cerevisiae* (Prx1) utilizando DTT como redutor na concentração final de 250 mM.

Como mencionado em Materiais e Métodos, inicialmente reduzimos a proteína com DTT, removemos o excesso de redutor e oxidamos a Prx1 na proporção de 1:1 com H₂O₂. Analisamos a competição, empregando várias concentrações de Prx1-SOH, mantendo as concentrações de ascorbato (4 μ M) e DCPIP (45 μ M) fixas. Dessa forma, a constante de segunda ordem (k_2) da reação do ascorbato com a Prx1-SOH é dada pela inclinação do gráfico k_{obs} (s⁻¹) *versus* a concentração de proteína utilizada (μ M) (Figura 28). A constante de segunda ordem obtida entre Prx1-SOH e ascorbato foi de $k = 0,4 \pm 0,002 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Interessantemente, a constante obtida foi um pouco menor quando comparada a AfPrxA. No entanto, deve-se considerar que a proteína Prx1 apresenta atividade ótima ao redor do pH 6,4, devido a retirada dos aminoácidos referentes ao endereçamento mitocondrial (Pedrajas e col., 2000).

Vale mencionar que a levedura possui um sistema Trx mitocondrial que reduz a Prx1 (Pedrajas e col., 2000). Além disso, foi reportado que a Grx2 pode também utilizar elétrons provenientes da GSH e reduzir a Prx1 (Pedrajas e col., 2010). Outro estudo evidenciou que a Prx1 poderia ser reduzida pela tiorredoxina redutase utilizando elétrons da GSH (Greetham, 2009). Contudo a redução da Prx1 pela Trx mitocondrial, GSH ou por Grx2 ainda requer uma caracterização cinética rigorosa, pois as constantes de velocidade não estão determinadas.



Figura 28: Gráfico de segunda ordem obtido por regressão linear dos cursos temporais com diferentes concentrações de Prx1-SOH (0-13 μ M) com concentrações fixas de ascorbato (4 μ M) e DCPIP (44 μ M). Condições experimentais: pH 7,32 ± 0,1, temperatura 25°C. Tampão fosfato de potássio 50 mM contendo NaCl 50 mM e DTPA 100 μ M.

A presença de EAA também foi descrito em *S. cerevisiae* (Nick, 1986; Huh e col., 1998; Spickett, 2000), *L. starkeyi* (Nick, 1986) e *Candida* (Huh e col., 2001). A biossíntese de EAA em leveduras é semelhante a via observada em fungos onde D-Arabinose aparece como precursor inicial (Smirnoff, 2011; Spickett e col., 2000). Além disso, a enzima D-Arabinose desidrogenase presente em leveduras possui uma ampla especificidade para diferentes substratos, podendo oxidar D-Arabinose, L-Fucose, L-Xilose, e também L-Galactose para a síntese de EAA (Kim e col., 1996).

Investigações em *S. cerevisiae* (Huh e col., 1998) e *C. albicans* (Huh e col., 2001) mostraram que o EAA possui função antioxidante, embora aumentando a concentração de EAA não protegeu o *pool* de glutationa da depleção frente à exposição a H_2O_2 (Spickett e col., 2000). Hancock e colaboradores (2000) evidenciaram que o ascorbato não é um produto natural do metabolismo de *S. cerevisiae*, mas a síntese pode ser induzida através do fornecimento de substratos não fisiológicos, que são convertidos em ascorbato, através das mesmas enzimas presentes na biossíntese de EAA.

4.2.1.3 1-Cys Prx de P. aeruginosa (LsfA)

Tendo analisado a redução por ascorbato de uma 1-Cys Prx de fungo e de levedura, investigamos a redução da 1-Cys Prx de *P. aeruginosa*. A primeira descrição de 1-Cys Prx em bactérias foi relatada recentemente (Kaihami e col., 2014), apresentando evidências do seu papel na virulência bacteriana.

Das dez prováveis Prxs de *P. aeruginosa*, apenas a Peroxirredoxina denominada LsfA (PA14_19490) codifica para um produto com 212 aminoácidos, peso molecular de 24.2 kDa e localização citosólica, pertencente a classe das 1-Cys Prxs (Prx6). Com a cauda de histidina na porção N-terminal da proteína, 30 aminoácidos foram adicionados, passando para um peso molecular de 27.675 kDa.

Para verificar se a LsfA de *P. aeruginosa* apresenta atividade peroxidásica utilizando ascorbato, as proteínas LsfA e a mutante LsfA-C45A que apresenta uma mutação pontual na Cys_p, substituindo-a por alanina, foram expressas em *E. coli* e purificadas por cromatografia de afinidade a níquel (Figura 29).



Figura 29: Gel SDS-Page da purificação mostrando a 1-Cys de *P. aeruginosa* (LsfA e LsfA-C45A) utilizando DTT como redutor na concentração final de 250 mM.

Através do ensaio de competição, a constante de segunda ordem para LsfA-SOH e ascorbato é de $k = 2,2 \pm 0,006 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Figura 30A), similar à descrita para AfPrxA-SOH. Como controle utilizamos a mutante LsfA-C45A, e o resultado mostrou que a mutante não pode ser reduzida, evidenciando que a reatividade do ascorbato com LsfA-SOH corresponde a Cys_p quando oxidada a Cys-SOH (Figura 30B). Cabe ressaltar que a LsfA possui apenas uma Cys em toda a sua sequência de aminoácidos e que ainda não se tem conhecimento sobre outros possíveis redutores de LsfA presentes em *P. aeruginosa*.

A relevância de ascorbato em bactérias ainda permanece desconhecida. Um relato antigo descreveu a presença da enzima D-galactose desidrogenase em *Pseudomas fluorescens* (Blachnitzky, 1974) que faz parte da via de síntese do ascorbato. Em *Micobateria* evidenciaram a ocorrência da síntese de D-arabinose (Wolucka, 2008), um intermediário da via da biossíntese de EAA já relatada em leveduras e fungos (Kim e col., 1998b; Loewus e col., 1995). Além disso, foi descrito em *E. coli* a presença de transportadores de ascorbato (Zhang, 2003), uma vez que as bactérias podem utilizar o ascorbato como fonte de carbono (Linster, 2007). Contudo, existem ainda poucas informações sobre a biossíntese ou concentração de ascorbato e análogos em *Pseudomas*, para que podemos avaliar se a relevância da redução de ácido sulfênico em LsfA por ascorbato é viável, e assim nos fornecer ferramentas úteis para a compreensão e correlação de suas funções.



(B)



Figura 30: Gráficos de segunda ordem obtidos por regressão linear dos cursos temporais com diferentes concentrações de (A) LsfA-SOH (0-6 μ M) e (B) LsfA-C45A (0-7 μ M) com concentrações fixas de ascorbato (4 μ M) e DCPIP (45 μ M). Condições experimentais: pH 7,4 ± 0,1, temperatura 25 °C. Tampão fosfato de potássio 50 mM contendo NaCl 50 mM e DTPA 100 μ M.

4.2.1.4 1-Cys Prx de *R. novergicus* (Prdx6)

A 1-Cys Prx de *R. novergicus* (Prdx6) é uma enzima bifuncional com atividade peroxidase e fosfolipase A_2 (PLA₂) (centrada no resíduo de Ser 32) independente de cálcio (Manevich, 2004; Manevich e col., 2009; Fisher, 2011) e com localização citosólica. O cDNA da Prdx6 já foi descrito em humanos (GenBank Accession No. D14662), ratos (AF014009), camundongos (AF004670), vacas (AF090194) e porcos (AJ243849) (Kim e col., 1997-1998; Iakouoba e col., 1997; Stuhlmeier e col., 2003; Fisher e col., 1999). Além disso, em humanos altos níveis de expressão do RNAm foram descritos em pulmão, cérebro, figado, testículos e rins (Fujii, 2001; Kim e col., 1998; Lee col., 1999; Liu e col., 2010; Mo e col., 2003).

A sequência primária consiste em 224 resíduos de aminoácidos e possui uma massa molecular de 25.100 kDa (para a enzima humana), embora a proteína geralmente migra acima de 25 kDa (Figura 31) também observado em outros estudos (Kim e col., 1997; Fisher, 2011). Acredita-se que essa diferença na migração pode ser causada por alguma influência catiônica da região N-terminal reduzindo a mobilidade da proteína no SDS-Page (Kim e col., 1997).



Figura 31: Gel desnaturante SDS Page das proteínas 1-Cys Prx de *R. novergicus* (Prdx6) utilizando DTT como redutor na concentração final de 250 mM.

Observações iniciais com a proteína Prdx6 isolada de corpo ciliar bovino (Singh, 1998), indicavam que a enzima não usava GSH como doador de elétrons para redução de hidroperóxidos (Peshenko e col., 1998-2001). Análises da estrutura cristalográfica desta proteína (disponível Uniprot: P30041 – *H. sapiens*) indicam que a Cys_p (Cys 47) está enterrada dentro do sítio ativo da Prdx6 e pelos dobramentos estruturais da proteína poderiam tornar inacessível a redução diretamente por GSH (Manevich, 2005). Posteriormente, foi demonstrado que a GSH pode reduzir a Prdx6, dependendo da formação de um heterodímero da 1-Cys Prx com a glutationa transferase da classe pi (GST π) (Manevich, 2004 - 2005; Saikumari e col., 2016). A constante de velocidade entre a Prdx6 e GSH é de 2-5 x10⁶ M⁻¹ s⁻¹ (Manevich, 2005). Por outro lado, nosso grupo mostrou que a Prdx6 de rato pode ser reduzida por ascorbato, mas a constante da reação não foi determinada (Monteiro e col., 2007).

Nesse contexto, decidimos utilizar a abordagem cinética competitiva com DCPIP estabelecida por nosso grupo, e determinar a constante de segunda ordem entre Prdx6-SOH e ascorbato. Os resultados mostram que a Cys_p oxidada a ácido sulfênico foi reduzida diretamente após tratamento com ascorbato com uma constante de $k = 1,0 \pm 0,027 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Figura 32). Vale destacar que essa proteína também não utiliza o sistema Trx nem Srx como redutor fisiológico (Fisher e col., 1999; Woo e col., 2003-2005).



Figura 32: Gráfico de segunda ordem obtido por regressão linear dos cursos temporais com diferentes concentrações de Prdx6-SOH (0-6 μ M) com concentrações fixas de ascorbato (4 μ M) e DCPIP (45 μ M). Condições experimentais: pH 7,32 ± 0,1, temperatura 25°C. Tampão fosfato de potássio 50 mM contendo NaCl 50 mM e DTPA 100 μ M.

Os parâmetros cinéticos obtidos aqui mostram que o ascorbato pode ser um doador de elétrons fisiológico apesar de apresentar uma constante de velocidade mais baixa quando comparada com a redução por GSH. A redução do ácido sulfênico pode ser favorecida dependendo das concentrações de GSH, ascorbato e Prdx6 pertencentes no meio intracelular, especialmente em tecidos onde a GST π não é expressa, como por exemplo, em alguns tipos de câncer de mama (Zhou e col., 2013). Nesses tecidos, a GSH não poderia reduzir a Prdx6, e a via dependente de ascorbato pode ser mais relevante. Portanto, a velocidade de formação do heterodímero (entre Prdx6 e GST π) poderia limitar a redução por GSH. Como a heterodimerização entre Prdx6 e GST π ainda não está caracterizada cineticamente, a interpretação da relevância biológica dessa via é dificultada.

Além da constante de velocidade, também a concentração de ascorbato deve ser considerada porque a velocidade de reação depende desses dois fatores. A concentração de ascorbato em mamíferos varia de tecido para tecido (Levine, 2011). Em neurônios a concentração de ascorbato pode chegar até 10 mM e 1 mM em astrócitos (Ferreira e col., 2015). No espaço extracelular do cérebro a concentração varia entre 250-500 µM (Ferreira e col., 2013). Em glândulas adrenais a concentração também é elevada (30-40mg/100g). No entanto, em fígado (10-16mg/100g), pulmão (7mg/100g), rins (5-15mg/100g), pâncreas (10-15mg/100g) e plasma (0,4-1mg/100g) fica evidente que a concentração e compartimentalização do ascorbato variam amplamente de acordo com suas necessidades biológicas (Richelle, 2006; Lindblad, 2013).

Nosso estudo fornece informações mecanicistas importantes que foram obtidas em sistema *in vitro*, ajudando há elucidar um pouco sobre a interação ácido sulfênico/ascorbato. No entanto, ainda há muito que ser aprendido sobre essa nova via de redução em mamíferos. Mecanismos que favorecem essa interação ainda precisam ser revelados, nos permitindo um maior esclarecimento de como essa reação possa ocorrer *in vivo*.

4.2.1.5 1-Cys Prx de T. aestivum (TaPER1)

Em plantas, a primeira Prx caracterizada foi a enzima codificada pelo gene Per1, que codifica para uma 1-Cys Prx específica de sementes localizada no núcleo das células do embrião e na capa de aleurona de sementes de cevada (Stacy e col., 1996-1999). Através de uma colaboração com o professor Dr. Francisco Javier Cejudo Fernandez da Universidade de Sevilha – Espanha, obtivemos as proteínas recombinantes da 1-Cys Prx de trigo (TaPER1) e as mutantes TaPER1-C46S (mutação na Cys_p) e TaPER1-C72S e TaPER1-C147S (mutações em outras cisteínas presentes na sequência de aminoácidos).

A proteína possui um sinal de localização nuclear (NLS) localizado no Cterminal da proteína (Stacy e col., 1999), 218 aminoácidos e uma massa molecular de 23.965 kDa. Com a cauda de histidina na porção N-terminal da proteína, 21 aminoácidos são adicionados, passando para um peso molecular de 26.486 kDa. A purificação destas proteínas em pureza suficiente para a realização de ensaios enzimáticos foi alcançada com a utilização de um gradiente imidazol a uma concentração de 500mM, utilizando AKTA FPLC com Frac-900 e coluna (Ni-NTA superflow de 5 mL (Figura 33).



Figura 33: Gel desnaturante SDS Page das proteínas 1-Cys Prx de *T. aestivum* (TaPER1, TaPER1-C46S, TaPER1-C72S e TaPER1-C147S), utilizando DTT como redutor na concentração final de 250mM.

Em seguida, realizamos o ensaio de competição da 1-Cys Prx de trigo e DCPIP por ascorbato, e a constante de segunda ordem obtida entre TaPER1-SOH e ascorbato foi de $k = 2,2 \pm 0,007 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Figura 34A). Como controle, utilizamos a proteína TaPER1-C46S que teve sua atividade ascorbato dependente abolida

(Figura 34B), comprovando novamente que o ascorbato reduz diretamente o ácido sulfênico formado após a reação com H_2O_2 . Também utilizamos as mutantes de TaPER1-C72S (Cys conservada em 1-Cys Prx de plantas; Pulido, 2009) e C147S (Cys conservada exclusivamente em monocotiledôneas), para verificar se essas cistéinas presentes na sequência poderiam reagir com ascorbato.

(A)



(B)



Figura 34: Gráfico de segunda ordem obtidos por regressão linear dos cursos temporais com diferentes concentrações de (A) TaPER1-SOH (0-10 μ M), (B) TaPER1-C46S (0-4 μ M) com concentrações fixas de ascorbato (4 μ M) e DCPIP (45 μ M). Condições experimentais: (A) pH 7,5; (B) pH 7,4 ± 0,1, temperatura 25 °C. Tampão fosfato de potássio 50 mM contendo NaCl 50 mM e DTPA 100 μ M.

As outras proteínas mutantes foram individualmente analisadas pelo ensaio de competição e as constantes de velocidade obtidas para TaPER1-SOH C72S é de $k = 1,3 \pm 0,039 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e para TaPER1-SOH C147S de $k = 2,0 \pm 0,006 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Figura 35A e 35B). A partir destes resultados, podemos concluir que a reação ocorre apenas com o sulfênico formado presente na Cys 46 após reação com H₂O₂, não sendo observada nenhuma influência das outras Cys.

(A)



(B)



Figura 35: Gráfico de segunda ordem obtidos por regressão linear dos cursos temporais com diferentes concentrações de (A) TaPER1-SOH C72S (0-10 μ M) e (B) TaPER1-SOH C147S (0-8 μ M) com concentrações fixas de ascorbato (4 μ M) e DCPIP (45 μ M). Condições experimentais: pH 7,5± 0,1, temperatura 25 °C. Tampão fosfato de potássio 50 mM contendo NaCl 50mM e DTPA 100 μ M.

Até o momento em plantas além do ascorbato, o único sistema de redução proposto para a 1-Cys Prx é o sistema NTR (Trx redutase dependente de NADPH) que está co-localizado juntamente com a TaPER1 no núcleo de aleurona e em células do escutelo em sementes de trigo (Pulido, 2009). Este resultado não deixa de ser intrigante, porque a NTR é um eficiente redutor de pontes de dissulfeto, especificamente em Trx. Além disso, a constante de velocidade para a redução da TaPER1-SOH pelo sistema NTR ainda não foi determinada para realizar uma comparação quantitativa com o sistema ascorbato.

O ascorbato é o principal antioxidante solúvel de baixo peso molecular em plantas (Noctor, 1998; Dietz, 2011), possuindo funções relacionadas a defesa de plantas, sinalização redox e modulação da expressão gênica (Noctor, 2006; Zhang e col., 2013). Em plantas, o ascorbato pode ser encontrado em muitos compartimentos celulares incluindo núcleo, citosol, vacúolo, mitocôndria, e peroxissomos (Rautenkranz, e col., 1994; Foyer, 1996; Jiménez e col., 1997; Zechmann, 2011; Liso e col., 2004). Em cloroplastos e mitocôndrias, o ascorbato não foi apenas detectado no estroma e matriz, mas também no lúmen dos tilacóides (Zechmann, 2011; Zechmann, 2014). Em *Arabidopsis* e *Nicotiana*, altos níveis de ascorbato foram encontrados em cloroplastos (acima de 10mM), no citosol seguido por peroxissomos (22,8 mM) e núcleo (16,3 mM) durante condições de estresse (Foyer, 1993-2009; Zechmann, 2011b; Figura 36).



Figura 36: Distribuição de ascorbato em *A. thaliana.* As concentrações foram calculadas definindo a concentração total de ascorbato em peso fresco e determinado por HPLC. Estas concentrações correspondem a densidade média em toda célula de 5,1 partículas de ouro por μ m² por célula. A densidade da partícula de ouro nos compartimentos celulares pode ser correlacionada com as diferentes concentrações de ascorbato em mM (Adaptado de Zechmann, 2011).

Elevados níveis também foram descritos em folhas de plantas alpinas, sendo utilizado como uma reserva para a síntese de ascorbato e o transporte intracelular sob condições de estresse foto-oxidativas (Gest, 2013). O ascorbato pode acumular em órgãos fotossintéticos, mas também pode alcançar altas concentrações em tecidos não fotossintéticos, sendo que estas concentrações dependem de fatores ambientais, genótipo e estágio de desenvolvimento do órgão (Zechmann, 2011; Gest, 2013).

Apesar da necessidade de estudos sobre a concentração de ascorbato em sementes, acredita-se que o papel das 1-Cys Prxs pode estar vinculado aos níveis de ascorbato, estabelecendo um equilíbrio no estado redox durante a fase de germinação (Behairy, 2012) e desenvolvimento (Dietz, 2010; Demirkaya, 2010) em plantas. Em sementes de *Trigonella foenum-graecum* a aplicação de ascorbato aumentou a atividade de isoenzimas peroxidásicas, levando um aumento da resistência ao estresse (Behairy, 2012). Outros estudos evidenciaram que o ascorbato também estimulou a germinação e o desenvolvimento de trigo (Afzal e col., 2006), feijão (Azzoz, 2009) e tomate (Barh, 2008).

Em sementes transgênicas de tabaco que superexpressavam a 1-Cys Prx de arroz (R1C-Prx) exibiram uma atividade protetora contra o estresse oxidativo gerado após tratamento com H_2O_2 (Lee e col., 2000). Por outro lado, em *X. viscosa* Baker, o gene *XvPer1* codificante para 1-Cys Prx de localização nuclear presente em folhas, foi transcrito logo que a planta foi exposta a diferentes condições de estresse como luz transiente, salinidade, desidratação, calor e frio sugerindo seu envolvimento na proteção dos ácidos nucleicos contra ROS (Mowla, 2002).

Visto que a habilidade do ascorbato como doador de elétrons para 1-Cys Prx de plantas e a presença de altos níveis em diferentes compartimentos celulares, sugerem que a redução de sulfênicos por esse antioxidante é relevante biologicamente. Assim, a via ácido sulfênico/ascorbato pode estar envolvida em processos de germinação, desenvolvimento e defesa das plantas contra o estresse. Para melhor explorar essa possibilidade, é fundamental estabelecer os níveis de ascorbato em sementes. 4.2.2 Análise da redução de 2-Cys Prx por ascorbato

4.2.2.1 2-Cys Prx típica de S. cerevisiae (Tsa1)

A partir destas informações, podemos concluir que o ascorbato pode reduzir as 1-Cys Prxs de diferentes organismos com constantes de segunda ordem na escala de 10³ M⁻¹ s⁻¹. Nossa próxima etapa foi explorar quais as características que as 1-Cys possuem quando comparadas as 2-Cys Prx que possibilitam a ocorrência dessa reação. A diferença mais óbvia entre os dois tipos de Prxs é a presença ou ausência da cisteína de resolução (Cys_r). A ausência da Cys_r faz com que a proteína após ser oxidada não forme a ponte dissulfeto, predispondo a redução do ácido sulfênico por ascorbato.

Para testar essa hipótese, nós analisamos se a proteína recombinante 2-Cys Prx de levedura (Tsa1) com substituição da Cys_r por um resíduo de serina (Tsa1-C170S), poderia adquirir atividade dependente de ascorbato, como observado anteriormente por ensaios não quantitativos (Monteiro e col., 2007). Essas proteínas possuem cauda de histidina na porção N-terminal da proteína possui um peso molecular de 23.649 kDa (Figura 37).



Figura 37: Gel desnaturante SDS Page das proteínas 2-Cys Prx de *S. cerevisiae* (Tsa1 e Tsa1-C170S), utilizando DTT como redutor na concentração final de 250 mM.

A proteína sem Cys_r apresentou atividade peroxidase ascorbato dependente com uma constante de $k = 1,1 \pm 0,032 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Figura 38A). Já a proteína Tsa1 não pode ser reduzida por ascorbato devido a formação da ponte de dissulfeto (Figura 38B).

(A)



(B)



Figura 38: Gráfico de segunda ordem obtido por regressão linear dos cursos temporais com diferentes concentrações de (A) Tsa1-C170S-SOH (0-8 μ M) e (B) Tsa1 (0-6 μ M) com concentrações fixas de ascorbato (4 μ M) e DCPIP (44 μ M). Condições experimentais: pH 7,44 ± 0,1, temperatura 25°C. Tampão fosfato de potássio 50 mM contendo NaCl 50mM e DTPA 100 μ M.

A partir destes resultados, a hipótese plausível sobre a interação do ascorbato com as 1-Cys Prxs e não com as 2-Cys Prxs, se deve ao fato que o sítio ativo das 2-Cys Prxs sofrerem mudanças estruturais durante a oxidação (Perkins e col., 2013), favorecendo a rápida formação da ponte dissulfeto. Corroborando com essa idéia, Parsonage e colaboradores (2015), caracterizaram cineticamente esta reação em AhpC mostrando que a redução de H₂O₂ (k_1 = 1,36 x 10⁸ M⁻¹ s⁻¹ – k_{-1} = 53s⁻¹) é seguida de uma rápida geração do ácido sulfênico (620 s⁻¹) e formação da ponte dissulfeto (75 s⁻¹), dificultando a redução deste por ascorbato.

Além disso, a redução das pontes dissulfeto por ascorbato quando comparado com outros redutores das 2-Cys Prx é desfavorável termodinamicamente. Membros da família Trx (Trx2: $E^{\sigma}_{RSSR/RSH}$ -0.221V) e Grx (Grx1: $E^{\sigma}_{RSSR/RSH}$ -0.233V; Grx3: $E^{\sigma}_{RSSR/RSH}$ -0.198V) possuem altos potenciais de redução negativo atuando como eficientes redutores de 2-Cys Prx ($E^{\sigma}_{RSSR/RSH}$ -0.178V) em *E.coli* durante a catálise de peróxidos (Aslund, 1997; El Hajjaji e col., 2009). Em contraste, o ascorbato possui um potencial redox positivo ($E^{\sigma}_{DHA/ASC}$ +0.06 V), sendo uma reação energeticamente não favorável para redução de pontes dissulfetos (Saper e col., 1982).

Até o momento não existem informações sobre potenciais de redução para o par redox sulfênico/tiól. Os sulfênicos são oxidantes moderados e baseado no ΔG° calculado por QM/MM para a oxidação da Cys_p da Prdx5 por H₂O₂ (ΔG° '= -29.7 kcal/mol; Portillo-Ledesma e col., 2014), e utilizando o E° do H₂O₂ ($E^{\circ}_{H2O2/H2O}$ +1.35V) foi possível estimar através da Equação de Nernst, um potencial de redução para o sulfênico/tiól ($E^{\circ}_{SOH/SH}$ +0.71V). O valor obtido indica que as reações de sulfênicos com redutores biológicos tais como tióis ($E^{\circ}_{GSSG/GSH}$ -0.24V) ou ascorbato ($E^{\circ}_{DHA/ASC}$ +0.06V) podem ser termodinamicamente favoráveis. Vale ressaltar que uma reação termodinâmica favorável se torna irrelevante se não for cineticamente competente para a troca de elétrons.

O potencial redox é um parâmetro que está relacionado com a razão das formas oxidadas e reduzidas de um composto em uma situação de equilíbrio. Diferentemente, nas análises cinéticas os substratos estão presentes em concentrações muito mais elevadas que os produtos. Dessa forma, em sistemas biológicos a cinética em geral prevalece sobre a termodinâmica. Assim é fundamental estabelecer a competência cinética para identificar redutores relevantes para uma proteína oxidada (no nosso caso na forma de ácido sulfênico), como estamos descrevendo nesse trabalho. De qualquer forma, neste caso específico, parece que tanto do ponto de vista cinético, como do ponto de vista termodinâmico a redução de acido sulfênico (mas não de dissulfetos) é uma reação termodinamicamente favorável para ocorrer em sistemas biológicos. Porém, é necessário considerar comparativamente também outros redutores como GSH e Trx.

O par redox ácido sulfênico/ascorbato representa ainda um tema de investigação inovador, ainda mais considerando que a família das 1-Cys Prxs é pouco estudada. De acordo com nossos resultados, a habilidade de ascorbato sustentar a atividade peroxidase de 1-Cys Prx parece ser bastante conservada. A partir disso, nosso próximo passo, foi estudar se a redução de ácidos sulfênicos por ascorbato poderia ocorrer em outras proteínas que não pertencem à família Prx e verificar a possibilidade de o ascorbato ser considerado um redutor geral de sulfênicos.

4.2.3 Análise da Redução de Ácidos Sulfênicos em Proteínas que não fazem parte da família Prx

4.2.3.1 Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (GAPDH)

A GAPDH é um tetrâmero com massa molecular de 145 kDa. Cada subunidade contém 331 resíduos com um peso molecular de 36 kDa que trabalham independente uma da outra. É uma enzima da via glicolítica que contém um resíduo de cisteína reativa (Cys 149) que é oxidado a ácido sulfênico (Zhang e col., 2015). É uma enzima bifuncional com atividade desidrogenase e acilfosfatase e é encontrada em altas concentrações em todos os tecidos (aproximadamente 10% das proteínas citoplasmáticas; Schmalhausen, 2003).

Relato antigo descreve que o ascorbato poderia reduzir o ácido sulfênico da GAPDH e assim restaurar sua atividade desidrogenase (You, 1975). Desta maneira, analisamos quantitativamente a redução do ácido sulfênico por ascorbato, empregando o ensaio de competição com DCPIP. O ácido sulfênico foi reduzido com uma constante de segunda ordem de $k = 1,8 \pm 0,014 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Figura 39A), na mesma ordem de grandeza observada para as reduções de 1-Cys Prxs apresentadas anteriormente. Como controle, modificamos quimicamente os resíduos de Cys da GAPDH, utilizando NEM (*N*-etilmaleimida). Como esperado, a reação foi totalmente abolida com a alquilação da GAPDH por NEM (Figura 39B).



Figura 39: Gráfico de segunda ordem obtido por regressão linear dos cursos temporais com diferentes concentrações de (A) GAPDH-SOH (0-5 μ M) e (B) GAPDH-NEM (0-5 μ M) com concentrações fixas de ascorbato (4 μ M) e DCPIP (44 μ M). Condições experimentais: pH 7,44 ± 0,1, temperatura 25 ± 0,1 °C. Tampão fosfato de potássio 50 mM contendo NaCl 50 mM e DTPA 100 μ M.

Desde a publicação de nosso artigo em 2007 (Monteiro e col., 2007), nenhum dado na literatura evidenciava que o ascorbato poderia ser um redutor de sulfênicos. Mais recentemente, Zito e colaboradores (2012) deletaram três genes de proteínas

(B)

envolvidas na oxidação da PDI (ERO1 α , ERO1 β e PRDX4), que são responsáveis pela formação de dissulfetos em proteínas do retículo endoplasmático (RE), e obtiveram evidências de que a redução de ácidos sulfênicos por ascorbato é relevante *in vivo*. De fato, a tripla mutação em camundongos resultou em um atraso na formação de pontes dissulfetos, que por sua vez afetou diversas funções no RE, como a velocidade no enovelamento de proteínas oxidadas, levando a um acúmulo nos níveis gerais de ácido sulfênico.

Aparentemente, esse aumento nos níveis de ácidos sulfênicos no camundongo foi reduzido por ascorbato, diminuindo os níveis dessa vitamina para síntese de colágeno, provocando o desenvolvimento de uma forma não canônica de escorbuto em ratos (Zito e col., 2012). Ainda neste estudo, foi realizado um ensaio cinético *in vitro*, analisando a redução de ácido sulfênico de Papaína por ascorbato (Zito e col., 2012). Essa enzima possui um resíduo de cisteína no sítio ativo que na presença de peróxido forma o ácido sulfênico. A velocidade de consumo do ascorbato foi analisada por sua absorbância a 265 nm, mas nenhum parâmetro quantitativo foi obtido. Além disso, o ensaio descrito apresenta interferência pela absorbância de resíduos aromáticos (como Tyr e Trp) por parte da proteína, dificultando sua análise quantitativa. Portanto, avaliamos pelo ensaio de competição com DCPIP a possível redução da Papaína por ascorbato que será descrito a seguir.

4.2.3.2 Papaína (C. papaya)

A Papaína (E.C. 3.4.22.2) é uma enzima proteolítica isolada da fruta tropical *C. papaya* (mamão), possui massa molecular de 23.406 kDa, a qual possui uma cadeia polipeptídica de 212 resíduos de aminoácidos, composta por dois domínios delimitando uma fenda dentro da qual o substrato pode se ligar (Storer, 1994). Como é conhecido, a atividade das cisteína-peptidases depende da presença no sítio catalítico, de um resíduo de cisteína e outro de histidina. A ordem desses resíduos (Cys/His ou His/Cys) na sequência linear difere entre as famílias de cisteína peptidases. No caso da Papaya, a sequência é Cys/His (Husain, 1968).

A molécula da Papaína contém ao todo 7 resíduos de cisteína, sendo que 6 destes participam de 3 ligações dissulfeto, enquanto a Cys 25 está envolvida no sítio catalítico (Allen, 1973). Por ser uma cisteína-peptidase bastante conhecida decidimos

avaliar a redução da Cys reativa por ascorbato. A constante de segunda ordem obtida com o ensaio de competição foi de $k = 0.8 \pm 0.009 \text{ x } 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Figura 40A). Além disso, a alquilação da Papaína por NEM (Figura 40B), eliminou totalmente a redução do ácido sulfênico por ascorbato.

(A)



(B)



Figura 40: Gráfico de segunda ordem obtido por regressão linear dos cursos temporais com diferentes concentrações de (A) Papaína-SOH (0-8 μ M) e (B) Papaína-NEM (0-6 μ M) com concentrações fixas de ascorbato (4 μ M) e DCPIP (44 μ M). Condições experimentais: pH 7,4 ± 0,1, temperatura 25 ± 0,1 °C. Tampão fosfato de potássio 50 mM contendo NaCl 50 mM e DTPA 100 μ M.

Assim, pela primeira vez foram determinadas as constantes de segunda ordem da redução de diversos ácidos sulfênicos por ascorbato. Além disso, caracterizamos a mutante da Tsa1-C170S, (2-Cys típicas) que pode ser reduzido na ausência da Cys_r, confirmando que essa vitamina especificamente reduz ácido sulfênico, mas não dissulfeto.

Anteriormente, nosso grupo mostrou que a redução de 1-Cys Prx por ascorbato representava uma mudança no paradigma antioxidante tiól específico dessas peroxidases (Monteiro e col., 2007). Para compreender a relevância biológica desse par redox sulfênico/ascorbato, foi fundamental a quantificação cinética desse processo. As constantes descritas nesse trabalho, mostram que os ácidos sulfênicos em 1-Cys Prxs da família Prx6 reagem com ascorbato com constantes de velocidade entre 0,45 to 2,3 x 10^3 M⁻¹ s⁻¹. No entanto, as constantes aqui analisadas são significativamente distintas, apesar de todos se situarem na ordem de grandeza de 10^3 M⁻¹ s⁻¹, sugerindo que fatores bioquímicos e estruturais podem estar envolvidos nesse processo.

Diante destas evidências, somada com abordagens estruturais e computacionais presentes na literatura, podem fornecer *insights* sobre quais fatores poderiam explicar o papel do ascorbato na redução de ácidos sulfênicos. Usando como exemplo, a estrutura de hORF6 (uma 1-Cys Prx humana, cuja estrutura foi descrita por Choi e colaboradores, (1998), vemos que o sítio catalítico é bem fechado, onde a acessibilidade de moléculas pequenas como o ascorbato seria mais favorável.

Outra hipótese é que as 2-Cys Prxs sofrem mudanças conformacionais entre o estado *fully folded* (FF), no qual a Cys_p reage com peróxido alternando para um estado conformacional chamado *locally unfolded* (LU), onde Cys_p se torna exposta facilitando a formação da ponte dissulfeto com a Cys_r (Karplus, 2015). Enquanto as 1-Cys Prxs, manteriam a estrutura secundária durante todo o ciclo catalítico (Gupta, 2014). Além disso, a ausência da Cys_r poderia aumentar a estabilidade do ácido sulfênico, considerando que a presença de um resíduo de carga positiva como a Arg ou His poderia favorecer a interação com as moléculas negativas como o ascorbato (Monteiro e col., 2007; Gupta, 2014). No entanto, outras proteínas como a GAPDH e a Papaína também reagiram com o ascorbato com constantes de velocidade na mesma ordem de grandeza (Tabela 5).

Proteínas utilizadas	Constante de segunda
	ordem (10 ³ M ⁻¹ s ⁻¹)
AfPrxA-SOH	$1,4 \pm 0,079$
Prx1-SOH	$0,4 \pm 0,002$
LsfA-SOH	$2,2 \pm 0,006$
LsfA-C45A	Não reativa
Prdx6	$1,0 \pm 0,027$
TaPER1-SOH	$2,2 \pm 0,007$
TaPER1-C46S	Não reativa
TaPER1-SOH C72S	$1,3 \pm 0,039$
TaPER1-SOH C147S	$2,0 \pm 0,006$
Tsa1-C170S	$1,1 \pm 0,032$
Tsal	Não reativa
GAPDH	$1,8 \pm 0,014$
Papaína	$0,8 \pm 0,009$

Tabela 5: Constante de segunda ordem calculada pelo ensaio de competição entre DCPIP e as proteínas 1-Cys Prx de fungo, planta, bactéria, levedura, mamífero, 2-Cys Prx típica (Tsa1) e GAPDH e Papaína (não pertencente à família Prx).

Desta maneira, analisando as estruturas cristalográficas disponíveis no *Protein Bank Data* da Papaína e GAPDH, observamos que essas enzimas também possuem um resíduo positivo no sítio ativo que forma parte da tríade catalítica, neste caso um resíduo de His. Na Papaína a tríade catalítica é composta por uma His 159, um Asn 175 e a Cys 25. A Asn 175 orienta o anel imidazol da His 159 permitindo que esse aminoácido auxilie na desprotonação da Cys 25 aumentando a reatividade do tiól (Allen, 1973). Já na GAPDH, a His 176 confere a reatividade do grupo tiol presente na Cys 152, possivelmente através da posição de um par iônico com o imidazol presente no resíduo de His 176 (Soukri e col., 1988). Além disso, foi descrito que a presença de outra Cys altamente conservada (Cys 156) que não faz parte do sítio catalítico, é importante para a regulação redox da atividade da GAPDH, causando uma desestabilização de uma ponte de hidrogênio formada entre os resíduos Tyr 314 e Thr 153, tornando a enzima mais resistente a inativação por H₂O₂ (Peralta e col., 2015). Os dados apresentados nessa tese sugerem que o ascorbato pode ser um redutor de amplo espectro para sulfênicos de proteína. Porém, cabe destacar que existe uma única exceção encontrada até agora na literatura: o ácido sulfênico gerado na albumina humana (HSA) não foi reduzido por ascorbato (Turell e col., 2009). A HSA possui apenas um resíduo de cisteína livre, a Cys 34. Os outros 34 resíduos de Cys formam pontes dissulfetos ajudando a manter a estrutura terciária. Além disso, a estrutura têm três grupos polares posicionados perto do centro ativo, sendo um deles uma His 39 dando ao sítio ativo carga positiva que teoricamente poderia ter uma relação favorável com a redução por ascorbato.

Turell e colaboradores (2009), através de um ensaio de competição utilizando tionitrosobenzoato (TNB) que reage com HSA-SOH produzindo um dissulfeto misto HSA-STNB levando a diminuição da absorbância a 412 nm, não observaram a redução do ácido sulfênico por ascorbato. Sabe-se que o HSA-SOH está localizado em uma fenda que pode ser inacessível as moléculas de ascorbato. Tentamos previamente utilizar o ensaio de competição descrito pelo grupo, mas não observamos a redução das 1-Cys Prx por TNB, impossibilitando a execução do experimento. Algum fator como acessibilidade estérica, estabilidade conformacional e dinâmica impossibilitou a interação do TNB com os ácidos sulfênicos das 1-Cys Prxs. Desta maneira, seria interessante quantificar utilizando o ensaio de competição entre R-SOH e DCPIP por ascorbato e avaliar se esse antioxidante reduz HSA.

Como discutido até o momento, nossos resultados representam uma nova descoberta no uso de redutores dessa família de enzimas descritas (Kim e col., 1998). As Prxs são sempre referidas como sendo estritamente dependentes de redutores tiólicos (Rhee, 2005). Nosso trabalho traz uma visão diferente, mostrando que as 1-Cys Prxs e outras proteínas são capazes de usar ascorbato durante o seu ciclo catalítico. A partir destas constantes de velocidade aqui estabelecidas, podemos considerar que a redução dos ácidos sulfênicos por ascorbato é importante para sustentar um ciclo peroxidase competente a nível fisiológico? Para responder esta questão, a importância fisiológica do mecanismo enzimático proposto por nosso grupo pode ser apoiado pelo ascorbato, mas não pode ser determinado apenas a partir de sua eficiência catalítica, mas também da sua concentração. Neste contexto, o papel redutor do ascorbato pode ser considerado relevante em tecidos onde exista grandes quantidades de ascorbato.

Sendo assim, especulamos que a atividade peroxidásica dependente de ascorbato possa estar relacionada a três principais fatores: (I) à manutenção do ácido sulfênico estável como forma oxidada da cisteína peroxidásica das proteínas estudadas; (II) a proteção do sítio ativo que permite somente a entrada de moléculas pequenas por interações assimétricas; (III) aminoácidos com cargas positivas circundando o sítio ativo, já que o ascorbato em pH fisiológico é um ânion. Dessa forma, o estudo da interação ácido sulfênico/ascorbato representa um aspecto importante na bioquímica redox em protéinas dependentes de tiól e se mostra um caminho promissor a se seguir de modo a entender os mecanismos de redução desta família proteica no ponto de vista fisiológico.

Tomando em conjunto os resultados obtidos neste trabalho, essa é a primeira descrição cinética da redução de 1-Cys Prxs de diferentes grupos taxonômicos utilizando o ascorbato como redutor. Estes dados indicam que o ascorbato pode ser considerado um redutor das 1-Cys Prx de *A. fumigatus* (AfPrxA), de *P. aeruginosa* (LsfA), *S. cerevisiae* (Prx1), *T. aestivum* (TaPER1) e *R. novergicus* (Prdx6). Além disso, foi capaz de reduzir os ácidos sulfênicos presentes na GAPDH e Papaína, podendo considerar esse processo relevante fisiologicamente em compartimentos celulares onde a concentração de ascorbato é elevada.

O ensaio de competição utilizando DCPIP e desenvolvido por nosso grupo foi muito útil para caracterização cinética da redução das proteínas por ascorbato, porque durante muitos anos essa caracterização foi bastante complicada até a estabilização deste método. Nesse sentido, as plantas apresentam-se como organismos convenientes para estudos posteriores, uma vez que o ascorbato é um componente muito abundante nesses organismos, atingindo altas concentrações em determinados compartimentos celulares (Smirnoff, 2000). Assim, a interação da família das 1-Cys com ascorbato motiva a continuidade da exploração do papel fisiológico do ascorbato e também qual o mecanismo molecular na função enzimática das 1-Cys Prx e na sua regulação.

- A partir dos estudos de docking realizado em nosso laboratório em colaboração com o grupo da professora Antônia do Amaral indicaram que o ascorbato pode se ligar ao sítio ativo das 1-Cys, mas não das 2-Cys. Com isso foi realizadas as mutantes da Prdx6 dos resíduos que compõem a tríade catalítica, (Prdx6-T44A, Prdx6-C47S, Prdx6-T48A e Prdx6-R132A. Desta maneira, realizaremos os ensaios cinéticos para compreender qual destas etapas do ciclo catalítico (redução/oxidação) esses aminoácidos são importantes para interação sulfênico/ascorbato.
- Determinar os parâmetros cinéticos da 1-Cys Prx de trigo (TaPER1) utilizando NTR e Trxh1 como redutor e comparar com os valores já obtidos para ascorbato para determinar qual o sistema mais relevante para 1-Cys Prx de trigo.
- Analisar a expressão gênica por PCR em tempo real de sementes de trigo em fase de germinação com diferentes tratamentos (H₂O₂, ascorbato, estresse por luz, desidratação), com o intuito de detectar alterações nos níveis de *Per1*.

ABBASI, A.; et al. Circulating peroxiredoxin 4 and type 2 diabetes risk: the Prevention of Renal and Vascular Endstage Disease (PREVEND) study. **Diabet.**, v. 57, p. 1842-1849, 2014.

AFZAL, I.; BASRA, S. M. A.; FAROOQ, M.; NAWAZ, A. Alleviation of salinity stress in spring wheat by hormonal priming with ABA, salicylic acid and ascorbic acid. **Int. J. Agr. Biol.**, v. 8, p. 23-28, 2006.

ALCAIN, F. J.; BURON, M. I. Ascorbate on cell growth and differentiation. J. Bioen. Biomembr., v. 26, p. 393-398, 1994.

ALLEN, G.; LOWE, G. Investigation of the active site of Papain with fluorescent probes. **Biochem. J.**, v. 133, p. 679-686, 1973.

ASLUND, F.; BERNDT, K. D.; HOLMGREN, A. Redox potentials of glutaredoxins and other thiol-disulfide oxidoreductases of the thioredoxin superfamily determined by direct protein-protein redox equilibria. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 30780-86, 1997.

AUSEBEL, F. M.; et al. Curr. Prot. Molec. Biol. Ed. Jonh Wiley & Songs, N. Y., 1987.

AZZOZ, M. Y.; AL-FREDAN M. A. The inductive role of vitamin C and its mode of application on growth, water status, antioxidante enzyme activities and protein patterns of *Vicia faba* L. cv. Hassawi grown under seawater irrigation. **Am. J. Plant Physiol.**, v. 4, p. 38-51, 2009.

BAKER, L. M. S.; POOLE, L. B. Catalytic mechanism of thiol peroxidase from *Escherichia coli*. Sulfenic acid formation and overoxidation of essential CYS61. J. Biol. Chem., v. 278, p. 9203-9211, 2003.

BANG, Y.; et al. Distinct characteristics of two 2-Cys Peroxiredoxins of *Vibrio vulnificus* suggesting differential roles in detoxifying oxidative stress. J. Biol. Chem., v. 287, p. 42516–42524, 2012.

BARH, D.; SRIVASTAVA, H. C.; MAZUMBAR, B. C. Self fruit extract and vitamin-C improves tomato seed germination. J. Appl. Sci. Res., v. 4, p. 156-165, 2008.

BARRANCO-MEDINA, S.; LÁZARO, J. J.; DIETZ, K. J.; The oligomeric conformation of peroxiredoxin links redox state to function. **FEBS Lett.**, v. 583, p. 1809-1816, 2009.

BLACHNITZKY, E, O.; WENGENMAYER, F.; KURZ, GERHART. D-Galactose desydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*. Eur. J. Biochem., v. 47, p. 235-250, 1974.

BEHARY, R. T. Impact of ascorbic acid on seed germination, seedling growth and enzyme activity of salt-stressed Fenugreek. J. Med. Act. Plants. v. 1, p. 106-113, 2012.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER L. Biochemistry. 5th edition. New York: W H Freeman. The Michaelis-Menten Model Accounts for the Kinetic Properties of Many Enzymes. Section 8.4, 2002.

BILLIET, L.; et al. The thermodynamics of thiol sulfenylation. Free Radic. Biol. Med. v. 52, p. 1473-1485, 2012.

BITEAU, B.; LABARRE, J.; TOLEDANO, M. B. ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. **Nature**, v. 425, p. 80–984, 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, v.72, n. 1, p. 248-54, 1976.

BRIEGER, K.; et al. Reactive oxygen species: from health to disease. Swiss Med. Wkly., v. 142, 2012.

BUETTNER, G. R.; SCHAFER, F. Q. Ascorbate (Vitamin C) as an Antioxidant. In Vitamin C: its Functions and Biochemistry in Animals and Plants. Ed. May J. M, Asard H., Smirnoff N. BIOS Scientific Publishers, 2004. p. 173-188.

CAREY, D. J.; TODD, M. S. Schwann cell myelination in a chemically defined medium: demonstration of a requirement for additives that promote Schwann cell extracellular matrix formation. **Brain Res.**, v. 429, p.95-102, 1987.

CARPENTER, K. J. The history of scurvy and vitamin C. Cambridge: Cambridge University Press, 423, 1986.

CARR, A. C.; FREI, B. Does vitamin C act as pro-oxidant under physiological conditions? **FASEB J**., v.13, p. 1007-1024, 1999.

CHA, M. K.; HONG, S. K.; KIM, I. H. Four thiol peroxidases contain a conserved GCT catalytic motif and acts as a versatile array of lipid peroxidases in *Anabaena sp.* PCC7120. Free Rad. Biol. Med., v. 42, p. 1736-1748, 2007.

CHAE, H. Z.; et al. Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 91, p. 7017–7021, 1994a.

CHAE, H. Z.; et al. Thioredoxin-dependent peroxidase reductase from yeast. J. Biol. Chem., v. 269, p. 22670-27678, 1994b.

CHAE, H. Z.; et al. Protein glutathionylation in the regulation of peroxiredoxins: a family of thiol-specific peroxidases that function as antioxidants, molecular chaperones, and signal modulators. **Antiox. Redox Signal.**, v. 16, p. 506-523, 2012.

CHOI, H. J.; et al. Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0. A resolution. **Nat. Struct. Biol.**, v. 5, p. 400-406, 1998.

CHOI, M. H.; et al. Regulation of PDGF signaling and vascular remodeling by peroxiredoxin II. **Nature**, v. 435, p. 347-353, 2005.

COPLEY, S.D.; NOVAK, W.R.P.; BABBITT, P.C. Divergence of Function in the Thioredoxin Fold Suprafamily: Evidence for Evolution of Peroxiredoxins from a Thioredoxin-like Ancestor. **Biochem.**, v. 43, p. 13981-95, 2004.

DALAL, A.; et al. Attenuation of hydrogen peroxide-mediated oxidative stress by Brassica juncea annexin-3 counteracts thiol-specific antioxidante (TSA1) deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett.,** v. 14, p. 584-93, 2014.

DAVEY, M. W.; et al. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. J. Sci. Food Agric., v. 80, p. 825–860, 2000.

DECLERCQ, J. P.; et al. Crystal structure of a human peroxiredoxin 5, a novel type of mammalian peroxiredoxin at 1.5 A resolution. **J. Molec. Biol.**, v. 311, p. 751-759, 2001.

DEMIRKAYA, M; DIETZ, K. J.; SIVRITEPE, H. O. Changes in antioxidant enzymes during ageing of onion seeds. **Not. Bot. Horti Agrob. Cl.,** v. 38, p. 49–52, 2010.

DIETZ, K. J.; JACQUOT, J. P. HARRIS, G. Hubs and bottlenecks in plant molecular signaling networks. **New Phytol.**, v. 188, p. 919–938, 2010.

DIETZ, K. J. Peroxiredoxins in Plants and Cyanobacteria. Antiox. Redox Signal., v. 15, p. 1129–1159, 2011.

DUMBRAVA, V. A.; PALL, M. L. Control of nucleotide and erythroascorbic acid pools by cyclic AMP in *Neurospora crassa*. Biochim. Biophys. Acta, v. 926, p. 331–338, 1987.

ELDRIDGE, C. F. Differentiation of axon-related Schwann cells in vitro. I. Ascorbic acid regulates basal lamina assembly and myelin formation. **J. Cell Biol.,** v. 105, p. 1023-34, 1987.

El HAJJAJI, H.; et al. The zinc center influences the redox and thermodynamic properties of *Escherichia coli* thioredoxin 2. J. Mol. Biol., v. 386, p. 60–71, 2009.

FERREIRA, N.R.; et al. Real time in vivo measurement of ascorbate in the brain using carbon nanotube-modified microelectrodes. **Electroanalysis**. v. 25, p. 1757–1763, 2013.

FERREIRA, N. R.; et al. Coupling of ascorbate and nitric oxide dynamics in vivo in the rat hippocampus upon glutamatergic neuronal stimulation: A novel functional interplay. **Brain Res. Bull.**, v. 114, p. 13-19, 2015.

FERRER-SUETA, G.; et al. Factors affecting protein thiol reactivity and specificity in peroxide reduction. **Chem. Res. Toxicol.,** v. 24, p. 434-50, 2011.

FIGUEROA-MÉNDEZ, R.; RIVAS-ARANCIBIA, S. Vitamin C in Health and Disease: Its Role in the Metabolism of Cells and Redox State in the Brain. **Front. Physiol.**, v. 6, 2015.

FINKEL, T. Redox-dependent signal transduction. FEBES Lett., v. 476, p. 52-54, 2000.

FISHER, A. B.; et al. Phospholipid hydroperoxides are substrates for non-selenium glutathione peroxidase. J. Biol. Chem. v. 274, p. 21326–21334, 1999.

FISHER, A. B. Peroxiredoxin 6: A bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities. **Antiox. Redox Signal.**, v. 15, 2011.

FLOHÉ, L.; HARRIS, J. R. **History of peroxiredoxins and topical perspectives. In Peroxiredoxin Systems: Structure and Function**. (L. Flohe[´] and J. R. Harris, eds.), Springer, New York, 2007, v. 44, p. 1-25.

FLOHÉ, L.; et al. A comparison of thiol peroxidase mechanisms. Antiox. Redox Signal., v.15, p. 763-780, 2011.

FOYER, C. H.; LELANDAIS, M. The roles of ascorbate in the regulation of photosynthesis. In: Yamamoto HY, Smith CM, eds. Photosynthetic responses to the en ironment. Rockville, Maryland: American Soc. Plant Physiol., p. 88–101, 1993.

FOYER, C.; LELANDAIS, M. A comparison of the relative rate s of transport of ascorbate and glucose across the thylakoid, chloroplast and plasmalemma membranes of pea leaf mesophyll cells. **J. Plant. Physiol.**, v. 148, p. 1398, 1996.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. **Antioxid. Redox Signal.,** v.11, p. 861–905, 2009.

FOYER, C. H.; GRAHAM, N. Ascorbate and glutathione: The heart of the redox hub. **Plant Physiol.**, v. 155, p. 2-18, 2011.

FUJII, T.; FUJII, J.; TANIGUCHI, N. Augmented expression of peroxiredoxin VI in rat lung and kidney after birth implies an antioxidative role. **Eur. J. Biochem.,** v. 268, p. 218–225, 2001.

GARRY, P. J.; et al. Automated analysis of plasma and whole blood ascorbic acid. **Clin. Biochem.**, v. 7, p. 131-45, 1974.
GEST, N.; GAUTIER, H.; STEVENS, R. Ascorbate as seen through plant evolution: the rise of a successful molecule. J. Exp. Bot., v. 64, p. 33-53, 2013.

GHAEMMAGHAMI, S.; et al. Global analysis protein expression yeast. Nature, v. 425, p. 737-41, 2003.

GRASSETTI, D. R.; MURRAY JR, J. F. The use of 2,2'-dithiodipyridine in the determination of glutathione and of triphosphopyridine nucleotide by enzymatic cycling. **Anal. Biochem.**, v. 21, p. 427-434, 1967.

GRATÃO, P.L.; et al. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Func. Plant Biol.**, v. 32, p. 481-494, 2005.

GREETHAM, D.; GRANT, C. M. Antioxidant activity of the yeast mitochondrial one-cys peroxiredoxin is dependent on thioredoxin reductase and gluthatione in vivo. **Molec. Cel. Biol.**, v. 29, p. 3229-3240, 2009.

GUPTA, V.; CARROLL, K. S. Sulfenic acid chemistry, detection and cellular lifetime. **Biochim. Biophys. Acta,** v. 1840, p. 847-875, 2014.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. Free Rad. Biol. Med., Nova York: Oxford University Press, v.1, 2007. 851p.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. **Nut. Rev.**, v. 70, p. 257–265, 2012.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox: Less paradoxical now? Brit. J. Clin. Pharm., v. 75, p. 637–644, 2013.

HALL, A.; KARPLUS, P.A.; POOLE, L.B. Typical 2-Cys peroxiredoxins – structures, mechanisms and functions. **FEBS J.**, v. 276, p. 2469–77, 2009.

HALL, A.; et al. Structural evidence that peroxiredoxin catalytic power is based on transition-state stabilization. J. Mol. Biol., v. 402, p. 194-209, 2010.

HALL, A.; et al. Structure-based insights into the catalytic power and conformational dextery of peroxiredoxins. **Antiox. Redox Signal.,** v. 15, p. 795-815, 2011.

HAMPTON, M. B.; O'Connor, K. M. Peroxiredoxins and the regulation of the Death. **Mol. Cells**, v. 39, p. 72-76, 2016.

HANCOCK, R. D.; GALPIN, J. R. VIOLA, R. Biosynthesis of L-ascorbic acid (vitamin C) by *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Lett.,** v. 186, p. 245–250, 2000.

HANSCHMANN, E. M.; et al. Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins. Molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 19, p. 1539-1605, 2013.

HANSEN, R. E.; et al. Quantification of proteína thiols and dithiols in the picomolar range using sodium borohydride and 4,4' dithiodipyridine. **Annal Biochem.,** v. 363, p. 77-82, 2007.

HOFMANN, B.; HECHT, H.J.; FLOHÉ, L. Peroxiredoxins. **Biol. Chem.,** v. 383, p. 347-364, 2002.

HORTA, B. B.; et al. Structural and Biochemical Characterization of Peroxiredoxin $Q\beta$ from *Xylella Fastidiosa* Catalytic Mechanism and High Reactivity. J. Biol. Chem., v. 285, p. 16051–16065, 2010.

HUGO, M.; et al. Thiol and sulfenic acid oxidation of AhpE, the one-cysteine peroxiredoxin from *Mycobacterium tubercolisis*: kinetics, acidity constants, and conformational dynamics. **Biochem.**, v. 13, p. 9416-26, 2009.

HUH, W. K.; et al. D-Erythorbic acid is an important antioxidant molecule in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Microbiol., v. 30, p. 895–903, 1998.

HUH, W.; et al. Deficiency of D- erythroascorbic acid attenuates hyphal growth and virulence of *Candida albicans*. **Infect. Immun**., v. 69, p. 3939–3946, 2001.

HUSAIN, S. S.; LOWE, G. Evidence for histidine in the active site of papain. Biochem. J., v. 108, p. 855-859, 1968.

IAKOUBOVA, O. A.; et al. LTW4 protein on mouse chromosome 1 is a member of a family of antioxidant proteins. **Genom.**, v. 42, p. 474–478, 1997.

IRWIN, M. E.; RIVERA-DEL VALLE, N.; CHANDRA, J. Redox control of leukemia: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities **Antioxid. Redox Signal.**, v. 18, p. 1349-1383, 2013.

ISHII, T.; WARABI, E.; YANAGAWA, T. Novel roles of peroxiredoxins in inflammation, cancer and innate immunity. **J Clin. Biochem. Nutr.,** v. 50, p. 91–105, 2012.

IVANOV, V. O.; IVANOVA, S. V.; NIEDZWECKI, A. Ascorbate affects proliferation of guinea-pig vascular smooth muscle cells by direct and extracellular matrix-mediated effects. J. Mol. Cell. Cardiol., v. 29, p. 3293-3303, 1997.

JACOBSON, F. S.; et al. An alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium* involved in the defense of DNA against oxidative damage. Purification and properties. **J. Biol. Chem.** v. 264, p. 1488–1496, 1989.

JANG, H. H.; et al. Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. **Cell**, v. 117, p. 625-635, 2004.

JENG, M.F.; et al. High-resolution solution structures of oxidized and reduced *Escherichia coli* thioredoxin. **Structure**, v. 2, p. 853-68, 1994.

JENNEY, F. E.; et al. Anaerobic microbes: oxygen detoxification without superoxide dismutase. **Sci.**, v. 286, p. 306–309, 1999.

JEONG, W.; CHA, M. K.; KIM, I. H. Thioredoxin-dependent hydroperoxide peroxidase activity of bacterioferritin comigratory protein (BCP) as a new member of the thiol-specific antioxidant protein (TSA)/Alkyl hydroperoxide peroxidase C (AhpC) family. J. Biol. Chem., v. 275, p. 2924-2930, 2000.

JIMÉNEZ, A.; et al. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. **Plant Physiol.**, v. 114, p. 275-84, 1997.

KAIHAMI, G. et al. Involvement of a 1-Cys Peroxiredoxin in Bacterial Virulence. **PLoS Path.**, v. 10, p. 1004442, 2014.

KARAYANNIS, M. I. Comparative kinetic study for rate constant determination of the reaction of ascorbic acid with with 2,6-dichlorophenolindophenol. **Talanta**, v. 23, p. 27-30, 1976.

KARPLUS, P.A.; HALL, A. Structural survey of the peroxiredoxins. Subcell. Biochem., v. 44, p. 41-60, 2007.

KARPLUS, P. A primer on peroxiredoxin biochemistry. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 80, p. 183-190, 2015.

KEATES, S. E.; et al. 5-O-(-D-galactopyranosyl)-D-glycero-pent-2-eono-1,4-lactone: Characterization in the oxalate-producing fungus, *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytochem.**, v. 49, p. 2397–2401, 1998.

KEMBRO, J. M.; et al. Integrating mitochondrial energetics, redox and ROS metabolic networks: a two-compartiment model. **Bioph. J.**, v. 104, p. 332-343, 2013.

KIM, K.; et al. The isolation and purification of a specific protector protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe (III)/ O_2 mixed-function oxidation system. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 4704-4711, 1988.

KIM, S. T.; et al. D-arabinose dehydrogenase and biosynthesis of erythroascorbic acid in *Candida albicans*. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1297, p. 1-8, 1996.

KIM, T. S et al. Identification of a human cDNA clone for lysosomal type Ca2pindependent phospholipase A2 and properties of the expressed protein. J. Biol. Chem., v. 272, p. 2542–2550, 1997.

KIM, T. S.; et al. Cloning and expression of rat lung acidic Ca (2^+) -independent PLA₂ and its organ distribution. **Am. J. Physiol.**, v. 274, p. 750–761, 1998.

KIM, S.; et al. D-Arabinose dehydrogenase and its gene from *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta, v. 1429, p. 29–39, 1998b.

KIM, J. H.; et al. Up-regulation of peroxiredoxin 1 in lung cancer and its implication as a prognostic and therapeutic target. **Clin. Cancer Res.**, v. 14, p. 2326–2333, 2008.

KIM, S.Y.; et al. Oligomerization and chaperone activity of a plant 2-Cys peroxiredoxin in response to oxidative stress. **Plant Science**, v. 177, p. 227–232, 2009.

KINNULA, V. L.; Overexpression of peroxiredoxins I, II, III, V and VI in malignat mesothelioma. **J. Pathol.**, v. 196, p. 316-33, 2002.

KNÖNIG, J.; et al. The conformation bases for the two funcionalities of 2-cysteine peroxiredoxin as peroxidase and chaperone. **J. Exp. Bot.**, p. 1-15, 2013.

KNOOPS, B.; LOUMAYE, E.; VAN DER EECKEN, V. Evolution of the peroxiredoxin. **Subcell. Biochem.** v. 44, p. 27-40, 2007.

KONG, W.; et al. A novel peroxiredoxin of the plant Sedum lineare is a homologue of *Escherichia coli* bacterioferritin co-migratory protein (Bcp). **Biochem. J.**, v. 351, p. 107-114, 2000.

KOSOWER, N. S.; et al. Bimane fluorescent labels: labeling of normal human red cells under physiological conditions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.76, p. 3382-3386, 1979.

LEE, T. H.; et al. Characterization of the murine gene encoding 1-Cys peroxiredoxin and identification of highly homologous genes. **Gene**, v. 234, p. 337–344, 1999.

LEE, K. O.; et al. Rice 1Cys-peroxiredoxin over-expressed in transgenic tobacco does not maintain dormancy but enhances antioxidant activity. **FEBS Lett.,** v. 486, p. 103–106, 2000.

LEVINE, M.; PADAYATTY, S. J.; ESPEY, M. G. Vitamin C: A concentrationfunction approach yields pharmacology and therapeutic discoveries. **Adv. Nutr**. v. 2, p. 78-88, 2011.

LI, S. et al. Crystal Structure of AhpE from *Mycobacterium tuberculosis*, a 1-Cys peroxiredoxin. J. Mol. Biol., v. 346, p. 1035–1046, 2005.

LI, Y.; SCHELLHORN, H. B. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. J. Nutr., v. 137, p. 2171-84, 2007.

LI, L.; et al. Binding and uptake of H-ferritin are mediated by human transferrin receptor-1. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 107, p. 3505-3510, 2010.

LIND, J. A. **Treatise on the scurvy**, ed. C.P. Stewart and D. Guthrie. Edinburgh: Edinburgh University Press, 1953.

LINDBLAD, M.; TVEDEN-NYBORG, P.; LYKKESFELDT, J. Regulation of Vitamin C Homeostasis during Deficiency. Nutrients, v. 5, n. 8, 2013.

LINSTER, C. L.; SCHAFTINGEN. Vitamin C: Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. FEBS J. v. 274, p. 1-22, 2007.

LISO, R.; et al. Localization of ascorbic acid, ascorbic acid oxidase, and glutathione in roots of *Cucurbita maxima* L. J. Exp. Bot., v. 55, p. 2589–2597, 2004.

LIU, G.; et al. Comparison of glutathione peroxidase 1 and peroxiredoxin 6 in protection against oxidative stress in the mouse lung. **Free Radic. Biol. Med.,** v. 49, p. 1172–1181, 2010.

LOEWUS, F. A.; et al. Conversion of D-arabinose to D- erythroascorbic acid and oxalic acid in *Sclerotinia sclerotiorum*. Biochem. Biophys. Res. Comm. v. 212, p. 196–203, 1995.

LOWTHER, W. T.; HAYNES, A. C. Reduction of cysteine sulfinic acid in eukaryotic, typical 2-Cys peroxiredoxins by sulfiredoxin. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 15, p. 99–109, 2011.

MAILLOUX, R. J.; TREBERG, J. R. Protein Sglutathionlyation links energy metabolism to redox signaling in mitochondria. **Redox Biol.**, v. 8, p. 110-118, 2016.

MANELA-AZULAY, M.; et al. Vitamina C. An. Bras. Dermatol., v. 78, p. 265-272, 2003.

MANEVICH, Y.; FEINSTEIN, S.I.; FISHER, A.B. Activation of the antioxidant enzyme 1-Cys peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with GST. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.101, p. 3780–3785, 2004.

MANEVICH, Y.; FISHER, A. B. Peroxiredoxin 6, 1-Cys Prx, functions in antioxidant defense and lung phospholipid metabolism. **Free Rad. Biol. Med.,** v. 38, p. 1422-1432, 2005.

MANEVICH, Y.; et al. Binding of peroxiredoxin 6 to substrate determines differential phospholipid hydroperoxide peroxidase and phospholipase $A_{(2)}$ activities. **Arch. Biochem. Biophys.,** v. 485, p. 139–149, 2009.

MARSELLA, R.; et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. J. Nutr. Biochem., v.16, p. 577–586, 2005.

MAY, J. M. Ascorbate function and metabolism in the human erythrocyte. **Frontiers Biosc.**, v. 2, p. 1-10, 1998.

MAYES, P.A. **Estrutura e função das vitaminas hidrossolúveis**. In: MURRAY, R. K., GRANNER, D.K., MAYES, P.A. Harper: bioquímica. 9.ed. São Paulo: Atheneu, 1999, p. 582-596.

MENDES, P. Biochemistry by numbers: simulation of biochemical pathways with Gepasi 3. **Trends Biochem. Sci.**, v. 22, p. 361-3, 1997.

MIZOHATA, E.; et al. Crystal structure of an archaeal peroxiredoxin from the aerobic hyperthermophilic crenarchaeon *Aeropyrum pernix* k1. J. Molec. Biol., v. 354, p. 317-329, 2005.

MO, Y.; et al 1-Cys peroxiredoxin knock-out mice express mRNA but not protein for a highly related intronless gene. **FEBS Lett.**, v. 555, p. 192–198, 2003.

MONTEIRO, G.; et al. Reduction of 1-Cys peroxiredoxin by ascorbato changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C. **Proc.** Natl. Acad. Sci. USA, v. 20, p. 4886-91, 2007.

MOWLA, S. B.; et al. A novel stress-inducible antioxidant enzyme identified from the resurrection plant Xerophyta viscosa Baker. **Planta**, v. 2, p. 716-26, 2002.

NATHAN, C.; CUNNIGHAN-BUSSEL, A. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 13, p. 349-61, 2013.

NEAL, M. J.; CUNNINGHAM, J. R.; MATTHEWS, K. L. Release of endogenous ascorbic acid preserves extracellular dopamine in the mammalian retina. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.,** v. 40, p. 2983-2987, 1999.

NELSON, K. J.; et al. Cysteine pka values for the bacterial peroxiredoxin AhpC. **Biochem.**, v. 47, p. 12860-12868, 2008.

NELSON, K. et al. Analysis of the peroxiredoxin family : Using active-site structure and sequence information for global classification and residue analysis. **Proteins**, v. 79, p. 947-964, 2011.

NETTO, L. E.S.; et al. Removal of hydrogen peroxide is involved with the antioxidant properties of Thiol Specific Antioxidant (TSA). TSA possesses thiol peroxidase activity. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 15315-21, 1996.

NETTO, L. S. E.; et al. Reactive cysteine in proteins: Protein, folding, antioxidant, defense, redox signaling and more. **Comp. Biochem. Physiol.,** v. 146, p. 180-193, 2007.

NICK, J. A.; LEUNG, C.T.; LOEWUS, F. A. Isolation and identification of erythroascorbic acid in *Saccharomyces cerevisiae* and *Lipomyces starkeyi*. **Plant Sci.**, v. 46, p. 181–187, 1986.

NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. Annu Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol., v. 49, p. 249–279, 1998.

NOCTOR, G. Metabolic signaling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples. **Plant Cell. Environ.**, v. 29, p. 409–425, 2006.

NOGOCEKE, E.; et al. A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothionemediated peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata*. **Biol. Chem.,** v. 378, p. 827– 836, 1997. OGUSUCU, R.; et al. Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: rate constants by competitive kinetics. Free Radic. Biol. Med., v. 42, p. 326-34, 2007.

OKAMURA, M. Distribution of ascorbic acid analogs and associated glycosides in mushrooms. J. Nutr. Sci. Vitaminol., v. 40, p. 81–94, 1994.

OKAMURA, M. Separative determination of ascorbic acid analogs contained in mushrooms by high-performance liquid chromatography. J. Nutr. Sci. Vitaminol., v. 44, p. 25–35, 1998.

PAN, J. L.; BARDWELL, J. C. A. The origami of thioredoxin-like folds. **Protein** Sci., v. 15, 2217-2227, 2006.

PAN, Y.; JIN, J.H.; WANG, J. Significant Enhancement of hPrx1 Chaperone Activity through Lysine Acetylation. **Chem. Biochem.**, v. 15, p. 1773-76, 2014.

PARSONAGE, D. et al. Dissecting Peroxiredoxin Catalysis: Separating Binding, Peroxidation, and Resolution for a Bacterial AhpC. **Biochem.**, v. 54, n. 7, p. 1567-1575, 2015.

PEDRAJAS, J.R.; et al. Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain oneconserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity. J. Biol. Chem., v. 275, p. 16296-301, 2000.

PEDRAJAS, J. R.; et al. Glutaredoxin participates in the reduction of peroxides by the mitochondrial 1-Cys Peroxiredoxin in *Saccharomyces cerevisiae*. Antiox. Redox Signal., v. 13, p. 249-258, 2010.

PERALTA, D.; et al. A proton relay enhances H_2O_2 sensitivity of GAPDH to facilitate metabolic adaptation. Nat. Chem. Biol., p. 1-8, 2015.

PERKINS, A.; et al. The Sensitive Balance between the Fully Folded and Locally Unfolded Conformations of a Model Peroxiredoxin. **Biochem.**, v. 52, n. 48, p. 8708-8721, 2013.

PERKINS, A.; POOLE, L.; KARPLUS, P. Tuning of Peroxiredoxin Catalysis for Various Physiological Roles. **Biochem.**, v. 53, p. 7693-7705, 2014.

PERKINS, A.; et al. Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. **Trends Biochem. Sci.,** v. 40, p. 435-45, 2015.

PESHENKO, I. V; et al. Identification of a 28 kDa secretory protein from rat olfactory epithelium as a thiol-specific antioxidant. **Free Radic. Biol. Med.,** v. 25, p. 654– 659, 1998.

PESHENKO, I. V.; SINGH, A. K.; SHICHI, H. Bovine eye 1-Cys peroxiredoxin: expression in *E. coli* and antioxidant properties. **J. Ocul. Pharmacol. Ther.,** v. 17, p. 93-99, 2001.

PESKIN, A. V.; et al. The high reactivity of peroxiredoxin 2 with H2O2 is not reflected in its reaction with other oxidants and thiol reagents. J. Biol. Chem., v. 16, p. 11885-92, 2007.

PHANIEDNDRA, A.; JESTADI, D. B.; PERIYASAMY, L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. Indian J. Clin. Biochem., v. 30, p. 11–26, 2014.

PO, H. N.; SENOZAN, N. M. Henderson-Hasselbalch equation: Its history and limitations. J. Chem. Edu., v. 78, p. 1499-1503, 2001.

POOLE, L.B.; NELSON, K. J. Discovering mechanisms of signaling-mediated cysteine oxidation. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 12, p. 18-24, 2008.

POOLE, L. The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. Free Rad. Biol. Med., v. 80, p. 148-157, 2015.

PORTILLO-LEDESMA, S.; et al. Deconstructing the catalytic efficiency of peroxiredoxin-5 peroxidatic cysteine. **Biochem.**, v. 53, p. 6113-6125, 2014.

PULIDO, P.; CAZALIS, R.; CEJUDO, F. An antioxidant redox system in the nucleus of wheat seed cells suffering oxidative stress. **Plant J.**, v. 57, p. 132-145, 2009.

QIU, W.; et al. Crystal structures from the Plasmodium peroxiredoxins: new insights into oligomerization and product binding. **BMC Struct. Biol.**, v. 12, 2012.

RAO, T. S.; KALE, N. R.; DALVI, S.P. Kinetics and mechanism of the oxidation of L-ascorbic acid by 2,6-dichlorophenol-indophenol in aqueous solution. **Reac. Kinet. Catal. Letters.** v. 34, p. 179-184, 1987.

RAUTENKRANZ, A. A. F.; et al. Transport of ascorbic and dehydroascorbic acid s across protoplast and vacuole membranes isolated from barley *(Hordeum vulgare* cv. Gerb il) leaves. **Plant Physiol.** v. 106, p. 187-193, 1994.

REDDIE, K.; CARROLL, K. Expanding the functional diversity of proteins through cysteine oxidation. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 12, p. 746-54, 2008.

REBEC, G. V.; PIERCE, R.C. A vitamin neuromodulator: ascorbate release into the extracellular fluid of the brain regulates dopaminergic and glutamatergic transmission. **Prog. Neurobiol.**, v. 43, p. 537-65, 1994.

REED, T. T.; et al. Proteomic identification of nitrated brain proteins in early Alzheimer's disease inferior parietal lobule. J. Cel. Molec. Med., v. 13, p. 2019–2029, 2009.

REEVES, S. A.; et al. Kinetic and thermodynamic features reveal that *Escherichia coli* BCP is an unusually versatile peroxiredoxin. **Biochem.**, v. 50, p. 8970–8981, 2011.

RHEE, S.G.; CHAE, H.Z.; KIM, K. Peroxiredoxins: A historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. **Free Radic. Biol. Med.,** v. 38, p. 1543–1552, 2005.

RICE, M. E. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. **Trends** Neurosci., v.23, p. 209-216, 2000.

RICHELLE, M.; SABATIER, M.; STEILING, H.; WILLIAMSON, G. Skin bioavailability of dietary vitamin E, carotenoids, polyphenols, vitamin C, zin and selenium. **Br. J. Nutr.**, v. 96, p. 227–238, 2006.

RIQUIER, S.; et al. Peroxiredoxin post-translation modifications by redox messengers. **Redox Biol**. v. 2, p. 777-785, 2014.

ROOS, G.; FOLOPPE, N.; MESSENS, J. Understanding the pK_a of redox cysteines: the key role of hydrogen bonding, **Antioxid. Redox Signal**. v.18, p. 94–127, 2013.

ROUHIER, N.; JACQUOUT, J. P. The plant multigenic family of thiol peroxidases. **FRBM**. v. 38, p. 1413-21, 2005.

SAIKUMARI, Y.; et al. Binding sites for interaction of peroxiredoxin 6 with surfactant protein A. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1864, p. 419-425, 2016.

SAPER, H.; et al. The reversibility of the vitamin C redox system: Eletrochemical reasons and biological aspects. v. 37, p. 942-946, 1982.

SARDI, F.; et al. Determination of acidity and nucleophilicity in thiols by reaction with monobromobimane and fluorescence detection. **Anal. Biochem.**, v. 435, p. 74-82, 2013.

SARMA, G. N.; et al. Crystal structure of a novel *Plasmodium falciparum* 1-Cys peroxiredoxin. J. Molec. Biol., v. 346, p. 1021-1034, 2005.

SAUBERLICH, H. E. Pharmacology of vitamin C. Annu. Rev. Nutr. v. 14, p. 371–391, 1994.

SCHMALHAUSEN, E. V.; PLETEN, A. P.; MUNORETZ, V.I. Ascorbate-induced oxidation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Biochem. Biophys. Res.** Commun., v. 308, p. 492-496, 2003.

SCHRÖDER, E.; PONTING, C. P. Evidence that peroxiredoxins are novel members of the thioredoxin fold superfamily. **Prot. Sci.,** v. 7, p. 2465-2468, 1998.

SCHRÖDER, E.; LITTLECHILD, J. A.; LEBEDEV; et al. Crystal structure of decameric 2-Cys peroxiredoxin from human erythrocytes at 1.7 a resolution. **Struct.**, v. 8, p. 605-15, 2000.

SEGEL, I. H. Enzyme Kinetics. Edition Published 1993, 957p.

SHARMAN, I. M. Vitamin C: Historical aspects, in Vitamin C, Recent Aspects of its Physiological and Technological Importance. Editors: Halsted Press Book, Wiley:New York.1-15, 1974.

SHICHITA, T.; et al. Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. **Nat. Med.**, v.18, p. 911–917, 2012.

SINGH, A.; SHICHI, H. A novel glutathione peroxidase in bovine eye. J. Biol. Chem., v. 273, p. 26171–26178, 1998.

SMIRNOFF, N. Acid ascorbic: metabolism and functions of a multi-facetted molecule. **Phys. Metab.**, v. 3, p. 229-235, 2000.

SMINORFF, N. L-Ascorbic acid biosynthesis. Vitamins Hormones, v. 61, p. 241–265, 2001.

SMIRNOFF, N. Vitamin C: the metabolism and functions of ascorbic acid in plants. Adv. Bot. Res., v. 59, p. 107–177, 2011.

SOITO, L. et al. PREX: PeroxiRedoxin classification indEX, a database of subfamily assignments across the diverse peroxiredoxin family. **Nucleic Acids Res.**, v. 39, p. 332-337, 2011.

SOUKRI, A. et al. Role of Histidine 176 residue in Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as probed by site-directed mutagenesis. **Biochem**, v. 28, p. 2586-2592, 1988.

SPICKETT, C. M.; SMIRNOFF, N.; PITT, A. R. The biosynthesis of erythroascorbate in *Saccharomyces cerevisiae* and its role as an antioxidant. Free Rad. Biol. Med., v. 2, p. 183-92, 2000.

STACY, R. A. P.; et al. A peroxiredoxin antioxidant is encoded by a dormancyrelated gene, *Per1*, expressed during late development in the aleurone and embryo of barley grains. **Plant Mol. Biol.**, v. 31, p. 1205-1216, 1996.

STACY, R. A. P.; et al. The dormancy-related peroxiredoxin anti-oxidant, PER1, is localized to the nucleus of barley embryo and aleurone cells. **Plant J.**, v. 19, p. 1-8, 1999.

STORER, A. C.; MÉNARD, R. Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidase. **Methods Enzymol.**, v. 244, p. 486-500, 1994.

STUHLMEIER, K. et al. Antioxidant protein 2 prevents methemoglobin formation in erythrocyte hemolysates. **Eur. J. Biochem.** v. 270, p. 334-341, 2003.

SZARKA, A.; BÁNHEGYI, G.; ASARD, H. The inter-relationship of ascorbate trasnport, metabolism and mitochondrial, plastidic respiration. Antioxid. Redox Signal., v. 20, p. 1036-1044, 2013.

SZENT-GYORGY A. Vitamin C. J Biol. Chem., v. 22, p. 1387-1409, 1928.

SZENT-GYORGY A. Lost in the twentieth century. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 32, p. 1-14, 1963.

TAIRUM, J.; et al. Dissulfide biochemistry in 2-Cys peroxiredoxin: requirement of Glu50 and Arg146 for the reduction of yeat Tsa1 by thioredoxin. J. Molec. Biol., v. 424, p. 28-41, 2012.

TRUJILLO, M.; et al. **Peroxiredoxin Systems**. Eds. Flohé, L. & Harris, J. R. v. 44, p.83–113. Springer Netherlands, 2007a.

TRUJILLO, M. et al. Pre-steady state kinetic characterization of human peroxiredoxin 5: Taking advantage of Trp84 fluorescence increase upon oxidation. **Arch. Biochem. Bioph.,** v. 467, p. 95-106, 2007b.

TRUJILLO, M.; et al. Pre-steady state kinetic characterization of human peroxiredoxin 5: Taking advantage of Trp84 fluorescence increase upon oxidation. **Arch. Biochem. Bioph.,** v. 467, p. 95–106, 2008.

TURRELL, L.; et al. Oxidation of the albumin thiol to sulfenic acid and its implications in the intravascular compartment. **Braz. J. Med. Biol. Res.,** v. 42, p. 305-311, 2009.

TURRENS, J. Mitochondria. Ed. S. Schaffer and M.S. Suleiman, Springer, New York. v. 2, p. 185, 2007.

VOET, D.; VOET, J.G. Fundamentals of Biochemistry. 3rd; Ed. John Wiley & Sons, 2004, 1264p.

WAUGH, W. A.; KING, C. G. Isolation and identification of vitamin C. J. Biol. Chem., v.197, p. 325-31, 1932.

WELCH, R. W.; et al. Ascorbic acid accumulation and transport in human ibroblasts. J. Biol. Chem., v. 294, p. 505-10, 1993.

WILSON, J. X. Regulation of vitamin C transport. Annu. Rev. Nutr., v. 25, p. 105-25, 2005.

WINTERBOURN, C. C.; HAMPTON, M. B. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. Free Radic. Biol. Med., v.1, p. 549-61, 2008.

WINTERBOURN, C.; HAMPTON, M. Redox biology: Signaling via a peroxiredoxin sensor. **Nature Chem. Biol.**, v. 11, p. 5-6, 2015.

WOLUCKA, B. A. Biosynthesis of D-arabinose in mycobacteria - A novel bacterial pathway with implications for antimycobacterial therapy. **FEBS**, J., v. 275, p. 2691–2711. 2008.

WOO, H. A.; et al. Reversing the Inactivation of Peroxiredoxins Caused by Cysteine Sulfinic Acid Formation. **Science**, v. 300, p. 653–656, 2003.

WOO, H. A.; et al. Reduction of cysteine sulfinic acid by sufiredoxin is specific to 2-Cys Peroxiredoxins. J. Biol. Chem., v. 280, p. 3125-3128, 2005.

WOO, H. A.; et al. Inactivation of peroxiredoxin I by phosphorylation allows localized H_2O_2 accumulation for cell signaling. Cell, v. 140, p. 517-28, 2010.

WOOD, Z.A.; POOLE, L.B.; KARPLUS, P.A. Peroxiredoxin Evolution and the Regulation of Hydrogen Peroxide Signaling. **Science**, v. 300, p. 650-653, 2003.

YIN, H.; XU, L.; PORTER, N. A. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. **Chem. Rev.**, v. 111, p. 5944-72, 2011.

YOSHIDA, Y.; et al. Hydroxyoctadecadienoic acid and oxidatively modified peroxiredoxins in the blood of Alzheimer's disease patients and their potential as biomarkers. **Neurob. Aging,** v. 30, p. 174–185, 2009.

YOU, K.; et al. The conversion of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase to an acylphosphatase by trinitroglycerin and inactivation of this activity by azide and ascorbate. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 384, p. 317-330, 1975.

YUAN, Y.; et al. Conformation and oligomeric effects on the cysteine pka of typaredoxin peroxidase. J. Biomol. Struct. Dyn., v. 28, p. 51-70, 2010.

ZECHMANN, B. Subcellular distribution of ascorbate in plants. **Plant Signal Behav**. v. 6, p. 360–363, 2011.

ZECHMANN, B.; STUMPE, M.; MAUCH, F. Immunocytochemical determination of the subcellular distribution of ascorbate in plants. **Planta**, v. 233, p. 1-12, 2011b.

ZECHMANN, B. Compartment-specific importance of glutathione during abiotic and biotic stress. **Front. Plant Sci.,** v. 5, 2014.

ZHANG, Z.; et al. The ascorbate transporter of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.,** v. 185, p. 2243–2250, 2003.

ZHANG, Y. Biological role of ascorbate in plants. In: Ascorbic Acid in Plants. Biotynthesis, Regulation and Enhancement. Springer, New York, p. 7-33, 2013.

ZHANG, J. Y.; et al. Critical protein GAPDH and its regulatory mechanisms in cancer cells. **Cancer Biol. Med.**, v.12, p. 10-22, 2015.

ZHOU, S.; et al. Functional interaction of Glutathione S-Transferase pi and Peroxirredoxin 6 in intact cells. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 45, p. 401-4017, 2013.

ZITO, E.; et al. Endoplasmic reticulum thiol oxidase deficiency leads to ascorbic acid depletion and noncanonical scurvy in mice. **Mol. Cell.**, v. 48, p. 39-51, 2012.

Anexo 1

Considerações teóricas sobre o ensaio de competição entre DCPIP e Ácidos sulfênicos Os experimentos de competição entre DCPIP, AfPrxA-SOH por ascorbato seguiram condições de pseudo-primeira ordem, como será demonstrado a seguir. Em geral, se assume que a concentração de um dos reagentes deve estar dez vezes ou mais em excesso para condições de pseudo-primeira ordem. No caso de DCPIP (45 μ M) e ascorbato (4 μ M); essa regra se aplica. No caso de AfPrxASOH, algumas considerações são necessárias. Na verdade, em condição de pseudo-primeira ordem, um dos reagentes (no caso AfPrxA-SOH) é essencialmente constante no curso da reação.

Considerando os valores obtidos nessa tese, temos:

$$\frac{k_1[\text{DCPIP}]}{k_2[\text{AfPrxA-SOH}]} = \frac{[\text{P}_1]_{\infty}}{[\text{P}_2]_{\infty}}$$

Sendo, $k_1 = 718 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ e} k_2 = 1400 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (1)

As concentrações iniciais utilizadas foram:

$$[Asc]_0 = 4 \ \mu M \ e \ [DCPIP]_0 = 45 \ \mu M$$

Como ascorbato é o reagente limitante, no final da reação, temos:

$$[P_1]_{\infty} + [P_2]_{\infty} = 4 \ \mu M \tag{2}$$

E pela conservação de massas, temos que

 $[P_2]_{\infty} = [AfPrxA-SOH]_0 - [AfPrxA-SOH]_{\infty}$

Isto significa que o quanto se forma de P_2 será o mesmo que foi consumido de AfPrxA-SOH e com isso podemos avaliar se [AfPrxA-SOH] realmente se mantém "essencialmente constante".

Quando $[AfPrxA-SOH]_0 = 0$, $[Prx1SOH]_0$ é constante e igual a zero.

Quando $[Prx1SOH]_0 = 2 \mu M$, aparentemente não estaria em condições de pseudoprimeira ordem, no entanto vamos calcular o quanto de AfPrxA-SOH é consumido:

Segundo a equação 1, substituindo os valores temos:

$$\frac{718 \times 45 \times 10^{-6}}{1400 \times 2 \times 10^{-6}} = \frac{[P_1]_{\infty}}{[P_2]_{\infty}} = 11,53$$

 $11,53[P_2]_{\infty} = [P_1]_{\infty}$

Substituindo na equação 2 e analisando P2 temos:

 $\begin{array}{l} 11,\!53[P_2]_{\infty}+[P_2]_{\infty}=4\;\mu M\\ [P_2]_{\infty}=4/(11,\!53\!+\!1)\;\mu M=0,\!32\;\mu M \end{array}$

No final da reação, permanece 1,68 μ M de AfPrxA-SOH, ou seja, 85,5% da concentração inicial. Se realizamos os mesmos cálculos para a concentração máxima de AfPrxA-SOH utilizada, temos:

$$\frac{718 \times 45 \times 10^{-6}}{1400 \times 9,5 \times 10^{-6}} = \frac{[P_1]_{\infty}}{[P_2]_{\infty}} = 2,42$$

2,42 $[P_2]_{\infty} = [P_1]_{\infty}$
2,42 $[P_2]_{\infty} + [P_2]_{\infty} = 4 \ \mu M$
 $[P_2]_{\infty} = 4/(2,42+1) \ \mu M = 1,16 \ \mu M$

No final da reação permanece 8.34 µM de AfPrxA-SOH, ou seja, 87,78% da concentração inicial de AfPrxA-SOH adicionada na reação permancendo constante.

Dessa forma, podemos considerar que as condições experimentais empregadas eram de pseudo-primeira ordem.

Anexo 2

Atividades realizadas durante estágio sanduíche relacionadas a essa tese.

Instituto de Bioquímica Vegetal e Fotossíntese Departamento de Bioquímica Vegetal e Biología Molecular Universidade de Sevilha - CSIC

Investigação da relevância biológica de sistemas redutores de 1-Cys Peroxirredoxinas de plantas.

> Ciências sem Fronteiras CNPq/Processo nº 202718/2015-8

Supervisor: Luis E. S. Netto.

Pesquisador Visitante Especial: Francisco Javier Cejudo

Período: 01/09/2015 a 29/02/2016

1.1 Estrutura e composição química da semente de trigo

Os cereais representam um grupo de plantas cultivadas mais importantes e entre eles, o arroz e o trigo são a base da alimentação de grande parte da humanidade (Higgins, 1984). A semente de trigo é composta por uma monocapa chamada de aleurona que se origina pela diferenciação das células do endospermo (Hoseney, 1986). A aleurona é relativamente rica em aminoácidos, carboidratos de reserva, principalmente sacarose, ácidos ribonucleicos, proteínas e vitaminas (Bewley, 1994; Hemdane e col., 2016). Na aleurona todo está disposto para permitir uma rápida proliferação do sistema de membranas intracelulares e da maquinaria de biossíntese de proteínas, para a síntese de enzimas hidrolíticas no começo da germinação (Hoseney, 1986).

Outra parte importante é o escutelo que está localizado na semente entre o endospermo de reserva e o embrião. O epitélio escutelar possui características estruturais das células de aleurona e contém corpos proteicos especializados, análogos aos grãos de aleurona, rodeados por corpos lipídicos (Hemdane e col., 2016). Além disso, se encontram as mitocôndrias, ribossomos livres, um núcleo central e o retículo endoplasmático. Este conteúdo celular rico em vitaminas e altos níveis de sacarose, fazem com que seja possível que estas células possam iniciar rapidamente a fase germinativa (Bewley, 1994)

Cabe enfatizar que as células de aleurona e escutelo são essenciais para o início da germinação (Bewley, 1994). Já o endospermo constitui a maior parte do volume do grão, e está formado por células mortas no grão maduro que armazenam os nutrientes necessários durante a germinação, para manter o crescimento da nova plântula até que esta seja autótrofa. O amido presente encontra-se embebido em uma matriz de proteínas de reserva (Hemdane e col., 2016).

O ciclo de vida do cereal pode ser dividido em duas fases: desenvolvimento e germinação (Wojtyla e col., 2016). Desenvolvimento é iniciado pela fertilização, no qual produz um embrião diplóide e um endosperma triplóide (Olsen, 2004). Após o período de crescimento onde todas as sementes e tecidos estão diferenciados, as sementes alcançam tamanho máximo e no final do estágio terminam a maturação

consistindo em uma perda massiva de água para produzir a semente madura (Olsen, 2004).



Figura 1: Morfologia da semente de trigo (*Triticum aestivum*). No corte longitudinal observamos uma fina camada chamada aleurona que recobre o endospermo de reserva que se origina pela diferenciação das células do presentes no endospermo. O escutelo se localiza entre o endospermo de reserva e o embrião. O coleóptilo que dá origem a primeira folha e a radícula ou raízes temporais se produz nas primeiras 24 de germinação (Retirado de http://www.seedbiology.de/leubner.asp)

A segunda fase, a germinação das sementes é uma das etapas mais importantes do ciclo de vida da planta (Wojtyla e col., 2016). A germinação é um processo muito complexo que inicia com a absorção de água (embebimento) e envolve eventos associados à transição de uma semente seca em repouso para um estado metabolicamente ativo (Dominguez e col., 1998; Young, 1999-2000). A progressão eficiente da germinação determina a natureza do estabelecimento de plântulas e o bom desenvolvimento das plantas maduras (Weibrecht, 2011). O surgimento do eixo embrionário, através das estruturas que rodeiam o embrião é considerado como uma fase final de germinação (Wojtyla e col., 2016).

Os processos-chave associados a germinação envolve a reativação do metabolismo, a retomada da respiração celular, a biogênese das mitocôndrias, reparo do DNA, a tradução e/ou degradação de mRNAs armazenados, a transcrição e tradução de novos mRNAs e o início da mobilização de reservas (Bewley e col., 2013; Bentsik, 2008). Esses eventos celulares estão acompanhados pela formação de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), que são geradas como subprodutos do

metabolismo celular, e são conhecidas por produzir modificações oxidativas em proteínas, alterando a sua atividade ou aumentando a sua susceptibilidade à agregação e degradação (Sevilla, 2015; Sies, 2015).

Particularmente em plantas, os principais processos que levam à produção de H_2O_2 envolvem a fotorrespiração, incluindo cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (Miller col., 2010). Destes, a cadeia de transporte elétrons da mitocôndria, do cloroplasto e a oxidação de ácidos graxos na matriz mitocondrial desempenham um papel importante na contribuição do *pool* de H_2O_2 intracelular. Além disso, infecções patogênicas também podem induzir a um estresse levando a um *burst* oxidativo (Miller e col., 2010).

A acumulação de H_2O_2 tem sido identificado na fisiologia de sementes durante a embebição e nas fases iniciais de germinação (Kubala e col., 2015). O controle dos níveis de H_2O_2 se deve portanto, ser firmemente exercido por um sistema antioxidante protetor. As proteínas que possuem um grupamento tiólico funcional, são altamente eficientes na remoção de H_2O_2 como catalases, glutationas peroxidases e as Peroxirredoxinas (Prxs) (Winterbourn, 2015). Nosso estudo está centrado na compreensão da função biológica destas peroxidases dependente de tióis e baseadas em resíduos de cisteínas, neste caso as Prxs presente em sementes de trigo no processo de germinação.

1.2 Peroxirredoxinas em plantas

Com base na análise de todo o genoma de plantas, a composição de suas subunidades, a posição e o número dos resíduos de cisteínas conservados, as Prx podem ser organizadas em quatro subclasses distintas: 1-Cys Prx, 2-Cys Prx, PrxII e PrxQ (Dietz e col., 2002; Rouhier, 2002).

A primeira classe foi uma 1-Cys Prx identificada em plantas e descrita em cevada. É expressa na capa de aleurona e no embrião durante o desenvolvimento das sementes (Aalen e col., 1994), e contém apenas uma cisteína catalítica conservada chamada de cisteína peroxidásica (Cys_p) (Haslekas e col., 1998; Mowla e col., 2002; Stacy e col., 1996) com localização nuclear (Stacy e col., 1999), embora a 1-Cys Prx de *Arabidopsis* (AtPER1) também foi localizada no citoplasma (Haslekas e col., 2003).

A segunda subclasse chamada de 2-Cys Prx, foi primeiramente clonada em cevada e espinafre (Baier e, 1996), podendo gerar uma ponte dissulfeto quando se encontra na forma oxidada entre a Cys_p e a cisteína de resolução (Cys_r) (Goyer e col., 2002; König e col., 2002). A terceira classe definida como Prx II, contém dois resíduos de cisteínas catalíticos e foi primeiramente identificada em *Brassica campestris* (Choi e col., 1999). A quarta subclasse constituída pelas PrxQ foi reportada pela primeira vez em *Sedum lineare*. Possui função na forma monomérica formando um dissulfeto intramolecular entre as Cys_p e a Cys_r (Kong e col., 2000).

Em plantas, as Prx são codificadas por um família de genes composto de ao menos nove membros (Dietz, 2003). O genoma da *A. thaliana* codifica para dez Prx (Rouhier, 2005), no qual estão localizadas em diferentes compartimentos celulares. As 2-Cys Prxs (presente em duas isoformas como 2-Cys Prx A e B em *A. thaliana*) essencialmente contém na região N-terminal uma localização importante de endereçamento para o cloroplasto. (Baier, 1997). Parecidas com 2-Cys Prx, as PrxQ também possui no N-terminal uma extensão com uma sequência de endereçamento para o cloroplasto (Dietz, 2003a; Petersson, 2006).

A subclasse de Prx II constitui a maior subclasse em *A. thaliana* com cinco genes identificados (Prx II B-F; Prx II B, PrxII C e Prx II D), e estão localizadas no citosol, plastídeo e mitocôndria (Dietz e col., 2002; Brehelin e col., 2003; Dietz, 2003a; Finkemeier e col., 2005; Konig e col., 2003; Kruft e col., 2001).

Dependendo das diferentes subclasses das Prx, diferentes redutores são responsáveis pela regeneração durante o ciclo catalítico que incluem NADPH ou NADH e diferentes proteínas como as Tiorredoxinas (Trx), Glutarredoxinas (Grx), Ciclofilinas e as Proteínas 32 cloroplastídicas induzidas por estresse (CDSP32), Tiorredoxina redutase dependente de NADPH e a subunidade F da alquil hidroperóxido redutase (Broin, 2003; Chae e col., 1994; Chevallet e col., 2003; Collin e col., 2003; Finkemeier e col., 2005; Laxa e col., 2007; Lee e col., 2001; Perez-Ruiz e col., 2006; Rouhier e col., 2001). Em 2007, nosso grupo descreveu que o ascorbato pode doar elétrons para regenerar a forma reduzida das 1-Cys Prxs (Monteiro e col., 2007).

As Prxs também estão sujeitas à variação significativa entre espécies de plantas. Por exemplo, a *A. thailiana* expressa dois genes da 2-Cys Prx com alta similaridade denominados *At*-2-CysPrxA e *At*-2-CysPrxB e três Prx II citosólicas

(PrxIIB, PrxIIC e PrxIID; Dietz, 2011). O pequeno genoma de *P. marinus* só codifica para três Prx, qualquer uma 2-Cys Prx, PrxQ e Prx II, ou uma 2-Cys Prx e duas PrxQ. Enquanto no genoma de *N. punctiforme* contém sete genes de Prx (Dietz, 2011). A evolução da família das Prxs mostra uma tendência ao aumento do número de membros em organismos com genomas maiores, que coincidem com uma organização mais complexa e a capacidade de fotossíntese aeróbica (Dietz, 2011).

2.1 Objetivo Geral

O doutorado sanduíche realizado no período de seis meses na Universidad de Sevilla sob orientação do professor Dr. Francisco Javier Cejudo Fernandez através do programa - Ciências sem Fronteiras – processo nº : 202718/2015-8 teve como objetivo o de investigar o padrão de expressão da 1-Cys Prx de *T. aestivum* (TaPER1) na germinação de sementes em sob condições de estresse gerado por H_2O_2 .

2.2 Objetivo específico

Avaliar a expressão de PER1 a níveis de mRNA e proteína (TaPER1) durante a germinação das sementes de trigo após tratamento com diferentes concentrações de H_2O_2 , utilizando as técnicas de PCR em tempo real e Western Blot.

3.1 Material vegetal

Neste trabalho, foram utilizadas sementes de trigo hexaplóide (*Triticum aestivum* cv. Soisson) como modelo fornecido pela empresa Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA). O trigo é um cereal de clima temperado que pertence a família das Poaceae (gramíneas), subfamília Pooideae, tribo Triticaceae.

3.2 Esterilização das sementes

As sementes foram esterilizadas incubando em NaOCl 3% (v/v) durante 20 - 30 min. Posteriormente, as sementes foram lavadas duas vezes com água destilada estéril e lavadas uma vez com HCl 0,01M estéril e finalmente foi realizado 5 lavagens com água destilada estéril (Abdul-Baki, 1974), afim de eliminar todo o excesso de HCL.

3.3 Germinação de sementes de trigo

Uma vez esterilizadas, as sementes foram incubadas em Placas de Petri e separadas em diferentes grupos de acordo com o tratamento aplicado. As placas controle, o papel de filtro foi umedecido com água destilada e as outras placas foram adicionadas H₂O₂ nas concentrações finais de (0,1 mM; 0,5 mM; 1 mM e 2,5 mM) onde a concentraçõo de H₂O₂ foi determinada espectrofotometricamente (ϵ_{240nm} = 43.6 M⁻¹ cm⁻¹). As placas foram incubadas em temperatura ambiente (22-25°C) durante 48 horas e foram envoltas em papel alumínio para evitar a decomposição do H₂O₂.

3.4 Dissecção dos tecidos das sementes.

A própria anatomia da semente permite o isolamento de seus distintos tecidos por dissecção manual com bisturi. Nas sementes germinadas, é possível isolar o escutelo - disco que conecta os meristemas com o endosperma na zona de reserva, e a partir de 48 horas de germinação isolar a monocapa de aleurona. A radícula e o coleóptilo que é considerada a primeira folha que emerge durante a germinação também foram separados.

3.5 Preparação e análises de proteínas

3.5.1 Extração totais de proteínas

Para a obtenção dos distintos extratos proteicos, aproximadamente 0,5 gramas do material vegetal foi previamente triturado com morteiro/pistilo na presença de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino onde foi adicionado buffer de extração de proteínas que contem Tris-HCl 50 mM pH 7,9 MgCl₂ 10 mM, EDTA 1 mM, glicerol 20% (v/v) e 2-mercaptoetanol 14 mM (condições redutoras), suplementados com uma mistura de inibidores de proteases (Sigma) a 5% (v/v). As amostras foram centrifugadas a 15000 x *g* durante 20 minutos a 4°C e o sobrenadante que continha a fração de proteínas solúveis, foi utilizado para avaliar a expressão de proteína total. As concentrações de proteínas mensuradas pelo método desenvolvido por Bradford (1976). Além disso, as proteínas para *Western blot* foram aliquotadas e processadas no momento da extração.

3.5.2 Gel SDS-Page

A expressão de TaPER1 foi avaliada nos tecidos: radícula, coleóptilo, escutelo e aleurona. 2ug de cada fração solúvel de proteína foi diluída em tampão de amostra (Tris-HCl 50 mM pH 7,9 MgCl₂ 10 mM, EDTA 1 mM, glicerol 20%, 0,1% de azul de bromofenol (p/v) acrescido de 100 mM de ditiotreitol e em seguida aquecidas a 95 °C por 5 minutos. As amostras foram aplicadas em SDS-PAGE (4% gel de empacotamento e 14% gel de resolução) em condições redutoras. O tampão de corrida utilizado foi: Tris-glicina 1x (Tris-HCl 25 mM, glicina 250 mM e 0,1% SDS). As condições da corrida foram: voltagem entre 70-120V, corrente 110-120 mA, 60-120 minutos.

3.5.3 Transferências de proteínas a membrana (Western blot)

Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose Hybond-C Extra (*Amersham Biosciences*). A transferência foi realizada em um aparelho semi-seco (semi-dry, Thermo Scientific) com o auxílio do tampão de transferência (Tris-HCl 48 mM pH 8,3; glicina 39 mM; SDS 0,037 % (p/v) e metanol 20% v/v) com voltagem fixa de 25 V por 60 min.

Após a transferência, as membranas de nitrocelulose foram coradas com Ponceau para visualização de bandas e em seguida lavadas 2 vezes com TBS (Tris-HCl 50 mM pH 7,5 contendo NaCl 150 mM) acrescido de 0,1% (v/v) de detergente tween (TBST) por 30 min em cada lavagem. Posteriormente, as membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado (p/v) em TBST por 60 min e incubadas com os anticorpos primários diluídos em TBS.

Os anticorpos anti-PER1, anti-H3 (*Agrisera*) foram diluídos 1:1000, 1:1500, respectivamente. Após incubação *overnight* com os anticorpos primários a 4 °C sob agitação, as membranas foram lavadas 2 vezes em TBS-T por 30 min cada lavagem, e incubadas com o anticorpo secundário anti-HRP (1:25000) em TBS por 60 min e as lavagens descritas anteriormente foram repetidas. Os sinais foram visualizados com quimiluminescência aumentada (ECL) usando o *ImmobilonTM Western Chemiluminescent HRP Substrate reagent* (Millipore) no equipamento ChemiDoc XRS da Bio-Rad. As intensidades das bandas foram analisadas no programa Image J. A intensidade das bandas de TaPER1 foi normalizada pela intensidade de histona – H3.

3.6 Preparação e análises de RNA

3.6.1 Extração de RNA, purificação e tratamento com DNases

Para aleurona, a extração de RNA total foi realizada pelo método descrito por Baulcombe e Buffard (1983). As amostras foram submetidas 3 vezes à extração com fenol:clorofórmio. Para esse tecido em particular, esse método foi utilizado devido ao amido presente nas sementes causar interferências na extração quando utilizado o reagente TRIzol. O conteúdo de RNA total na fase aquosa da última extração foi precipitado com etanol absoluto refrigerado e posterior incubação a -20 °C durante 60 min. Posteriormente, foi centrifugado a 2500 x g durante 10 minutos e obtido um precipitado que continha o RNA. O precipitado foi ressuspendido em 1mL de H₂O-DEPC (dietilpirocarbonato), e novamente ressuspendido em uma concentração de LiCl 3M com uma incubação de 60 min em gelo seguido de uma centrifugação por 10 minutos a 15000 x g. O precipitado foi lavado com etanol a 70% e ressuspendido em 200 uL de H₂O-DEPC.

Para radícula, coleóptilo e escutelo o isolamento do RNA total foi realizado utilizando TRIzol (*Life Technologies*) de acordo com o protocolo do fabricante, e o RNA total foi eluído em um volume de 20 uL de H₂O-DEPC (*Invitrogen*). Para garantir a ausência de DNA genômico nuclear ou mitocondrial contaminantes, os RNA totais foram submetidos a uma etapa de tratamento com RNase-free DNase I (*Life Technologies*), uma endonuclease não específica utilizada para eliminar contaminação de DNA genômico.

3.6.2 Quantificação e análise da integridade do RNA total

Para avaliar a integridade do RNA, 1ug de RNA total foi aplicado mediante eletroforese em gel de agarose 1,5% em buffer TBE 1x (Tris base 40 mM; 40 mM ácido acético 40 mM; EDTA 1 mM). Quando o RNA não estava degradado ou não possuía rastros abaixo das bandas (que indicam degradação) ou rastros superiores (contaminação por DNA genômico), era possível observar duas bandas bem definidas correspondente ao RNA ribossomal. Posteriormente, as amostras de RNA eram quantificadas por sua densidade óptica a 260nm, e sua pureza atestada pela razão 260/280nm. As medidas foram realizadas no espectrofotômetro NanoDrop (*Thermo Scientific*).

3.6.3 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizado com 1 ug de RNA total usando *Maxima first* strand CDNA synthesis kit (Thermo Scientific) de acordo com as instruções do fabricante. Após sintetizados, os cDNA foram armazenados a -20 °C. 3.6.4 Desenho de oligonucleotídeos (primers)

Os primers utilizados para PCR em tempo real foram desenhados no programa *Perlprimer Express* v 1.1.21, de acordo com os parâmetros padrão, e estão descritos na Tabela 1.

3.6.5 PCR em tempo real

As amostras foram avaliadas pela técnica de PCR em tempo real, realizada em placas de 96 poços vedadas com selos ópticos. As condições de volume e concentração dos reagentes foram: SYBR[®] Green PCR Master Mix (SYBR Green I, AmpliTaq Gold[®] DNA polimerase, dNTP 10mM, tampão otimizados – *Applied Biosystems*) acrescido de MgCl₂ 25 mM (*Invitrogen*) e cDNA molde em um total de 20 uL por reação em triplicatas. As amplificações foram padronizadas no sistema sistema IQ5 real-time PCR *detection system* (*Bio-Rad*) e as análises foram realizadas no software que acompanha o equipamento (*iQ5 Optical System Software* v2.1).

As amplificações foram conduzidas em uma desnaturação inicial a 95 °C por 3 minutos, seguida por amplificação com 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 10 segundos, anelamento a 60 °C por 1minuto, e extensão a 72 °C por 15 segundos, seguido por uma curva de dissociação - ou de *melting* – de 60 a 90°C, com incremento de 5°C a cada medida de fluorescência. Todos os experimentos incluíram controle negativo (água, sem DNA molde), e a eficiência de amplificação de cada par de iniciadores foi determinada pela curva de eficiência com 6 diluições seriadas do *pool* de cDNA das amostras de tecidos utilizadas, sendo nas diluições 1:2,5; 1:10; 1:40; 1:160; 1:2560 (v/v).

A análise da curva de eficiência da diluição serial do *pool* de cDNA das amostras, além de determinar a eficiência dos *primers* também serviu como referencial para se estabelecer o *threshold*, que é desejável que seja similar ao do gene de interesse. O coeficiente R² resultante foi considerado ideal com valores acima de 90%; o valor de inclinação de reta entre -3,1 e -3,6 foi considerado ideal. A eficiência (E) ideal possui um valor aproximado de 2, ou seja, 100% (Figura 2).



Figura 2: Dados originais do aparelho IQ5 real-time PCR detection system (Bio-Rad) mostrando a análise da curva de eficiência da diluição seriada do *pool* de cDNA (direita) e o *threshold* do controle endógeno *CYP18*.

O gene alvo estudado foi PER1 que codifica para a proteína 1-Cys Prx de trigo (TaPER1). Para controle endógeno, foram selecionados 4 genes de referência potencialmente ideais para a normalização da expressão gênica (Vandesompele e col., 2002). Os genes estudados estão descritos na Tabela 1 e a estabilidade da expressão de cada gene foi calculada pelo programa *GeNorm* v. 3.5.

O software *GeNorm* v. 3.5, é um aplicativo para o software Microsoft Excel que determina o gene mais estável de controle interno em uma série de genes testados, em uma determinada amostra de cDNA. Este programa calcula um fator de normalização de expressão do gene para cada amostra de tecido baseado em uma média geométrica dos genes de controle internos definidos pelo usuário (Vandesompele e col., 2002). *GeNorm* calcula a estabilidade da expressão do gene (denominado de M). O M é calculado como a média da variação entre um gene particular e os outros genes controles analisados.

O programa permite eliminar o pior escore do gene de controle interno (que é aquele com o valor de M mais alto) e recalcular um novo valor de M com os genes restantes (Vandesompele, e col., 2002). A comparação dos padrões de expressão do gene alvo e o gene constitutivo com maior o menor estabilidade foi realizada através do C_T comparativo já descrito (Livak e Schmittgen, 2001).

Gene	Gene Bank Nº.	Nome do primer	Sequência DNA (5' – 3')
PER1	AY304482.1	PER1 – Fw	CGAGGCCAAGAAGATGTTCC
		PER1 – Rv	TAGACCTTGGTGAAGCGGAG
CYP18-2	AY456122.1	CYP18 – Fw	CGTCAAGAACATCGAGAAGGTG
		CYP18 – Rv	CGATGACGACTTGCTTGGAG
TaFNR11	AJ457980.1	FNRII – Fw	AGTGATCTTCACTTCTGAACCC
		FNRII – Rv	CTGCTCCAACTTCCTCTGTG
ACT2	TC234027	ACT2 – Fw	CAAATCATGTTTGAGACCTTCAA
		ACT2 – Rv	ACCAGAATCCAACACGATACCTG
rrn26 gene for rRNA large sub. 26S (Z11889.1)	AL827977.1	RNA26s – Fw	TTCACGTGTGAACCGAAGTC
		RNA26s – Rv	AGGCGAGGACTGAAATGAGA

Tabela 1: Sequências de oligonucleotídeos testados e utilizados na PCR em tempo real.

3.6.6 Análises Estatísticas

Os níveis de expressão do gene PER1 foram expressos como médias mais desvio padrão, e apresentadas como as médias aritméticas acompanhadas de seus respectivos intervalos de confiança (IC) em nível de 95%. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas com análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey-Kramer, quando indicado. Teste *t* de Student não-pareado foi empregado quando necessário. Valores de *p* menores que 5% foram considerados indicativos de significância. A análise estatística foi realizada através do software GraphPad Prism versão 5 (GraphPad Software[®]).

4.1 Análise do padrão de expressão da TaPER1 por *Western Blot* em sementes de trigo durante a germinação.

Nas análises de *Western Blot* de extratos provenientes de sementes germinadas por 48 horas, o anticorpo foi diluído em 1:1000, sendo detectada com bastante eficiência a proteína TaPER1 nos tecidos analisados (Figura 3). A primeira Prx caracterizada em plantas foi a PER1, uma 1-Cys Prx de sementes que se localiza no núcleo das células do embrião e na capa de aleurona de sementes de cevada (Stacy e col., 1996-1999). Estudos evidenciaram, que o gene PER1 se expressava somente em sementes (Stacy e col., 1996; Haslekas e col., 1998). No entanto, o anticorpo também detectou a proteína em raíz e coleóptilo (Figura 3).



Figura 3: Análise da expressão de TaPER1 por *Western Blot* em diferentes tecidos de trigo. Para o ensaio foi utilizado anticorpo anti-TaPER1. O gel foi carregado com 10ug/ml de proteína total em cada poço.

Diante deste resultado positivo, decidimos investigar o efeito do H_2O_2 na expressão de TaPER1 durante o processo de germinação. As sementes foram tratadas com diferentes concentrações de H_2O_2 por 48 horas. O H_2O_2 foi previamente quantificado (ε_{240nm} = 43.6 M⁻¹ cm⁻¹) e adicionado em papel filtro esterilizado onde estavam as sementes semeadas de acordo com a concentração de H_2O_2 desejada. As placas controles foram tratados com água destilada no volume final de 2mL. Após 48 horas, as sementes estavam germinadas como mostra a Figura 4.



Figura 4: Placas germinadas após 48 horas tratadas com diferentes concentrações de $H_2O_2(0,1; 0,5; 1 e 2,5mM)$. A placa controle foi tratada com água destilada estéril no mesmo volume final. As placas ficaram em temperatura ambiente e foram protegidas em papel alumínio para evitar a decomposição do H_2O_2 .

O tratamento com H_2O_2 induziu alterações fenotípicas nas sementes (Figura 5), de forma dose-dependente, o que pode estar relacionado com o fato de esse oxidante possuir uma função de sinalização e comunicação celular (Laer e Dick, 2016), entre outras propriedades devido a sua grande habilidade de difusão intracelular. Em níveis mais elevados de H_2O_2 geralmente resultam em toxicidade para a membrana celular entre outros danos para as células vegetais (Mittler e col., 2004; Kathiresan e col., 2006). O H_2O_2 foi frequentemente reconhecido como uma das principais fontes de deterioração das sementes associado com uma perda de vigor das sementes e como repercussão do envelhecimento (Kumar e col., 2015).

Um estudo comparativo sobre a absorção de água, sua distribuição e a associação com a produção de H_2O_2 , foi conduzido em referência a embebição e germinação de sementes de *Pisum sativum* (Wojtyla e col., 2006). O H_2O_2 pode induzir alterações pré-germinativas, que geralmente têm efeitos sobre a taxa de germinação de sementes e uniformidade, crescimento de raíz e desenvolvimento, especificamente sob condições estressantes (Parera e Cantliffe, 1991; Ashraf e Foolad, 2005).



Figura 5: Sementes germinadas após 48 horas tratadas com diferentes concentrações de H_2O_2 . A primeira semente é a controle e as demais estão em ordem crescente de tratamento com H_2O_2 (0,1; 0,5; 1 e 2,5mM). As concentrações utilizadas de H_2O_2 foram as mesmas descritas anteriormente.

Desta maneira, decidimos analisar o padrão de expressão de TaPER1 a níveis de mRNA e proteína durante a germinação de sementes após o tratamento com H₂O₂. Posterior ao tratamento, dissecamos a radícula e o coleóptilo e posteriormente separamos o escutelo da capa de aleurona. Nas análises de *Western Blot* dos extratos proteicos obtidos a partir da radícula, foi observado um aumento de 1 vez na expressão de TaPER1 do grupo tratado com 2,5 mM de H₂O₂ (1,64 ± 0,11 vs 2,57 ± 0,02) quando comparado ao grupo controle, mas a diferença não foi considerada significativa de acordo com o teste estatístico aplicado (Figura 6A). Em coleóptilo, o tratamento com 2,5 mM de H₂O₂, elevou a expressão de TaPER1 (1,49 ± 0,35 vs 2,98 ± 0,40) (p<0.05) quando comparado ao controle (Figura 6B).

(B)



(A)

controle.

Figura 6: Ativação de TaPER1 em resposta ao tratamento com H₂O₂. Após 48 horas de tratamento com diferentes concentrações de H₂O₂, os tecidos foram dissecados e avaliou-se por meio de *Western Blot*, a expressão de TaPER1 em radícula (A) e coleóptilo (B). As densitometrias para radícula (C) e coleóptilo (D) foram determinadas no programa Image J (https://imagej.nih.gov/ij/). Os valores de TaPER1 foram normalizados pelos valores de Histona-H3. Valores representados como média ± desvio padrão (n=3). A diferença estatística foi simbolizada por * (p<0.05), em comparação ao grupo

Esse resultado sugere que o H_2O_2 induz a expressão de TaPER1 na radícula e coleóptilo. Já os níveis de expressão de TaPER1 em escutelo e aleurona se mantiveram praticamente constantes durante todo o experimento (Figura 7A e Figura

140



7B), podendo se deduzir que o escutelo e a aleurona são mais tolerantes ao tratamento com H_2O_2 .

A 7: Ativação de TaPER1 em resposta ao tratamento com H_2O_2 . Após 48 horas de tratamento com diferentes concentrações de H_2O_2 , os tecidos foram dissecados e avaliou-se por meio de *Western Blot*, a expressão de TaPER1 em escutelo (A) e aleurona (B). As densitometrias para escutelo (C) e aleurona (D) foram determinadas no programa Image J. Os valores de TaPER1 foram normalizados pelos valores de Histona-H3. Valores representados como média \pm desvio padrão (n=3).

4.2 Análise da expressão gênica de Per1 por PCR em tempo real.

Mecanismos que regulam a síntese, processamento, transporte, tradução e estabilidade dos mRNAs são pontos críticos no funcionamento celular. Portanto, medir a determinação dos níveis de mRNA pode fornecer uma visão mais precisa da expressão do gene. Por isso, decidimos analisar o padrão de expressão durante a fase de germinação do gene PER1 através da técnica de PCR em tempo real. Essa técnica apresenta alta sensibilidade, mas necessita a normalização dos dados para se obter uma correta interpretação dos resultados obtidos (Huggett e col., 2005).

Os genes de referência ou normalizadores apropriados para análise da expressão gênica na germinação das sementes testadas foram descritos na Tabela 1.

Inicialmente, testamos no software todos os 4 genes endógenos, em todos os tratamentos e condições utilizadas nesse experimento. Após plotar todos os dados no software *GeNorm* v. 3.5, calculou-se o valor de M e o programa apontou qual o gene mais estável, ou seja, que possui o valor de M mais baixo. O gene CYP18 codificador da proteína ciclofilina A foi considerado mais estável de acordo com o programa.

De acordo com os resultados obtidos por PCR em tempo real, o tratamento com H_2O_2 induziu a expressão significativa gene PER1 em radícula nas concentrações de 1mM (p<0.01) e 2,5mM (p<0.001) quando comparado com o controle (Figura 8A). Também, observamos um aumento significativo deste transcrito primário em coleóptilo no tratamento com 2,5mM de H_2O_2 (p<0,001), quando comparado ao controle. (Figura 8B).



Figura 8: PCR em tempo real mostrando os níveis de expressão do gene PER1 em radícula (A) e coleóptilo (B) após tratamento com H₂O₂ por 48 horas. Os valores de PER1 foram normalizados pelos valores de CYP-18. Valores representados como média $\pm e.p.m$ (n=3). A diferença estatística foi simbolizada por ** (p<0,01) e *** (p<0,001), em comparação ao grupo controle.

Particularmente se destacou a presença de PER1 em escutelo e aleurona em todos os grupos tratados com H_2O_2 por 48 horas comparados ao controle. Nossos resultados indicam que a transcrição de PER1 foi muito aumentada sob estresse gerado em sementes de trigo após tratamento com H_2O_2 , durante a germinação, indicando que o H_2O_2 foi o fator responsável na indução da expressão do gene PER1 (Figura 9A, 9B).



Figura 9: PCR em tempo real mostrando os níveis de expressão do gene PER1 em escutelo (A) e aleurona (B) após tratamento com H_2O_2 por 48 horas. Os valores de PER1 foram normalizados pelos valores de CYP-18. Valores representados como média \pm desvio padrão (n=3). A diferença estatística foi simbolizada por *(p<0,05); ** (p<0,01) e *** (p<0,001), em comparação ao grupo controle.
Plantas dependem de uma rápida regulação na expressão de determinados genes para uma adaptação a condições de estresse. A germinação de sementes é uma fase bastante sensível de um ciclo de vida das plantas, particularmente por estar na presença de um ambiente estressante. É influenciada por uma série de fatores genéticos e ambientais que interagem para maximizar a possibilidade de longo prazo de sobrevivência das sementes (Koornneef, 2002).

Sabe-se que, várias etapas do processo de germinação, tais como a dessecação e a embebição, estão relacionadas com a formação de ROS. O H_2O_2 tem um papel crucial como molécula sinalizadora em vários processos fisiológicos (He, 2009; Laer e Dick, 2016), regulando diretamente a expressão de numerosos genes envolvidos na defesa das plantas e vias relacionadas, tais como enzimas antioxidantes, proteínas de defesa e fatores de transcrição (Kovtun e col., 2000; Robert, 2004; Hung, 2005). Esta condição podem alertar moléculas sensores que transmitem o sinal ligando-se a um efetor tais como, elementos responsivos localizados no DNA, permitindo assim a expressão do gene (Sevilla, 2015). As Prx são consideradas candidatas para atuar como sensores de peróxidos , transmitindo a informação para o sistema de transcrição (Sevilla, 2015).

Os nossos resultados evidenciam que a TaPER1 pode ser encontrada em diferentes partes da planta, como raíz e coleóptilo (primeira folha emergente), e pode estar envolvida na regulação redox durante a germinação em diferentes tecidos frente estresse oxidativo. Diferentes eventos podem desacoplar a transcrição e tradução de forma contínua ou em determinadas condições (Schwarzländer, 2013). Pela primeira vez, nós observamos que possivelmente exista uma relação entre os níveis de mRNA diferentemente expressos e mRNA-proteína para o gene PER1. Estes resultados fornecem suporte para a suposição implícita de que a expressão diferencial do mRNA reflete uma diferença entre condições nos níveis funcionais da proteína.

O gene PER1 codifica para a proteína TaPER1 e possui localização nuclear (Stacy e col., 1996-1999), e a expressão de genes nucleares são altamente regulados por níveis pré e pós transcricionais em condições de estresse. Esta mudança apoia a idéia de que múltiplos níveis de regulação atuam junto para preparar uma célula de uma forma mais eficaz para as condições em que se encontra. Regulações pós-

transcricionais da expressão ocorre a níveis de mRNA pré-mensageiro, processamento (splicing e poliadenilação), estabilidade e tradução do mRNA (Schwarzländer, 2013).

A discrepância entre os níveis de mRNA e proteína observados em nosso estudo, pode ser atribuído aos níveis de regulação entre transcrição e a síntese de proteína e pode ter significado biológico, provavelmente mediado por alterações nos níveis de proteína correspondente em resposta ao estresse gerado por H_2O_2 (Koussounadis, 2015). Em leveduras e bactérias que foram submetidas a estresse oxidativo apresentaram o mesmo padrão de resultados obtidos por nosso grupo evidenciando diferenças entre os níveis de mRNA e proteína (Fournier, 2009; Vogel, 2011).

Estudos em *Arabidopsis* demonstram que a via que inibe a tradução do mRNA são os miRNA através da ligação na região 3' – não traduzida (3'-UTR) no mRNA alvo, que por sua vez, tem sido relacionada com a sinalização redox (Panda, 2015). Esses dados sugerem que a regulação do mRNA é um importante componente da via de resposta de estresse da planta. A proteína UBP1 é uma proteína implicada na estabilidade do mRNA e o splicing no pré-mRNA (Floris, 2009). A expressão de UBP1 em protoplastos leva um aumento dos níveis de mRNA maduro independente da eficiência de splicing em *Arabidopsis* (Floris, 2009).

Também quantidades relativas de proteínas também podem ou não ocorrer proporcionalmente com níveis relativos de mRNA dependendo do atraso na síntese de proteína (Vogel, 2012). A síntese de proteínas leva um tempo e as alterações de transcrição podem afetar os níveis de proteínas apenas com um certo atraso temporal (Liu, 2016). Relações entre as taxas de produção e degradação destas moléculas podem variar de acordo com a fase de desenvolvimento, ciclo circadiano, condições utilizadas, níveis de estresse gerados entre outros (Liu, 2016). Contudo em plantas, o mecanismo de comparação entre os níveis de mRNA e proteína sob condições de estresse ainda são desconhecidos, e os processos pelos quais alguns mRNAs são traduzidos ou não, permanecem por ser elucidados (Muñoz, 2012).

Determinar a relação direta entre os níveis de proteínas e mRNA pode ser complicado, sendo que a abundância de proteína e mRNA não segue uma distribuição normal (Ghaemmaghami, 2003; Futcher, 1999). Ao longo das últimas décadas, tecnologias estão sendo desenvolvidas que suportem a grande escala de análise

quantitativa de genomas, transcriptomas e proteomas (Maier, 2009). Os conjuntos de dados gerados estão sendo utilizados para explorar sistematicamente relações quantitativas entre transcritos e proteínas numa vasta gama de sistema e de condições. No entanto, ainda a literatura carece de informações sobre a regulação redox das 1-Cys Prxs em sementes durante a fase de germinação frente a estresse.

Nosso estudo foi relativamente limitado devido ao tempo de estágio, apenas 1 gene (PER1) com cinco condições para expressão dos níveis de mRNA e proteína. No estanto, nossas análises mostraram um aumento significativo claro, indicando que os nossos resultados não são um acaso estatístico, mas sim um fenômeno particular causado pelo efeito H_2O_2 na germinação das sementes de trigo. Além disso, não há nenhuma razão para supor que o nosso sistema experimental produziria maior aumento dos níveis de mRNA e não de proteínas quando comparado a qualquer outro sistema, sugerindo que esta conexão entre a regulação dinâmica do mRNA e correlação com a proteína deve estar presente neste ambiente.

Análises futuras e mais extensivos estudos sobre esse fenômeno são necessários para tentar estabelecer qual é a relação entre os níveis de mRNA ser diferencialmente expressados e sua possível correlação mRNA-proteína para o gene PER1 após tratamento com H_2O_2 . AALEN, R. B.; et al. Transcripts encoding an oleosin and a dormancy-related protein are present in both the aleurone layer and the embryo of developing barley (Hordeum vulgare L.) seeds. **Plant. J.**, v. 5, p. 385-96, 1994.

ABDUL-BAKI, A. A. Hypochlorite and tissue sterilization. Planta, v. 115, p. 373-376, 1974.

ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Pre-sowing seed treatment a shotgun approach to improve germination, plant growth and crop yield under saline and non-saline conditions. **Adv. Agron.**, v. 88, p. 223-271, 2005.

BAIER, M.; DIETZ, K. J. Primary structure and expression of plant homologues of animal and fungal thioredoxin-dependent peroxide reductases and bacterial alkyl hydroperoxide reductases. **Plant Mol. Biol.**, v. 31, p. 553–564, 1996.

BAIER M.; DIETZ, K. J. The plant 2-Cys peroxiredoxin BAS1 is a nuclear-encoded chloroplast protein: its expressional regulation, phylogenetic origin, and implications for its specific physiological function in plants. **Plant J.**, v. 12, p. 179–190, 1997.

BAULCOMBE, D. C.; BUFFARD, D. Gibberellic-acid-regulated expression of oramylase and six otHr genes in wheat aleurone layers. **Planta**, v. 157, p. 493-501, 1983.

BENTSIK, L.; KOORNNEEF, M. Seed dormancy and germination. Arabidopsis Book 6, 2008.

BEWLEY, J.F. & BLACK, M. Seeds: physiology of development and germination. 2.ed. New York: Plenum Press, 1994. 445p.

BEWLEY, D.; et al. Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy. 2013. New York, NY: Springer.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, v. 72, p. 248-54, 1976.

BRÉHÉLIN, C.; et al. Resemblance and dissemblance of Arabidopsis type II peroxiredoxins. Similar sequences for divergent gene expression, protein localization and activity. **Plant Physiol.**, v. 132, p. 2045–2057, 2003.

BROIN, M.; REY, P. Potato plants lacking the CDSP32 plastidic thioredoxin exhibit over-oxidation of the BAS1 2- cys peroxiredoxin and increased lipid peroxidation in thylakoids under photooxidative stress. **Plant Physiol.**, v. 132, p. 1335–1343, 2003.

CHAE, H. Z.; CHUNG, S. J; RHEE, S. G. Thioredoxin-dependent peroxidase reductase from yeast. J. Biol. Chem., v. 269, p. 22670-27678, 1994.

CHEVALLET, M.; et al. Regeneration of peroxiredoxins during recovery after oxidative stress. J. Biol. Chem., v. 278, p. 37146-37153, 2003.

CHOI, Y. O.; et al Cloning and expression of a new isotype of the peroxiredoxin gene of Chinese cabbage and its comparison to 2 Cys-peroxiredoxin isolated from the same plant. **Biochem. Biophys. Res. Commun.,** v. 258, p. 768–771, 1999.

COLLIN, V.; et al. The Arabidopsis plastidial thioredoxins: new functions and new insights into specificity. **J. Biol. Chem.,** v. 278, p. 23747-752, 2003.

DIETZ, K. J. et al. The function of the chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in peroxide detoxification and its regulation. **J. Exp. Bot.,** v. 53, p. 1321–1329, 2002.

DIETZ, K. J. Plant peroxiredoxins. Annu. Rev. Plant Biol., v. 54, p. 93-107, 2003.

DIETZ, K. J. Redox control, redox signaling, and redox homeostasis in plant cells. **Int. Rev. Cytol.**, v. 228, p. 141–193, 2003a.

DIETZ, K. J. Peroxiredoxins in Plants and Cyanobacteria. Antiox. Redox Signal., v. 15, p. 1129–1159, 2011.

DOMINGUEZ, F.; CEJUDO, F. J. Germination related genes encoding proteolytic enzymes are expressed in the nucellus of developing wheat grains. **Plant J.**, v. 15, p. 569-574, 1998.

FINKEMEIER, I.; et al. The mitochondrial type II peroxiredoxin F is essential for redox homeostasis and root growth of *Arabidopsis thailiana* under stress. J. Biol. Chem., v. 280, p. 12168-12180, 2005.

FISHER, A. B. Peroxiredoxin 6: A bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities. **Antiox. Redox Signal.**, v. 15, 2011.

FLORIS, M.; Post-transcriptional regulation of gene expression in plants during abiotic stress. Int. J. Mol. Sci., v. 10, p. 3168-3185, 2009.

FOURNIER, M. L.; Delayed correlation of mRNA and protein expression in rapamycin-treated cells and a role for Ggc1 in cellular sensitivity to rapamycin. **Mol. Cell. Proteom.**, v. 9, p. 271–284, 2009.

FUTCHER, B.; et al. A sampling of the yeast proteome. Mol. Cell Biol., v. 19, p. 7357–7368, 1999.

GHAEMMAGHAMI, S.; Global analysis of protein expression in yeast. **Nature**, v. 425, p. 737–741, 2003.

GOYER, A.; et al. Isolation and characterization of a thioredoxin-dependent peroxidase from *Chlamidomonas reinhardtii*. **Eur. J. Biochem.,** v. 269, p. 272-282, 2002.

HASLEKAS, C.; et al. The expression of a peroxiredoxin antioxidant gene, AtPer1, in *Arabidopsis thaliana* is seed-specific and related to dormancy. **Plant Mol. Biol.**, v. 36, p. 833–845, 1998.

HASLEKAS, C.; et al. Seed 1-cysteine peroxiredoxin antioxidants are not involved in dormancy, but contribute to inhibition of germination during stress. **Plant Physiol.**, v. 133, p. 148–1157, 2003.

HALL, A.; KARPLUS, P.A.; POOLE, L.B. Typical 2-Cys peroxiredoxins – structures, mechanisms and functions. **FEBS J.**, v. 276, p. 2469–77, 2009.

HANSCHMANN, E. M.; et al. Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins. Molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling. **Antioxid. Redox Signal.,** v. 19, p. 1539-1605, 2013.

HE, L.; GAO, Z.; LI, R. Preteatment of seed with H2O2 enhances drought tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. Afri. J. Biotechnol., v. 8, p. 6151-6157, 2009.

HEMDANE, S.; et al. Wheat (*Triticum aestivum* L.) Bran in bread making: a critical review. **Compreen. Rev. Food Sci. Food Saf.**, v. 15, p. 28-42, 2016.

HIGGINS, T. J. V. Synthesis and regulation of major proteins in seeds. Ann. Rev. Plant. Physiol., v. 35, p. 191-221, 1984.

HOFMANN, B.; HECHT, H.J.; FLOHÉ, L. Peroxiredoxins. **Biol. Chem.,** v. 383, p. 347-364, 2002.

HOSENEY, R. C. **Principles of cereal science and technology**. Saint Paul: American Association of Cereal Chemists, 1986. 327 p.

HUGGETT, J.; et al. Real time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Gene Immun.**, p. 1-6, 2005.

HUNG, S. H., YU, C. W., LIN, C. H. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. **Bot. Bull. Acad. Sin.**, v. 46, p. 1-10, 2005.

KARPLUS, P. A primer on peroxiredoxin biochemistry. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 80, p. 183-190, 2015.

KATHIRESAN, A; et al. Gene expression microarrays and their application in drought stress research. Field Crops Res., v. 97, p. 101-110, 2006.

KONG, W.; et al. A novel peroxiredoxin of the plant Sedum lineare is a homologue of *Escherichia coli* bacterioferritin co-migratory protein (Bcp). **Biochem. J.**, v. 351, p. 107–114, 2000.

KÖNIG, J.; et al. Reaction mechanism of plant 2-Cys peroxiredoxin. Role of the C terminus and the quaternary structure. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 24409–24420, 2003.

KÖNIG, J.; et al. The plant-specific function of 2-Cys peroxiredoxin-mediated detoxification of peroxides in the redox-hierarchy of photosynthetic electron flux. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 99, p. 5738–5743, 2002.

KOORNNEEF, M.; BENTSINK, L.; HILHORST, H. Seed dormancy and germination. Curr. Opin. Plant. Biol., v. 5, p. 33-6, 2002.

KOUSSOUNADIS, A.; et al. Relationship between differencially expressed mRNA and mRNA-protein correlations in a xenograft model system. **Sci. Rep.**, v. 8, 2015.

KOVTUN, Y.; et al. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogenactivated protein kinase cascade in plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 2940-2945, 2000.

KUMAR, S. P. J.; et al. Seed birth to death: dual functions of reactive oxygen species in seed physiology. **Ann. Bot.**, v. 116, p. 663–668, 2015.

KRUFT, V. et al. Proteomic approach to identify novel mitochondria proteins in Arabidopsis. **Plant Physiol.**, v. 127, p. 1694-710, 2001;

KUBALA, S.; et al. Enhanced expression of the proline synthesis gene P5CSA in relations to seed osmopriming improvement of *Brassica napus* germination under salinity stress. **J. Plant Physiol.**, v. 183, p. 1–12, 2015.

LAER, K. V.; DICK, T. P. Utilizing natural and engineered peroxiredoxins as intracelular peroxide reporters. **Mol. Cell,** v. 39, p. 46-52, 2016.

LAXA, M.; Role of the cysteine residues in Arabidopsis thaliana cyclophilin CYP20– 3 in peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and redox-related functions. **Biochem. J.**, v. 401, p. 287–297, 2007.

LEE, S. P. Cyclophilin a binds to peroxiredoxins and activates its peroxidase activity. **J. Biol. Chem.** v. 276, p. 29826–29832, 2001.

LIU, Y.; AEBERSOLD, R. The interdependence of transcript and protein abundance: new data-new complexes. **Mol. Syst. Biol.**, v. 12, 2016.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(Delta Delta C(TT)) Method. Method., v. 25, 402-8, 2001.

MAIER, T.; GÜELL, M.; SERRANO, L. Correlation mRNA and protein in complex biological samples. **FEBS Lett.**, v. 583, p. 3966-3973, 2009.

MILLER, G.; et al. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. **Plant Cell. Environ.**, v. 33, p. 453–467, 2010.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M. & BREUSEGEM, V. F. Reactive oxygen gene network of plants. **TRENDS in Plant Science**, v. 9, p.490-498, 2004.

MONTEIRO, G.; et al. Reduction of 1-Cys peroxiredoxin by ascorbato changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C. **Proc.** Natl. Acad. Sci. USA, v. 20, n. 104, p. 4886-91, 2007.

MOWLA, S. B.; et al. A novel stress-inducible antioxidant enzyme identified from the resurrection plant Xerophyta viscosa Baker. **Planta**, v. 2, p. 716-26, 2002.

MUNOZ, A.; CASTELLANO, M. M. Regulation of translation initiation under abiotic stress conditions in plants: Is it a conserved or not so conserved process among eukaryotes? **Comp. Funct. Genomics**, p. 1-8, 2012.

NELSON, K. et al. Analysis of the peroxirdoxin family : Using active-site structure and sequence information for global classification and residue analysis. **Proteins**, v. 79, p. 947-964, 2011.

NETTO, L. E.S.; et al. Removal of hydrogen peroxide is involved with the antioxidant properties of Thiol Specific Antioxidant (TSA). TSA possesses thiol peroxidase activity. **J. Biol. Chem**, v. 271, p.15315-21, 1996

OLSEN, O. Nuclear endosperm development in cereals and *Arabidopsis thaliana*. The **Plant Cell.**, v. 16, p. 214-217, 2004.

PANDA, S. K. SUNKAR, R. Nutrient-and other stress-responsive microRNAs in plants: role for thiol-based redox signaling. **Plant Signal. Behav.,** v. 10, p. 1010916, 2015.

PARERA, C. A.; CANTLIFFE, D. J. Improved germination and modified imbibition of shrunken-2 sweet corn by seed disinfection and solid matrix priming. J. Am. Soc. Hortic. Sci., v. 116, p. 942-945, 1991.

PÉREZ-RUIZ, J. M.; et al. Rice NTRC is a high-efficiency redox system for chloroplast protection against oxidative damage. **Plant Cell**, v. 18, p. 2356–2368, 2006.

PETERSSON, U. A.; et al. The PrxQ protein of *Arabidopsis thaliana* is a member of the luminal chloroplast proteome. **FEBS Lett.**, v. 580, p. 6055–6061, 2006.

POOLE, L.B.; NELSON, K. J. Discovering mechanisms of signaling-mediated cysteine oxidation. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 12, p. 18-24, 2008.

POOLE, L. The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. **Free Rad. Biol. Med.,** v. 80, p. 148-157, 2015.

ROBERT, B.; DAVID, O. Arabidopsis OXS2 is a transcription factor in the oxidative stress response. Abstract of annual meeting of the American Society of Plant Biologists, Orlando, FL. p. 24-28, 2004.

ROUHIER, N. et al. Isolation and characterization of a new peroxiredoxin from poplar sieve tubes that uses either glutaredoxin or thioredoxin as a proton donor. **Plant Physiol.**, v. 127, p. 1299–1309, 2001.

ROUHIER, N.; GELHAYE, E.; JACQUOT, J. P. Glutaredoxin-dependent peroxiredoxin from poplar: protein-protein interaction and catalytic mechanism. J **Biol. Chem.**, v. 277, p. 13609–13614, 2002.

ROUHIER, N.; JACQUOT, J. P.; The plant multigenic family of thiol peroxidases. **Free Radic. Biol. Med.** v. 38, p. 1413–21, 2005.

SCHWARZLANDER, M.; FINKEMEIER, I. Mitochondrial energy and redox signaling in plants. Antioxid. Redox Signal., v.18, p. 2122–2144, 2013.

SEVILLA, F.; et al. The thioredoxin/peroxiredoxin/sulfiredoxin system: current overview on its redox function in plants and regulation by reactive oxygen and nitrogen species. **J. Exp. Bot.**, v. 66, p. 2945-55, 2015.

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medice. **Redox Biol.**, v. 4, p. 180-183, 2015.

STACY, R. A. P.; et al. A peroxiredoxin antioxidant is encoded by a dormancyrelated gene, *Per1*, expressed during late development in the aleurone and embryo of barley grains. **Plant Mol. Biol.**, v. 31, p. 1205-1216, 1996.

STACY, R. A. P.; et al. The dormancy-related peroxiredoxin anti-oxidant, PER1, is localized to the nucleus of barley embryo and aleurone cells. **Plant J.**, v. 19, p. 1-8, 1999.

VANDESOMPELE, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome**, v. 3, 2002.

VOGEL, C.; SILVA, G.M.; MARCOTTE, E. M. Protein expression regulation under oxidative stress. **Mol. Cell Proteom.**, v. 10, 2011.

VOGEL, C.; et al. Protein expression regulation under oxidative stress. Mol. Cell. Proteom., v. 10, 2012.

WEIBRECHT, K.; MÜLLER, K.; LEUBNER-METZGER, G. First off the mark: early seed germination. J. Exp. Bot., v. 62, p. 3289–3309, 2011.

WINTERBOURN, C.; HAMPTON, M. Redox biology: Signaling via a peroxiredoxin sensor. **Nature Chem. Biol.**, v. 11, n. 1, p. 5-6, 2015.

WOJTYLA, L.; et al. Different models of hydrogen peroxide action during seed germination. Front. Plant. Sci., v. 7, p. 1-16, 2016.

WOOD, Z. A; POOLE, L.B.; KARPLUS, P. A. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. **Sci.**, v. 300, p. 650–653, 2003.

YOUNG, T. E.; GALLIE, D. R. Analysis of programmed cell death in wheat endosperm reveals diferences in endosperm development between cereals. **Plant Mol. Biol.**, v. 39, p. 915-926, 1999.

YOUNG, T. E.; GALLIE, D. R. Regulation of programmed cell death in maize endosperm by absicic acid. **Plant Mol. Biol.**, v. 42, p. 397-414, 2000.