UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

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

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.

150 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. Soares Netto, Luis Eduardo. 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)

Agradecimentos

Este agradecimento especial é para a meu orientador Luis Eduardo Soares Netto, por seu comprometimento com a minha formação, ensinamentos 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 Montevideu por me receber com muito amor o tempo que vivi nessa cidade e por ser um dos melhores grupos com 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 ensaios de Western Blot, qPCR e com o português. Ao Francisco Javier Cejudo pela oportunidade de poder trabalhar durante seis meses com seu grupo de pesquisa e a Pablo que me fez enamorar 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 Bannitz 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 ($k_{cat}/K_{M\text{ asc}} = 7.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), 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 $718 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, 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 ($1,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) 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 $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. 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 $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. 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 adquirir atividade ascorbato dependente. Novamente, a forma ácido sulfênico da Tsa1-C170S foi reduzida por ascorbato na mesma ordem de grandeza de $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. 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 ($10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). 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 H₂O₂ in an ascorbate dependent manner with good efficiency ($k_{cat}/K_{M\ asc} = 7.4 \times 10^3\ M^{-1}s^{-1}$), 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 $718\ M^{-1}s^{-1}$, 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 ($1,5 \times 10^3\ M^{-1}s^{-1}$) 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 $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 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 $10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 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 sulfinico
Cys_p-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:	Glutathione peroxidase
Grx:	Glutarredoxina
GS:	Glutamina sintetase
GSH:	Glutathione
GST:	Glutathione-S-transferase
HClO:	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*

Lista de Figuras

Figura 1: Formação de ROS através da reação de transferência de elétrons.23

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

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: Glutathione; ROOH: Peróxido (Adaptado de: Barranco-Medina, 2009).....29

Figura 4: Alinhamento das sequências de aminoácidos das 1-Cys Prx de *A. fumigatus*, *S. cerevisiae*, *T. aestivum*, *P. aeruginosa*, *H. sapiens* e *R. norvegicus*. 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 Omega.....30

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).32

Figura 6: Estrutura molecular do ácido ascórbico (AscH_2). (Retirado de Buettner, 2004).....37

Figura 7: O equilíbrio das espécies redox no sistema ácido ascórbico e deidroascorbato. AscH_2 (ácido ascórbico), AscH^- (monoânion ascorbato), Asc^{2-} (diânion ascorbato), $\text{AscH}^\bullet$ (radical ascorbil), $\text{Asc}^\bullet$ (radical ascorbato), DHA (deidroascorbato) (Retirado de Buettner, 2004).38

Figura 8: Biossíntese do ácido ascórbico (AscH_2) em plantas (direita) e animais (esquerda). O precursor inicial de ambas as vias é a glicose, que através de uma sequência de reações que envolve gasto de energia pela célula, sintetiza o AscH_2 . 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).....	40
--	----

Lista de Tabela

Tabela 1: Resumo das subfamílias das Prxs, distribuição filogenética e estrutural (Adaptado de Karplus, 2015).....	35
---	----

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 catalíticos e classificação das Prxs	27
1.5 Vitamina C	35
1.5.1 Breve história sobre o escorbuto	35
1.5.2 Estrutura	37
1.5.3 Mecanismo de ação	38
1.5.4 Transporte indireto via GLUTs e direto via SVCTs	41
1.5.5 Bioquímica redox do ascorbato	41
V. Conclusões	44
Referências Bibliográficas	45

I. Introdução

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 O_2 como radical

hidroxila ($\text{HO}^\bullet$), radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e sua forma protonada (radical peridroxil, $\text{HO}_2^\bullet$) e espécies não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 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 O_2 consumidas em $\text{O}_2^{\bullet-}$ 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 $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 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 H_2O_2 em combinação com Fe^{2+} era capaz de oxidar biomoléculas. Esta reação hoje chamada de Reação de Fenton leva a formação de $\text{HO}^\bullet$ (Halliwell, 2007).

Em particular, o H_2O_2 , o $\text{HO}^\bullet$ e o $\text{O}_2^{\bullet-}$ têm sido relacionados por provocar lesões oxidativas em lipídeos, DNA e proteínas e outros componentes celulares (Hampton, 2016). O $\text{HO}^\bullet$ é uma das espécies químicas mais reativas que se conhece, reagindo rápida e indistintamente com a maioria das biomoléculas. Comparado ao $\text{HO}^\bullet$, o $\text{O}_2^{\bullet-}$ é muito menos reativo, porém, é capaz de lesar diversas enzimas na sua forma protonada ($\text{HO}_2^\bullet$), podendo iniciar a peroxidação de ácidos graxos (Yin, 2011; Phaniendra, 2014). Já o H_2O_2 é muito difusível, podendo reagir com resíduos de cisteínas presente em proteínas causando alterações estruturais, podendo ocasionar danos celulares em concentrações relativamente baixas ($10\mu\text{M}$). O H_2O_2 não tem

efeito direto no DNA, mas pode danificar o DNA através da produção de $\text{HO}^\bullet$ 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 $\text{O}_2^{\bullet-}$ 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 glutathione 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 glutathione 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 H_2O_2) 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 Glutathione peroxidases (Gpx) e as Peroxirredoxinas (Prxs) são consideradas tióis peroxidases *sensu stricto* 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 H₂O₂ 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).

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 $\text{Fe}^{3+}/\text{O}_2$ /tióis (Kim e col., 1988). Devido ao fato dessa enzima somente proteger a GS da inativação na presença de tióis como ditioneitol (DTT) e glutatona (GSH), e não na presença de outros agentes redutores não-tiólicos, foi denominada TSA (*Thiol specific antioxidant*).

Estudos demonstravam que essas enzimas não possuem homologia em sua sequência de aminoácidos quando comparado com catalases, superóxido dismutases ou outras peroxidases como a glutatona 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 glutatona 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 conectada 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), isquemia e injúria cerebral (Reed e col., 2009).

1.4.1 Processos catalíticos 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).

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 sulfidril 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 sulfinico (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 Sulfirredoxinas (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 pós-traducionais incluindo nitratação da tirosina, fosforilação da Ser e Thr, acetilação no N-terminal ou C-terminal, S-nitrosilação, glutathionilação dos resíduos de cisteínas catalíticos e não catalíticos (Chae e col., 2012; Riquier e col., 2014).

(A) 2-Cys Típicas

(B) 2-Cys Prx Atípicas

(C) 1-Cys Prx

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: Glutathiona; 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).

<i>A. fumigatus</i>	-----
<i>S. cerevisiae</i>	MFSRICSAQLKRTAWTLPKQAHLSQTIKTFATAPILCKQFKQSDQPRLRINSAPNFDA
<i>T. aestivum</i>	-----MPGLTIGDTVPNLEL
<i>P. aeruginosa</i>	-----MSLRLLGDIAPDFEQ
<i>H. sapiens</i>	-----MPGGLLLGDEVAPNFEA
<i>R. novergicus</i>	-----MPGGLLLGDEAPNFEA

<i>A. fumigatus</i>	---MGHMLFKSLASNQRNHKYMKSGRLLHPVCTTELADLAKHQSEFAKRGVKLIGLSANSI
<i>S. cerevisiae</i>	DTTVGKINFYDYLGDWSGVLFSPADFTPVCTTEVSFAFAKLKPEFDKRNVKLIGLSVEDV
<i>T. aestivum</i>	DSTHGKIRIHDIYVNGYVILFSPGDFTPVCTTELAAMANYAKEFEKRGVKLLGISCDV
<i>P. aeruginosa</i>	DSSEGRIRLHEWLGDSWGVLFSPADFTPVCTTELGFATKLKQFAQRGVKVLALSVDPV
<i>H. sapiens</i>	NTTVGRIRFHDFLGDWSGILFSPRDFTPVCTTELGRAAKLAPEFAKRNVKLIALSIDSV
<i>R. novergicus</i>	NTTIGHIRFHDFLGDWSGILFSPRDFTPVCTTELGRAAKLAPEFAKRNVKLIALSIDSV
	*:: : . .: : : : *****. *: : * *::: : :

<i>A. fumigatus</i>	ESHDGWINDITEI----AGCSLTFVLIGDEDRKIAHTYDMLDHQDVTVGARGIAYTIRSV
<i>S. cerevisiae</i>	ESHEKWIQDIKEIA---KVKNVGFPIIGDTFRNVAFLYDMVDAEGFKNINDGSLKTVRSV
<i>T. aestivum</i>	QSHKEWTKDIEAYK---PGSKVTYPIMADPDRSAIKQLNMVDPDEK--DAEG--QLPSRTL
<i>P. aeruginosa</i>	DSHLKWIDDINET----QDTRVNFPIIADADRKVSELYDLIHPNAN--D---TLTVRSL
<i>H. sapiens</i>	EDHLAWSKDINAYNCEETPEKLPFPIIDDRNRELAILLGMLDPAEK--DEKGMPTARVV
<i>R. novergicus</i>	EDHFAWSKDINAYNGAAPTEKLPFPIIDDKDRDLAILLGMLDPAEK--DEKGMPTARVV
	:.* * .** : : : * *. :. : *

<i>A. fumigatus</i>	FIIDPNKVIRLIQAYPASTGRSTTELLRVVDSLLVTDKYSVNTPANWEPGDDVVVPAGLT
<i>S. cerevisiae</i>	FVIDPKKKIRLIIFTYPSTVGRNTHSEVLRVIDALQLTDKEGVVTPINWQPADDVVIIPPSVS
<i>T. aestivum</i>	HIVGPDKKVLSFLYPSTGRNMDEVVRAVDSLLTAAKHKVATPANWNPGEVVIAPGVS
<i>P. aeruginosa</i>	FIIDPNKKVRLIITYPASTGRNFNEILRVISLQLTDEHKVATPANWEDGDEVVIVPSLK
<i>H. sapiens</i>	FVFGPDKKLKSILYPATTGRNFDEILRVVISLQLTAEKRVATPVDWKDGDSVMVLPTIP
<i>R. novergicus</i>	FIFGPDKKLKSILYPATTGRNFDEILRVVDSLQLTASNVPATPVDWKKGESVMVLPTLP
	.:. *. * :.* ** :. **. *::: : * : . * ** :*: .: *:: :

<i>A. fumigatus</i>	AEE-AQVKYPN-----METVKPYLRFIPLARHHLYQH
<i>S. cerevisiae</i>	NDE-AKAKFGQ-----FNEIKPYLRFRTKSK-----
<i>T. aestivum</i>	DDE-AKKMFPPQGFETADLPSSKGYLRFRTKV-----
<i>P. aeruginosa</i>	DEEEIKRRFPKG-----YRAVKPYLRLTPQPNR-----
<i>H. sapiens</i>	EEE-AKKLFPKGVFTKELPSGKKYLRYTPQP-----
<i>R. novergicus</i>	EEE-AKQLFPKGVFTKELPSGKKYLRYTPQP-----
	:* : : : * **

Figura 4: Alinhamento das sequências de aminoácidos das 1-Cys Prx de *A. fumigatus*, *S. cerevisiae*, *T. aestivum*, *P. aeruginosa*, *H. sapiens* e *R. novergicus*. 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 decaamérica ou dodecaamérica (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 $\beta 1-\alpha 1-\beta 2-\alpha 2-\beta 3-\alpha 3-\beta 4-\beta 5-\alpha 4$ (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 das Prxs, a Cys_p está localizada na primeira volta da hélice $\alpha 2$, dentro de uma cavidade acessível ao solvente, formada por um motivo estrutural loop-hélice e cercada pelos 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 peróxido à Cys_p, aparentemente protegendo o Cys_p-SOH formado após reação com o peróxido de sofrer superoxidação. A Arg e a Thr juntamente com a Cys_p formam a tríade catalítica. 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). No entanto, a função destes resíduos de aminoácidos ainda não está completamente elucidada (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 aos 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 archaea, 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 $\sim 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (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 (*Bacterioferritin 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 $4,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (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 $3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e um baixo K_M (9 μM) que demonstra uma maior especificidade pelo substrato quando comparado a H_2O_2 ($K_M > 1,7 \text{ mM}$) (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 H_2O_2 que os membros da subfamília AhpC/Prx1 ($\sim 10^5$ vs $\sim 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, 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).

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

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%)
Tpx	Bactéria	Dímeros do tipo-A	α -hélice 3 (>96%)
AhpE	Bactéria	Dímeros do tipo-A	1-Cys/incerto

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 (AscH_2) também denominado vitamina C é um composto hidrossolúvel que corresponde a uma forma oxidada da glicose, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ (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 estereoisômeros: D-ácido ascórbico, D-ácido isoascórbico e L-ácido isoascórbico.

Figura 6: Estrutura molecular do ácido ascórbico (AscH_2). (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 ($\text{AscH}^\bullet$). Embora esta molécula possa reagir com outros radicais livres, o $\text{AscH}^\bullet$ geralmente decai a deidroascorbato (DHA) através de uma reação do tipo de desproporcionamento (Buettner, 2004).

O $\text{AscH}^\bullet$ 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 glutathione, NADH ou NADPH no ciclo ascorbato-glutathione (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. AscH_2 (ácido ascórbico), AscH^- (monoânion ascorbato), Asc^{2-} (diânion ascorbato), $\text{AscH}^\bullet$ (radical ascorbil), $\text{Asc}^{\bullet-}$ (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 (Figuerola-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 comoceptor 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 (AsCH_2) em plantas (direita) e animais (esquerda). O precursor inicial de ambas as vias é a glicose, que através de uma sequência de reações que envolve gasto de energia pela célula, sintetiza o AsCH_2 . 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-Galactono-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 alto potencial de redução, 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 contêm 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 hidroxil-lisina e hidroxil-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 H_2O_2 , num processo designado ciclo redox, que pode gerar $\cdot\text{OH}$, 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 (Ulrich-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.

V. Conclusões

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. norvegicus* (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.

Referências Bibliográficas

- 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.
- 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, 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 Å 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 antioxidant (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 Å 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. **FEBS 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. Flohé' 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.; LELAND AIS, M. **The roles of ascorbate in the regulation of photosynthesis.** In: Yamamoto HY, Smith CM, eds. Photosynthetic responses to the environment. Rockville, Maryland: American Soc. **Plant Physiol.**, p. 88-101, 1993.

FOYER, C.; LELAND AIS, M. A comparison of the relative rates 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 glutathione 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 dexterity 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 β 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 tuberculosis*: 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-compartment 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)/O₂ 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 Ca²⁺-independent 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 malignant mesothelioma. **J. Pathol.**, v. 196, p. 316-33, 2002.

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

KNOOPS, B.; LOUMAYE, E.; VAN DER ECKEN, 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 concentration-function 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 S-glutathionylation 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 A₂ 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 Biosci.**, 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 ascorbate 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 trypanothione-mediated 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 one-conserved 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 H₂O₂ 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.

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 Å 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, p. 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.

SMIRNOFF, 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 dormancy-related 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 transport, 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 yeast 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 fibroblasts. **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 Sulfenic Acid Formation. **Science**, v. 300, p. 653-656, 2003.

WOO, H. A.; et al. Reduction of cysteine sulfenic acid by sulfiredoxin 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 H₂O₂ 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. **Neurobiol. 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 tyroperoxidase. **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 Peroxiredoxin 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.