UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

RITA TOKIKAWA

**Acetilação Radicalar de Amino Ácidos,
Peptídeos e Nucleobases pelos Sistemas
Biacetilo/Peroxinitrito e Metilglioxal/Peroxinitrito**

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890
O original encontra-se disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
20/07/2012

RITA TOKIKAWA

Acetilação Radicalar de Amino Ácidos,
Peptídeos e Nucleobases pelos Sistemas
Biacetilo/Peroxinitrito e Metilglioxal/Peroxinitrito

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

Orientador: Prof. Dr. Etelvino José Henriques Bechara

Co-Orientadora: Prof. Dra. Maria Teresa Machini

São Paulo
2012

Dedico esta tese aos meus pais Rosely Alves Tokikawa e Roman Hiroshi Tokikawa por todo amor e incentivo. Aos meus avôs Zilda Andreolli Alves e Gilberto Alves pelo amor à leitura. Ao meu noivo Felipe Carnellosso pelo carinho, companheirismo e compreensão. A Yarus Tokikawa Franco pelos momentos de alegria. A Renata Tokikawa pela amizade. Assim como a todos de minha família pelo apoio e ajuda.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Etelvino José Henriques Bechara pela oportunidade de desenvolver este projeto, por todo suporte financeiro e pelas discussões que resultaram nesta Tese.

À minha co-orientadora Profa. Dra. M. Terêsa Machini do Instituto de Química-IQ/ USP pelas discussões científicas e sugestões que sempre contribuíram para o desenvolvimento deste projeto, pela colaboração nas sínteses de peptídeos e acesso ao espectrômetro de massas de seu grupo, que possibilitaram os estudos dos adutos de lisina.

Ao Prof. Dr. Francisco R.M. Laurindo do INCOR/USP pelas minhas primeiras atividades em laboratório como Iniciação Científica e por todas as discussões e colaborações científicas durante meu doutorado.

Ao Prof. Dr. Richard Wagner da Universidade do Departamento de Radiobiologia da Universidade de Sherbrooke-QB/CA pelas discussões científicas, pela ajuda experimental com as nucleobases e por me receber em seu laboratório durante cinco meses.

À Dra. Sayuri Miamoto do Instituto de Química-IQ/ USP e todo o seu grupo de pesquisa (Daniela, Patrícia, Priscila, Rafaela, Tiago e Zilda) por me receberem em seu laboratório no final do meu doutorado.

Ao Dr. Cassius Stevani do Dpto de Química do IQ-USP e seus alunos Anderson, Luiz e Olivia pelos bons momentos quando dividíamos o laboratório no bloco 10 superior.

À Dra. Lia S. Nakao da UFPR que me fez ficar fascinada pelo trabalho em laboratório.

Ao Dr. Célio X.C. Santos do INCOR-USP pelos conselhos sobre a vida no laboratório e pela colaboração nos experimentos com macrófagos.

À Dr. Mírian Uemi da UNIFESP-Diadema pela ajuda nos experimentos, tratamento, e discussões de resultados.

À Dra. Carina Loffredo pela parceria na síntese e purificação dos peptídeos.

Ao Júlio Massari pela grande parceria neste projeto, tanto na parte experimental como nas discussões científicas.

Um agradecimento especial aos colegas de laboratório: Dr. Adriano Sartori, Camila M. Mano, Chrislaine C. Soares, e às técnicas Adriana Wendel e Dóris Dias Araújo pela troca de conhecimento, pelas colaborações e pelos bons momentos que passamos juntos e ao Dr. Nilson Assunção pelas análises no CE/MS.

Ao meu segundo grupo de convívio, em especial à Larissa, Tiago e ao técnico Cleber pela ajuda nos experimentos envolvendo espectrometria de massas.

A todos os professores da CPG e Departamentos de Química e Bioquímica em especial Prof. Dr. Alexander H. Ulrich, Prof. Dra. Alícia Kowaltoswsk, Prof. Dr. Claudimir L do Lago, Prof. Dra. Denise F.S. Petri, Prof. Dr. Jivaldo R. Matos, Prof. Dr. Josef W. Baader, Prof. Dr. Mauricio S. Baptista, Prof. Dr. Pedro V. Oliveira e Diretor Prof. Dr. Fernando R. Ornellas pelo incentivo nas atividades envolvendo os pós-graduandos e a representação discente.

À todo pessoal da secretaria de pós-graduação em especial Cibele pelo apoio nas atividades discentes realizadas.

A todos os colegas da Representação Discente da Pós-Graduação do IQ-USP, pelos projetos e atividades desenvolvidas.

Ao pessoal da Central-Analítica do IQ-USP pela ajuda nos experimentos de espectrometria de massas, em especial à Giovana e Alessandra.

À agência FAPESP pelo suporte financeiro.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Processos Redox em Biomedicina (INCT-Redoxoma) e às agências CAPES e CNPq.

*“Os únicos limites das nossas realizações de amanhã são
as nossas dúvidas e hesitações de hoje.”*

(Franklin D. Roosevelt)

RESUMO

Tokikawa, Rita. Acetilação Radicalar de Amino Ácidos, Peptídeos e Nucleobases pelos Sistemas Biacetilo/Peroxinitrito e Metilglioxal/Peroxinitrito. 2012. (157) p. Tese de Doutorado – Programa de Pós Graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Biacetilo (2,3-butanediona) é um contaminante de comida e cigarro, também implicado na hepatotoxicidade do álcool e em doenças pulmonares. O metilglioxal (MG), um α -oxoaldeído reativo frequentemente associado ao diabetes e envelhecimento, é produto da fragmentação oxidativa de trioses fosfato, acetona e aminoacetona. Por sua vez, peroxinitrito – um potente oxidante, agente nitrante e nucleófilo formado *in vivo* pela reação controlada por difusão do ânion radical superóxido com o radical óxido nítrico ($k \sim 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) – é capaz de se adicionar a CO_2 e compostos carbonílicos, gerando produtos potencialmente tóxicos ou sinalizadores celulares. Aminoácidos, peptídeos e nucleobases podem ser acetilados nos grupos amina e na porção desoxiribose. Relativamente ao tratamento com peroxinitrito isolado, níveis superiores de 3-nitrotirosina foram detectados quando tirosina foi tratada com peroxinitrito/biacetilo ou metilglioxal. Ambos os grupos amina de lisina (Lys) ou um deles de derivados de lisina bloqueados e um deles (Ac-Lys-OMe, Z-Lys-OMe) foram acetilados pelo sistema biacetilo ou metilglioxal/peroxinitrito. Em tetrapeptídeos sintéticos contendo lisina como aminoácido amino-terminal (H-KALA-OH, Ac-KALA-OH and H-K(Boc)ALA-OH), a lisina foi acetilada pelo sistemas dicarbonílico/peroxinitrito no grupo α -amina (em maior extensão) e/ou no ϵ -amina (em menor extensão). No conjunto, estes resultados podem ser interpretados à luz do mecanismo proposto para a reação de compostos α -dicarbonílicos com peroxinitrito, o qual envolve sequencialmente: (i)

adição nucleofílica de peroxinitrito à carbonila; (ii) homólise do aduto peroxinitroso formado, liberando $\cdot\text{NO}_2$ e um radical oxila do reagente carbonílico; (iii) β -clivagem do radical oxila a um ácido carboxílico (ácido acético no caso de biacetilo e ácido fórmico, a partir de metilglioxal) e radical acetila; (iv) captação do radical acetila pelo oxigênio molecular dissolvido dando acetato, ou por aminoácido ou nucleobase, se presentes, gerando o produto acetilado. Tais resultados são interessantes ao levantar a hipótese de acetilação radicalar como mecanismo de modificação pós-traducional de proteínas, até então considerado um processo realizado apenas por acetilases.

Palavras chaves: Biacetilo, Metilglioxal, Peroxinitrito, Acetilação Radicalar, Lisina.

ABSTRACT

Tokikawa, Rita. Radical Acetylation of Aminoacids, Peptides, and Nucleobases by the Biacetyl or Methylglyoxal/Peroxynitrite Systems. 2012. (157) p. PhD Thesis – PhD Thesis - Graduate Program in Science (Biochemistry). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Diacetyl (2,3-butanedione) is a food and cigarette contaminant recently implicated in alcohol hepatotoxicity and lung disease. In turn, methylglyoxal (MG) is an α -oxoaldehyde frequently associated with diabetes and aging that is putatively formed by the oxidative fragmentation of trioses phosphate, acetone and aminoacetone. Peroxynitrite - a potent oxidant, nitrating agent and nucleophile formed *in vivo* by the diffusion-controlled reaction of superoxide radical with nitric oxide ($k \sim 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) - is able to form adducts with carbon dioxide and carbonyl compounds. When initially present in the reaction mixtures before addition of ONOO^- , amino acids, peptides and nucleobases undergo acetylation at the amino group and purine moieties in the presence of biacetyl or methylglyoxal. Higher levels of 3-nitrotyrosine nitration were measured when peroxynitrite/biacetyl or methylglyoxal was added to tyrosine, in comparison with peroxynitrite alone. Both amino groups of L-lysine or one of the amino groups of L-lysine derivatives (Z-Lys-OH and Ac-Lys-OH) were acetylated by biacetyl and methylglyoxal/peroxynitrite system. Using tetrapeptides containing lysine at the terminal amino acid (H-KALA-OH, Ac-KALA-OH and H-K(Boc)ALA-OH), the lysine residue was acetylated at both or either α -amino (major adduct) and ϵ -amino group (minor adduct). Altogether these data can be interpreted by the mechanism proposed to describe the reaction of α -dicarbonyls with peroxynitrite as follows: (i) nucleophilic addition of peroxynitrite to the carbonyl group of the reagent; (ii)

homolysis of the formed peroxyxynitroso carbonyl adduct to $\cdot\text{NO}_2$ and a carbonyloxy radical; (iii) β -cleavage of the oxy radical to acetyl radical plus acetic acid (from diacetyl) or formic acid (from methylglyoxal); (iv) competitive scavenging of the acetyl radical by dissolved molecular oxygen and by added amino acid, peptide or nucleobase, ultimately yielding acetate or acetylated biomolecule. If occurring in vivo, these radical reactions may contribute to the post-translational modification of proteins catalyzed by transacetylases.

Keywords: Biacetyl, Methylglyoxal, Peroxynitrite, Radical Acetylation, Lysine.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGEs: produtos finais de glicação avançada (*advanced glycation end products*)

BA: biacetilo

Boc: *tert*-butiloxycarbonil

CE/MS: eletroforese capilar acoplada a espectrometria de massas

CO₃^{•-}: ânion radical carbonato

DIC: *N,N*-di-isopropilcarbodiimina

DCM : diclorometano

DMF: dimetilformamida

ESI-MS: espectrômetro de massas com ionização por *electrospray*

Fmoc: 9-fluorenilmetilcarbamato

HATs: histona acetilases

HDACs: histona desacetilases

HOBt: 1-hidroxibenzotriazol

HPLC: cromatografia líquida de alto desempenho

RMN-¹H: ressonância magnética de prótons

KATs: lisina acetilases

KDACs: lisina desacetilases

LC/ESI-MS: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com ionização por *electrospray*

MG: metilglioxal

NOS: Óxido nítrico sintases

OPD: 2,3-fenilenodiamino

2-O-acetil-ADPR:

PDA: arranjo de diodo (*photodiode array*)

PTM: modificações pós-traducionais de proteínas (*post-translational modification*)

RP-HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (*reverse phase - HPLC*)

Suirtuins: regulador de informação silenciosa (ou Sir, de *silent information regulation*)

TFA: ácido trifluoroacético

TIS: triisopropilsilano

Z: benziloxycarbonila

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Peroxinitrito: potente biológico oxidante, nitrante e nucleófilo.....	18
1.2. Metilglioxal e biacetilo.....	22
1.3. Acetilação enzimática: modificação pós-traducional de proteínas.....	24
2. OBJETIVOS.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1. Reagentes e solventes.....	30
3.2. Reagentes e solventes para a síntese de peptídeos.....	30
3.3. Outros reagentes.....	31
3.4. Mistura de reação.....	32
3.5. Preparação do peroxinitrito.....	32
3.6. Purificação do biacetilo.....	33
3.7. Caracterização dos adutos acetilados de Z-Lys-OMe e Ac-Lys-OMe.....	33
3.7.a Por RP-HPLC e purificação.....	34
3.7.b Por LC/ESI-MS/MS e análise por injeção direta via ESI-MS/MS.....	34
3.8. Síntese e caracterização de peptídeos brutos por RP-HPLC e HPLC/ESI-MS.....	35
3.9. Purificação dos peptídeos.....	38
3.10. Caracterização dos peptídeos acetilados pelo sistema biacetilo ou metilglioxal/peroxinitrito.....	39
3.10.a. Por RP-HPLC e purificação.....	39
3.10.b. Por LC/ESI-MS e análise direta por ESI-MS/MS	38
3.11. Análise de aminoácidos acetilados pelo sistema biacetilo ou metilglioxal/peroxinitrito por CE/MS.....	40
3.12. Análise de aminoácidos modificados pelo sistema biacetilo ou metilglioxal/peroxinitrito.....	41
3.12.a. Por RP-HPLC e caracterização por LC/ESI-MS/MS ou análise direta por ESI-MS/MS.....	41

3.12.b. Análise dos adutos acetilados purificados por RMN- ¹ H.....	42
3.13. Estudo da acetilação de 2'-desoxiguanosina e 2'-desoxiadenosina pelo sistema biacetilo/peroxinitrito.....	42
3.13.a Por RP-HPLC.....	42
3.13.b Análise de adutos acetilados de nucleosídeos por LC/ESI-MS.....	43
3.14. Outros equipamentos.....	44
3.15. Tratamento dos dados.....	44
4. RESULTADOS.....	45
4.1. Estudo da acetilação dos derivados de lisina Ac-Lys-OMe e Z-Lys-OMe pelo sistema biacetilo/peroxinitrito.....	45
4.2. Estudo da acetilação dos derivados de lisina Ac-Lys-OMe e Z-Lys-OMe pelo sistema biacetilo/peroxinitrito.....	51
4.3. Estudo do perfil de fragmentação dos padrões de Ac-Lys-OH e H-Lys(Ac)-OH por injeção direta em ESI-MS/MS.....	55
4.4. Estudo de lisina modificada pelo sistema biacetilo/peroxinitrito por RP-HPLC.....	57
4.5. Caracterização e purificação dos peptídeos brutos sintetizados para estudo da acetilação de lisina.....	62
4.6. Estudo da acetilação do peptídeo H-KALA-OH pelo sistema biacetilo ou metilglioal/peroxinitrito.....	67
4.7. Estudo da formação de Ac-KALA-OH pela reação de H-KALA-OH com biacetilo ou metilglioal na presença de peroxinitrito.....	71
4.8. Acetilação do peptídeo Ac-KALA-OH pelo sistema biacetilo ou metilglioal/peroxinitrito.....	74
4.9. Acetilação do peptídeo H-K(Boc)ALA-OH pelo sistema biacetilo/peroxinitrito.....	76
4.10. Estudo da acetilação de isoleucina, leucina e metionina pelo sistema biacetilo/peroxinitrito.....	78
4.11. Estudo da reação de fenilalanina e o sistema biacetilo ou metilglioal/peroxinitrito.....	82
4.12. Estudo da reação de triptofano com o sistema biacetilo ou metilglioal/peroxinitrito.....	87

4.13. Estudo da reação de tirosina com o sistema biacetilo/ peroxinitrito.....	95
4.14. Estudo da acetilação de 2'-desoxiguanosina e 2'- desoxiadenosina pelo sistema biacetilo/peroxinitrito.....	98
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	103
6. REFERÊNCIAS.....	115
7. APÊNDICES.....	133
8. ANEXOS.....	160

1. INTRODUÇÃO

1.1. Peroxinitrito: potente agente biológico oxidante, nitrante e nucleófilo

O peroxinitrito é formado em sistemas biológicos pela reação do radical óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$) e do radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) (Blough e Zafiriou, 1985) a uma velocidade controlada pela difusão $k_2 = 4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Goldstein e Czapski, 1995; Huie e Padmaja, 1993; Kissner *et al.*, 1997). O termo “peroxinitrito” utilizado na literatura biomédica refere-se à soma do ânion peroxinitrito (ONOO^-) e de seu ácido conjugado, o ácido peroxinitroso (ONOOH ; $\text{pK}_a = 6,5-7,3$). Os nomes recomendados pela IUPAC são oxoperoxonitrato e hidrogeno-oxoperoxinitrato, respectivamente. O $\text{NO}^\bullet$ é uma molécula pequena e levemente polar e, portanto, difusível através da membrana lipídica (Shaw e Vosper, 1977; Lancaster, 1994; Denicola *et al.*, 1996; Khairutdinov *et al.*, 2000). Em contrapartida, o ânion radical superóxido (pK_a do ácido conjugado, $\text{HO}_2^\bullet = 4,8$; Bielski *et al.*, 1985) apresenta difusão controlada devido a sua carga negativa (Lynch e Fridovich, 1978). A concentração intracelular do ânion radical superóxido é dependente da atividade local da superóxido dismutase (SOD) e sua dosagem por sondas representa enorme desafio metodológico. Esta enzima é extremamente eficiente, $k_2 > 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Fielden *et al.*, 1974; Klug *et al.*, 1972), apresenta concentração intracelular inferior a 10 uM (Quijano *et al.*, 2001; Halliwell e Gutteridge, 2007) e catalisa a dismutação do radical ânion radical superóxido. Como ambas as espécies diferem de acordo com sua habilidade de difundir pela membrana e pela atuação da SOD na concentração do ânion radical superóxido, é esperado que a formação de peroxinitrito ocorra

preferencialmente próxima aos sítios de formação do ânion radical superóxido (Radi *et al.*, 1994; Wink e Mitchell, 1998).

Esquemas 1. Formação de peroxinitrito a partir de óxido nítrico e ânion radical superóxido. Equilíbrio de peroxinitrito com ácido peroxinitroso e decomposição a nitrito, radical hidroxila e radical NO_2 . Reação de peroxinitrito com CO_2 e decomposição aos radicais carbonato e $\bullet\text{NO}_2$, nitrito e CO_2 . (Adaptado de Radi 1998).

Em condições biológicas, tanto o ânion peroxinitrito como o ácido peroxinitroso podem estar presentes, sendo a proporção entre eles dependente do pH local. É importante ressaltar que essas espécies possuem reatividades e propriedades difusionais diferentes. A forma protonada difunde-se passivamente através da bicamada lipídica, enquanto é esperado que a forma desprotonada atravessasse a membrana por canais iônicos como sugerido pela literatura (Denicola *et al.*, 1998; Marla *et al.*, 1997; Romero *et al.*, 1999; Khairudinov *et al.*, 2000; Radi *et al.*, 1998). Na ausência de moléculas alvo o ácido peroxinitroso ($t_{1/2} = 0,9 \text{ s}^{-1}$ em pH 7,4 a 37° C, Beckman *et al.*, 1990) sofre homólise da ligação O-O formando o radical hidroxila

(OH[•]) e o radical dióxido de nitrogênio (NO₂[•]) com rendimento de 30% ou se isomeriza a nitrito (NO₃⁻) com rendimento de 70% (Bonini *et al.*, 1999; Lymar *et al.*, 2003). O ácido peroxinitroso é substrato para peroxidases (Floris *et al.*, 1993; Sies *et al.*, 1997), superóxido dismutase (Houk *et al.*, 1996) e reage com ascorbato (Bartlett *et al.*, 1994), metionina (Pryor *et al.*, 1995), triptofano (Alvarez *et al.*, 1996) e com nucleosídeos (Douki e Cadet, 1996; Niles *et al.*, 2006) enquanto o ânion peroxinitrito, um forte nucleófilo, pode formar aduto com metaloproteínas (Groves e Marla, 1995; Stern *et al.*, 1996), reagir diretamente com grupos sulfidrila (Radi *et al.*, 1991), com peroxiredoxinas (Dubuisson *et al.*, 2004), com cátion de nucleosídeo derivado da oxidação por radical hidroxila (Douki e Cadet, 1996; Niles *et al.*, 2006) e dióxido de carbono (CO₂) (Lymar e Hurst, 1995; Denicola *et al.*, 1996).

A reação de peroxinitrito com o dióxido de carbono é muito expressiva dado que o par bicarbonato/ácido carbônico (HCO₃⁻/CO₂) é o principal tampão sanguíneo. O íon bicarbonato pode atingir concentrações de 25 mM e está em equilíbrio com o ácido carbônico cuja concentração plasmática pode chegar a 1,3 mM (Denicola *et al.*, 1996). O peroxinitrito reage rapidamente com o dióxido de carbono, com $k_2 = 5,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 37° C (Lymar e Hurst, 1995) formando o aduto nitrosoperoxicarbonato (ONOOCO₂⁻, $t_{1/2} < 1 \text{ ms}$ em pH 7,4 a 37° C; Lymar *et al.*, 1996). A decomposição do aduto ONOOCO⁻ produz o radical dióxido de nitrogênio (NO₂[•]) e o radical carbonato (CO₃^{•-}) com rendimento de 35% (Squadrito e Pryor, 2002). A formação do radical carbonato em solução aquosa foi comprovada por medidas de EPR em fluxo (Bonini *et al.*, 1999). A nitração e hidroxilação de fenilalanina por peroxinitrito são inibidas na presença de bicarbonato 25 mM (van der Vliet *et al.*, 1994), enquanto a nitração de

tirosina e de albumina é aumentada nas mesmas condições (van der Vliet *et al.*, 1994; Gow *et al.*, 1996), sugerindo que o par bicarbonato/carbonato modula a reatividade do peroxinitrito e aumenta a sua atuação como agente nitrante.

Esquema 2 . Ataque nucleofílico de peroxinitrito a biacetilo. O biacetilo sofre adição nucleofílica de peroxinitrito, seguida de homólise e clivagem β , que geram radical dióxido de nitrogênio, ânion acetato e radical acetila. Em meio aerado, este radical acetila pode reagir com oxigênio gerando o radical acilperoxila que se aniquila a radical acetila. Por sua vez, este reage com um segundo radical acetila formando anidrido acético, cuja hidrólise forma o ânion acetato (Adaptado de Massari *et al.*, 2008).

O peroxinitrito pode agir como nucleófilo com centros eletrofílicos como os presentes em metabólitos carbonílicos e dicarbonílicos. Dentre estas reações podemos citar a adição nucleofílica de peroxinitrito a acetona ($k_2 = 4,2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ em pH 7,4 e 20°C; Yang *et al.*, 1999) e a aldeídos simples e alifáticos como acetaldeído ($k_2 = 680 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pH 7,4, 37° C; Nakao *et al.*, 1999) e propionaldeído ($k_2 = 530 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pH 7, 25° C; Nakao *et al.*, 1999; Uppu *et al.*, 1997). Para os aldeídos, estes valores são menores quando comparados a isobutanal e 3-metilacetoacetona ($k_2 = 344 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e $k_2 = 166 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7,2, 25° C, respectivamente; Knudsen *et al.*, 2000), piruvato ($k_2 = 88 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pH 7,4, 37° C; Vásquez-vivar *et al.*, 1997). A adição nucleofílica de peroxinitrito a biacetilo ($k_2 = 1,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ pH 7,4, 25° C; Massari *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 1999),

metilglioxal ($k_2=1,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ pH 7,4, 25° C; Massari *et al*, 2010) e glioxal ($k_2=7,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ pH 7,4, 25° C; Massari *et al.*, 2011) apresenta maior constante de velocidade de reação quando comparado aos monocarbonílicos, podendo competir com o CO_2 pela reação com peroxinitrito em sistemas biológicos.

1.2. Metilglioxal e biacetilo

Metabólitos α -dicarbonílicos como metilglioxal e biacetilo podem modificar proteínas como resultado de sua condensação com grupo sulfidril (-SH) (Lo *et al.*, 1994; Kanade *et al.*, 2009) e grupo amina (-NH₂) de proteínas (Yankeelov, 1970; Huang e Tang, 1972; Oya *et al.*, 1999; Kanade *et al.*, 2009) e grupo amina exocíclico (-NH₂) de nucleobases (Synold *et al.*, 2008; Frischmann *et al.*, 2005; Murata–Kamiya *et al.*, 2000; Shapiro e Hachmann, 1966) pela formação inicial das bases de Schiff (aldiminas ou cetiminas) (Kuhla *et al.*, 2005; Arriba *et al.*, 2006, Ulrich e Cerami *et al.*, 2001). Por sua vez, as bases de Schiff sofrem rearranjo tautomérico as denominados “Produtos de Amadori”. Estes adutos por sua vez sofrem reações de oxidação, redução, condensação, fragmentação e ciclização, as quais resultam nos adutos de ligações cruzadas de proteínas (*protein crosslinking*) denominadas produtos de glicação avançada (AGES, de *advanced glycation end products*) ou “Adutos de Maillard”. (Nagaraj *et al.*, 1996; Nemet *et al.*, 2006). Os Adutos de maillard podem ocorrer em resíduos de uma mesma proteína formando uma ligação cruzada interna, pode ocorrer entre duas proteínas (Lederer *et al.*, 1999; Oya *et al.*, 1999). A reação de metilglioxal com resíduos de guanina podem afetar a conformação, estrutura e estabilidade do DNA (Li *et al.*, 2008). O acúmulo de compostos carbonílicos reativos em tecidos e consequentes lesões químicas a

várias biomoléculas com perda de funções costuma ser denominado “estresse carbonílico”.

Esquema 3. Estágios anteriores ao da formação dos Adutos de Maillard (AGES). Ataque nucleofílico do grupo amina á carbonila seguido da formação de Base se Schiff e posteriormente, o Produto de Amadori. Reações com outro grupo amina (intermolecular ou intramolecular) levam à formação dos produtos de glicação avançada (AGES) (Adaptado de Zoccali *et al.*, 2000).

O metilglioxal pode ser encontrado em bebidas (De Revel *et al.*, 2000; Barros *et al.*, 1999), fumaça de cigarro (Fujioka e Shibamoto, 2006; Moree-Testa e Saint-Jalm, 1981), alimentos industrializados (Bednarski *et al.*, 1989; Arribas-Lorrenzo e Morales, 2010), mel (Weigel *et al.*, 2004). Pode ser formado endogenamente pelo metabolismo de acetona (Casazza *et al.*, 1984), de treonina via aminoacetona (Bird *et al.*, 1984; Dutra *et al.*, 2001), ou ser oriundo das trioses fosfato (Philips e Thornalley, 1993). Em algumas desordens metabólicas, como no diabetes, a concentração plasmática de metilglioxal pode atingir 2 vezes (diabetes tipo 1) a 6 vezes (diabetes tipo 2) os valores normais que correspondem a 500-520 nM (Nemet, *et al.*, 2004; Thornalley, 1996). A divergência da literatura na concentração de metilglioxal em amostras biológicas, determinadas em diferentes laboratórios, é

resultado de diferentes metodologias que são utilizadas para a sua quantificação (agente utilizado na desproteínização, condição de extração). Na verdade, concentrações maiores de metilglioxal são esperadas, considerando que, grande parte deste α -oxoaldeído está ligado a macromoléculas e, portanto indisponível para dosagem por reagentes de condensação (Lo *et al.*, 1994; Chaplen *et al.*, 1996; Nagaraj, *et al.*, 1996, Randell *et al.*, 2005).

O biacetilo, diacetilo ou butadiona, é uma α -dicetona amplamente utilizada como flavorizante alimentar aos quais confere aroma e sabor amanteigado. É encontrado em diversos alimentos industrializados como manteiga, pipoca de microondas (Fedan *et al.*, 2006; Morgan *et al.*, 2008; Harber *et al.*, 2006) , torradas, queijos, bebidas (Kovacic e Cooksy, 2005; Bartowsky e Henschke, 2004) e cigarro (Fujioka e Shibamoto, 2006). A ingestão de alimentos que contenham biacetilo não é reportada até o presente momento como fator de risco à saúde humana devido à sua baixa concentração como aditivo (U.S. Food and Drug Administration, 2012). Por ser modificador de resíduos de arginina e lisina em proteínas (Miller *et al.*, 2003), alguns trabalhos relatam a sua toxicidade em doenças pulmonares e como metabólito hepatotóxico no alcoolismo (Kovacic e Cooksy, 2005; Harber *et al.*, 2006).

1.3. Acetilação enzimática: modificação pós-traducional de proteínas

Hoje se sabe que diversas modificações pós-traducionais de proteínas (PTM, de *post-translational modification*), prevalentemente histonas, ocorrem via acetilação, fosforilação, metilação, sumoilação, e ubiquitinação, governando todo o ciclo de vida das células.

A acetilação se mostra tão conservada quanto à fosforilação através da evolução (Kim *et al.*, 2006). Em comparação à fosforilação, a acetilação ocorre em diversos substratos. Em contrapartida, a fosforilação geralmente ocorre em regiões como dobras e voltas de proteínas (Gnad *et al.*, 2007; Iakoucheva *et al.*, 2004; Malik *et al.*, 2008), enquanto a acetilação ocorre em regiões de estrutura secundária das proteínas (Kim *et al.*, 2006; Choudhary *et al.*, 2009) com exceção das histonas. Em ambos os casos, acetilação e fosforilação atuam como reguladores (Kouzarides, 2000; Voet e Voet, 2006).

Acetilação do grupo α -amina do aminoácido terminal das histonas H1, H2A e H4 foi primeiramente relatada em histonas por Phillips *et al.* (1963). Posteriormente a acetilação do grupo ϵ -amina de lisinas localizadas na porção amino-terminal de histonas foi descoberta por Allfrey *et al.* (1964). Desde então, diversos grupos estudam as implicações da acetilação em resíduos de lisina da porção amino-terminal de histonas, cuja modificação envolve a neutralização da carga positiva, o que resulta em alteração eletrostática e diminui a afinidade das histonas pelo DNA (Hong *et al.*, 1993). Como consequência; a acetilação de histonas altera a conformação do nucleossomo (Norton *et al.*, 1989), aumentando o acesso dos fatores de transcrição à cromatina (Vidali *et al.*, 1978; Lee *et al.*, 1993; Vettese-Dadey *et al.*, 1996).

O aumento dos níveis da atividade transcricional está associado ao aumento da acetilação dos resíduos de lisinas na porção amino-terminal de histonas (Isenberg, 1979; Zhang *et al.*, 2002). Por outro lado, o decréscimo dos níveis destas acetilações está associado à diminuição da expressão gênica. Mutações nos resíduos de lisina da porção amino-terminal da histona H4 em células de leveduras aboliram a acetilação alterando os níveis de transcrição (Durrin *et al.*, 1991). Células

tratadas com inibidor da atividade de histona desacetilase como a tricostatina A (TSA) apresentaram um aumento na expressão de diversos genes (Yoshida *et al.*, 1995).

Posteriormente, mostrou-se que acetilação de resíduos de lisina ocorre em inúmeras proteínas nucleares não-histônicas como as do grupo de alta mobilidade (HMG, de *high mobility group*), diversos fatores de transcrição e receptores nucleares (Stern *et al.*, 1979; Ugrinova *et al.*, 2001; Glozak *et al.*, 2005), assim como em proteínas citoplasmáticas e mitocondriais como o citocromo *c* (Kim *et al.*, 2006 e Choudhary *et al.*, 2009).

Diferentemente da acetilação α -amina, realizada pelas N-terminal acetiltransferases (NATs) (Polevoda e Sherman, 2000), a acetilação ϵ -amina de lisinas é reversível e dinamicamente controlada por enzimas - lisina acetiltransferases (KATs) e/ou lisina desacetilases (KDACs). Como a acetilação de proteínas foi inicialmente identificada em histonas, as enzimas KATs e KDACs são também chamadas de acetiltransferases histônicas (HATs) e desacetilases histônicas (HDACs), respectivamente (Yang e Seto, 2008).

As lisina acetiltransferases são enzimas que catalisam a transferência do grupo acetil da acetil-CoA para o resíduo ϵ -amina de lisinas em proteínas histônicas e não-histônicas. Em geral, as lisina acetiltransferases utilizam um sítio ativo glutamato/aspartato que desprotona o grupo ϵ -amina da lisina e promove o ataque nucleofílico à carbonila do acetil-CoA (Berndsen, *et al.* 2007).

As HDACs são agrupadas em duas famílias: HDACs “clássicas” ou hidrolases, que requerem Zn^{2+} para promover a desacetilação de forma eficiente (Finnin, *et al.*, 1999; Vannini, *et al.*, 2004), e as sirtuínas (ou Sir, de *silent information regulation*,

reguladoras silenciosas de informação) dependentes de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) como cofator (Imai, *et al.*, 2000; Smith, *et al.*, 2000).

Esquema 4. Reações de acetilação e desacetilação de lisina. A- Acetilação: Transferência do grupo acetila de acetil-CoA para o grupo ϵ -amina de lisina pela histona acetiltransferase (HAT) e **B- Desacetilação:** Desacetilação de lisina pelas sirtuinas- NAD^+ dependentes formando nicotinamida e 2-O-acetil-ADPR. (Adaptado de Marmorstein, 2001 e Sauve, 2010).

A possível implicação da acetilação em processos de envelhecimento, longevidade, fosforilação oxidativa (Kim *et al.*, 2006), resposta à restrição calórica (Guarente e Picard, 2005; Haigis e Guarente, 2006; Schwer *et al.*, 2009), capacidade de modular a β -oxidação de ácidos graxos (Hirschey *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2006), ciclo do ácido tricarboxílico e ciclo da uréia (Kim *et al.*, 2006; Nakagawa *et al.*, 2009) aumenta o interesse no estudo das acetilases e desacetilases dado o consumo de

acetil-CoA e NAD^+ , respectivamente. Como são fatores importantes na regulação da expressão gênica, há interesse no estudo destas enzimas em doenças como o câncer. Embora até hoje não se tenha dados de alteração na expressão gênica destas enzimas em casos de oncogênese, acredita-se que sua atividade pode estar aumentada (Cress Seto, 2000; Timmermann *et al.*, 2001).

2. OBJETIVOS

É esperado que o meio reacional contendo o α -dicarbonílico (biacetilo ou metilglioxal) e peroxinitrito levem a formação de modificações em proteínas e ácidos nucleicos. Seja pela formação de adutos de Schiff devido à presença do metilglioxal e biacetilo e, a formação de produtos de nitração ou oxidação devido ao peroxinitrito. Conhecendo que ambos os sistemas biacetilo/peroxinitrito e metilglioxal/peroxinitrito geram radical acetila, sendo que este último traz adicionalmente a formação de radical formila, o presente trabalho apresenta como objetivos:

- investigar a possibilidade de formação radicalar de produtos acetilados, formilados, nitrados e oxidados de aminoácidos, peptídeos, proteínas e nucleosídeos quando tratados com α -dicarbonílicos, especificamente metilglioxal e biacetilo e ONOO^- .
- verificar se o sistema α -dicarbonílico/peroxinitrito capaz de acilar o grupo ϵ -amina de lisinas, principal alvo de acetilação enzimática.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes e solventes

Biacetilo, chelex-100, D₂O, NaH₂PO₄.H₂O, formiato de amônio, NaOH, metilglioxal, 2-metilquinoxalina, Na₂HPO₄.12H₂O, NaNO₂, MnO₂ foram comprados da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Os aminoácidos foram obtidos da Fluka/ Sigma-Aldrich e os derivados acetilados de lisina nos grupos α e ϵ -amina e 3-nitrotirosina de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Acetil-fenilalanina de Alfa-Aesar e acetil-triptofano de MP Biomedicals (France).

Ácido acético, ácido fórmico, H₃PO₄, HCl, H₂O₂ e metanol grau HPLC foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

Os eluentes para RP/HPLC e LC-ESI/MS foram preparados com acetonitrila grau HPLC, ácido trifluoroacético (TFA) e metanol grau HPLC da Merck (Darmstadt, Alemanha).

3.2. Reagentes e solventes para a síntese de peptídeos

A resina Fmoc-Ala-Wang utilizada, com tamanho de partícula de 100-200 mesh, foi adquirida da Applied Biosystem (Foster City/CA, EUA). Os reagentes acopladores HOBt (1-hidroxi-benzotriazol) e DIC (*N,N'*-diisopropilelcarbodiimina), da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St Louis/MO, EUA). Os derivados de aminoácidos: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Leu, Fmoc-Lys(Boc). Os solventes DCM (diclorometano), DMF (dimetilformamida), éter isopropílico, metanol, da Merck (Darmstadt, Alemanha).

O TFA (ácido trifluoroacético), TIS (triisopropilsilano), piperidina e anidrido acético eram de grau analítico ou de síntese, provenientes da Merck (Darmstadt, Alemanha).

Para monitoramento dos acoplamentos foi realizado o teste de ninidrina (Kaiser *et al.*, 1970) das peptidil-resinas. Foram empregadas misturas comerciais da Applied Biosystems (Foster City/CA, EUA) sendo a solução de fenol: fenol/etanol 76% (v/v); solução de piridina: cianeto de potássio/piridina 0,2 mM; e solução de ninidrina /metanol 0,28 M.

A resina, todos os reagentes e vidrarias necessários à síntese de peptídeos foram providos pela Profa. Dra. M. Teresa Machini do Instituto de Química da USP, onde as sínteses, purificações e caracterizações químicas dos produtos foram realizadas.

3.3. Outros reagentes

As nucleobases 2'-desoxiadenina e 2'-desoxiguanosina provenientes da Sigma/Aldrich foram fornecidas pelo Professor J. Richard Wagner da Universidade de Sherbrooke, QB, Canadá, onde os experimentos de modificação de nucleobases foram realizados. Os derivados do aminoácido lisina Ac-Lys-OMe e Z-Lys-OMe da Bachem California (Torrance/CA, EUA). foram fornecidos pela prof. Maria Terêsa Machini.

3.4. Mistura de reação

O peroxinitrito sempre foi mantido no gelo e protegido da luz. O pH de cada reação foi medido após a adição do peroxinitrito ao meio reacional, verificando-se assim se há variação de pH do meio causada pela adição da solução alcalina de peroxinitrito. As soluções-estoque de biacetilo e metilglioxal continham 50 mM e 55 mM do composto dicarbonílico em tampão fosfato 200 mM, pH 7.2, respectivamente.

Todas as reações foram conduzidas em tampão fosfato 200 mM, pH 7.2. Soluções de tampão fosfato 200 mM com outros valores de pH foram utilizados conforme indicado no experimento. Neste caso, o tampão era utilizado também para preparar as soluções estoque de biacetilo ou metilglioxal. Todos os tampões foram previamente tratados com Chelex-100 e todas as soluções foram preparadas com água Milli-Q proveniente de um sistema deionizador (Millipore, Bedford/MA, EUA).

3.5. Preparação do peroxinitrito

Peroxinitrito foi preparado pela técnica de “quench-flow” com NaNO_2 (0,6 M), solução de H_2O_2 em meio ácido (0,7 M em HCl 0,6 M) e NaOH (1,5 M) (Radi *et al.*, 1991). O H_2O_2 foi utilizado em excesso para minimizar a contaminação por nitrito. Foi adicionado MnO_2 à solução alcalina de peroxinitrito para eliminar o excesso de H_2O_2 . A solução foi mantida a -20°C durante 12 horas e o peroxinitrito foi coletado sobre a forma de óleo sobre o gelo. Alíquotas de peroxinitrito foram mantidas a -80°C em tubos plásticos. Antes de serem utilizadas, as alíquotas de peroxinitrito foram filtradas com membrana de PVDF Millex™ 0,22 μm da Millipore para eliminar o excesso de

MnO₂. O peroxinitrito foi dosado pela medida da absorbância em 302 nm ($\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, Hughes e Nicklin, 1968). Durante os experimentos o peroxinitrito foi mantido no gelo e protegido da luz.

3.6. Purificação do biacetilo

Biacetilo foi purificado através de sua destilação em mini-forno de destilação Büchi Drive Unit modelo Glass Oven B-580, à temperatura aproximada de 88° C para obter-se o líquido puro. O biacetilo comercial foi colocado no bulbo mais próximo à fonte de calor e recolhido no bulbo mais distante, que estava resfriado com gelo seco e acetona, sendo os demais bulbos descartados no fim do processo.

3.7. Caracterização dos adutos acetilados de Z-Lys-OMe e Ac-Lys-OMe

Esquema 5. Estrutura dos derivados de aminoácidos Ac-Lys-OMe e Z-Lys-OMe em baixo pH. Ambos apresentam o grupo ϵ -amina livre e susceptível à acetilação pelo reagente biacetilo/peroxinitrito.

3.7.a. Por RP/HPLC e purificação dos adutos

Ambos os aminoácidos Z-Lys-OMe e Ac-Lys-OMe (0,5 mg/mL) foram submetidos à reação com biacetilo 2,0 mM ou metilglioal 2,0 mM e peroxinitrito 2,0 mM. A reação de acetilação consiste na adição de peroxinitrito à solução do aminoácido na presença de biacetilo ou metilglioal, sob agitação constante.

Após a reação, cerca de 50 uL destas amostras foram injetadas em um sistema de HPLC da Waters composto por duas bombas binária modelo Waters 515 com um injetor automático WatersTM 717 Plus, um detector de arranjo de diodo modelo WatersTM PDA 996 e uma coluna analítica Symmetry[®] C₁₈ (Waters, 5 µm, 100 Å, 250 x 4,6 mm). As fases móveis empregadas foram A: H₂O/0,1%TFA e B: 60% ACN/0,09%TFA/H₂O. O gradiente linear utilizado foi 5%-95% B em 30 min. As amostras de reação e amostras controles foram coletadas por 40 min, exceto os primeiros 5 min da corrida que correspondem ao volume morto e no qual as frações de fosfato e outras impurezas provenientes da síntese do peroxinitrito e o próprio biacetilo remanescente são eliminados. Após liofilização a baixa temperatura, as amostras foram mantidas a -20° C. Para confirmar a identidade dos picos, cerca de 500 uL de cada pico foram coletados para análise.

3.7.b. Por LC-ESI/MS e análise por injeção direta via ESI/MS

As amostras dos aminoácidos Z-Lys-OMe e Ac-Lys-OMe liofilizadas foram ressuspensas no menor volume possível de fase móvel A (TFA 0,1% em água) e vortexadas e 5 uL destas amostras injetadas no espectrômetro de massas da Esquire 3000 Plus da Bruker acoplado a um HPLC da Shimadzu controlado por CBM 20A ,

com duas bombas (LC-30AD). Para avaliar os dados e reproduzir a condição de separação previamente estabelecida no HPLC, as amostras foram injetadas em outro equipamento de massas do mesmo modelo também acoplado a um HPLC da Shimadzu, da Central Analítica do IQUSP. Neste caso, o volume injetado foi de 50 μ L. As amostras foram também analisadas por injeção direta. As análises foram realizadas no modo positivo $[M+H]^+$.

3.8. Síntese e caracterização de peptídeos brutos por RP/HPLC e LC-ESI/MS

As sínteses foram realizadas no Laboratório de Química de Peptídeos pela Dra. Carina Loffredo, então aluna de doutorado do Departamento de Bioquímica do IQ-USP, sob supervisão da Profa. Dra. M. Teresa Machini.

Os peptídeos foram sintetizados pelo método da fase sólida (SPFS), passo a passo, à temperatura ambiente (Esquema 7) usando protocolos estabelecidos pelo grupo de pesquisa em questão (Varanda e Miranda, 1997; Souza *et al.*, 2004 Loffredo *et al.*, 2009). Aproximadamente 1,5 g de resina Fmoc-Ala-Wang foi lavada com DMF, MeOH e DCM. O grupo Fmoc foi removido pelo tratamento com piperidina (20%) em DMF por 10 min, sob agitação, à temperatura ambiente, deixando o grupo α -amina livre. O primeiro aminoácido a ser acoplado foi a Fmoc-Leu-OH. A reação de acoplamento consistiu na incubação da resina Fmoc-Ala-Wang desprotegida com o derivado de aminoácido que será acoplado na presença dos reagentes acopladores DIC e HOBt por 1 hora. Seguiram-se lavagens com DMF, MeOH e DCM. Confirmando o acoplamento, foram feitas novas etapas de desproteção da peptidil-resina e acoplamento de Fmoc-Ala-OH, seguidas de lavagens. O último derivado de aminoácido acoplado foi a Fmoc-Lys(Boc)-OH, cujo α -amina está protegido com

resíduo Fmoc e o ϵ -amina com o Boc. Foi realizada uma etapa adicional de desproteção do grupo α -amina seguida de acetilação da peptidil-resina por reação com anidrido acético: DCM (1:1) por 10 min sob agitação à temperatura ambiente.

Enquanto os peptídeos H-LysAlaLeuAla-OH (H-KALA-OH) e Ac-LysAlaLeuAla-OH (Ac-KALA-OH) foram liberados da resina e tiveram a cadeia lateral da Lys desprotegida pelo tratamento da peptidil-resina com TFA 95% na presença de TIS 2,5% em água por 2 h a 37° C, o H-Lys(Boc)AlaLeuAla-OH (H-K(Boc)ALA-OH) foi clivado da resina e desprotegido parcialmente (TFA 0,5%, temperatura ambiente por 8-10 h), mantendo o grupo Boc.

Os peptídeos brutos foram precipitados com adição de éter isopropílico gelado. Os resíduos insolúveis, formados pela resina e peptídeo, foram lavados e secos. A adição de solução de ACN 60%/TFA 0,09%, solubilizou os peptídeos. Tais amostras foram liofilizadas. Uma amostra de cada peptídeo sintetizado foi preparada para análise pela solubilização em H₂O/TFA 0,1% de modo a perfazer uma solução de concentração 1,0 mg/mL. Cerca de 10 μ L dessas amostras foram analisadas usando um sistema de HPLC da Shimadzu composto por duas bombas Shimadzu LC-10AD, um detetor Shimadzu SDP-10AV, um injetor Rheodyne 7125 e coluna acoplados a um espectrômetro de massas multi-usuário do Depto de Bioquímica do IQUSP do tipo triplo quadrupolo modelo Quattro II da Micromass, ESI-MS. Condições de RP-HPLC: coluna Vydac C18, solventes A: 0,1%TFA/H₂O, B: 60%ACN/0,09%TFA/H₂O, λ : 210 nm, fluxo: 1,0 mL/min e gradiente linear: 5% B-95% B em 30 min. Condições de ESI/MS: capilar: 3 kV, cone: 37 kV com ionização no modo positivo [M+H]⁺.

Esquema 6. Síntese de peptídeo em fase sólida (SPFS). (1) H-KALA-OH: clivagem da resina/desproteção total com TFA 95% por 2 horas a 37°C, (2) Ac-KALA-OH: acetilação com anidrido acético:DCM (1:1) por 10 min seguida de clivagem da resina/desproteção total e (3) H-K(Boc)ALA-OH: clivagem da resina/desproteção parcial com TFA 0,5% por 10 horas (Modificado de Merrifield, 1963).

3.9. Purificação dos peptídeos

Os peptídeos brutos H-KALA-OH, Ac-KALA-OH e H-K(Boc)ALA-OH foram purificados utilizando HPLC da Waters, modelo 600E preparativo, composto de uma bomba quartenária (Waters Delta 600 Pump), um detector de UV (Waters 2487 Dual Absorbance Detector), um injetor de amostra manual (Rheodyne 3725i-199), um controlador de gradiente automatizado (Waters 600 Controller), um registrador Kipp & Zonen SE 124 e uma coluna preparativa Vydac (C18, 10 μ m, 300 Å, 2,2 x 25 cm). Foram injetados 5 mL da solução de peptídeo bruto. As separações foram realizadas com solvente A: 0,1% TFA/H₂O e solvente B: 20% ACN/0,09% TFA/H₂O, λ : 210 nm, fluxo: 9,0 mL/min e gradiente linear: 5%B-95%B em 30 min. As frações coletadas durante a purificação foram liofilizadas (Kiyota *et al.*, 2003; Machado *et al.*, 2007).

Após purificação, uma alíquota dos peptídeos foi solubilizada no solvente mais adequado (40% ACN/0,09% TFA/H₂O ou 0,1% TFA/H₂O) de modo a perfazer uma solução de concentração 1 mg/mL. Cerca de 10 μ L destas soluções foram injetados no espectrômetro de massas da Central Analítica do IQ-USP para verificar a pureza dos mesmos. As fases móveis empregadas no LC foram A: H₂O/0,1% TFA e B: 60% ACN/0,09% TFA/H₂O. A voltagem de ionização utilizada foi de 37 kV. As análises foram realizadas no modo positivo $[M+H]^+$.

3.10. Caracterização dos peptídeos acetilados pelo sistema biacetilo ou metilglioxal/peroxinitrito

3.10.a. Por RP/HPLC e purificação

O peroxinitrito (2 mM) foi adicionado à solução contendo o peptídeo (0,5 mg/mL) e biacetilo (0,5 – 5 mM) ou metilglioxal (0,5 – 5 mM). Para verificar o efeito do pH nas reações de acetilação foram preparados tampões de fosfato 200 mM em diferentes pHs (6,2 – 8,2). Cerca de 50 uL das amostras foram analisadas em um sistema de HPLC da Waters (descrito no item 3.7.a.) e uma coluna analítica Symmetry® (Waters C₁₈, 5 µm, 100 Å, 0,46 x 25 cm). As fases móveis empregadas foram A: H₂O/0,1% TFA e B: 60% ACN/0,09% TFA/H₂O. O gradiente linear utilizado foi 5%-95% B em 30 min. Para purificação do material injetou-se 200 uL de amostra, eliminado o eluado dos primeiros 5 minutos de corrida. Todo material coletado foi liofilizado a baixa temperatura. Aproximadamente 500 uL dos picos foram coletados para posterior análise.

3.10.b. Por LC-ESI/MS e análise direta por ESI/MS/MS

Para análise por LC-ESI/MS, as amostras liofilizadas foram solubilizadas no menor volume possível de solvente 40% ACN/0,09% TFA/H₂O e cerca de 50 µL do material foi analisado. As condições de LC-ESI/MS foram as mesmas utilizadas na separação. As condições de ionização das amostras analisadas por infusão direta por

ESI/MS/MS foram ajustadas caso a caso. As análises foram realizadas no modo positivo $[M+H]^+$.

3.11. Análise de aminoácidos acetilados pelo sistema biacetilo ou metilglioxal/peroxinitrito por CE-MS

Adicionou-se à solução de aminoácido (1,0 e 0,5 mg/mL) na presença de biacetilo 2,0 mM ou metilglioxal 2,0 mM um volume de peroxinitrito correspondente a 2,0 mM. Como controles de reação, foram feitos experimentos com o aminoácido na presença de biacetilo, metilglioxal e peroxinitrito. As separações foram realizadas por CE/MS em um sistema de eletroforese capilar da Beckman modelo MDQ™ acoplado a um espectrômetro de massas de massas da Thermo Finnigan, modelo LCQ Ion Max Advanced ESI. A interface empregada foi do tipo *sheath-flow* alimentada com um líquido auxiliar composto por MeOH/água/ácido acético (50:49,5:0,5) ou MeOH 10% /ácido fórmico 1,0 M, o qual é gerenciado por uma bomba seringa Gilson na vazão de 5 – 10 $\mu\text{L min}^{-1}$. O capilar de sílica empregado na separação eletroforética foi adquirido da Polimicro Technologies com as dimensões de 90 cm de comprimento total e 75 μm de diâmetro interno, sem revestimento polimérico no seu interior. A voltagem aplicada foi de 25 kV, tempo de injeção 10 s, pressão 2 - 5 psi e temperatura de 25 °C. As condições de análise do espectrômetro de massas foram: voltagem do ionizador de 4,5 kV, temperatura de 275 ° C, vazão do N_2 utilizado como *sheath-gas* de 20 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$ e do *auxiliary sweep gas* de 5 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$. Os experimentos de MS e MS/MS foram conduzidos no modo positivo e N_2 foi utilizado como nebulizador e gás He para auxiliar o processo de fragmentação. O CE foi pré-condicionado com NH_4OH 1,0 M, água deionizada e eletrólito de

separação (solução de ácido fórmico 1,0 M/ MeOH 10%) por 5 min para cada solução, a uma pressão de 50 psi. As amostras foram injetadas hidrodinamicamente a 2 psi por 15 s e a separação foi realizada a voltagem constante de 22 kV. As demais condições de análise do espectrômetro foram alcançadas através de uma calibração automática para a histidina. As análises foram realizadas no modo positivo $[M+H]^+$.

3.12. Análise de aminoácidos modificados pelo sistema biacetilo ou metilglioxal/peroxinitrito

3.12.a Por RP/HPLC e caracterização por LC-ESI/MS ou análise direta por ESI/MS/MS

Amostras de fenilalanina, isoleucina, leucina, metionina, tirosina e triptofano apresentam boa separação por RP/HPLC nas condições testadas e, portanto, os adutos formados pela reação dos aminoácidos (0,5 mg/mL) na presença de peroxinitrito (0,5 mM – 2,0 mM) e na presença de peroxinitrito e biacetilo ou metilglioxal (1,0 mM - 5,0 mM) foram prontamente avaliados. As amostras foram analisadas em um sistema de HPLC da Waters (descrito no item 3.7.a.) e uma coluna analítica Luna[®] Phenomenex (C₁₈(2), 5 µm, 100 Å, 250 x 4,6 mm). As fases móveis empregadas foram A: H₂O/0,1% TFA e B: 60% ACN/0,09% TFA/H₂O. O gradiente linear utilizado foi 5%-60% B em 30 min. Os picos foram coletados e caracterizados pela análise direta no espectrômetro de massas da Central Analítica. As análises foram realizadas no modo positivo $[M+H]^+$.

3.12.b Análise dos adutos acetilados por RMN-¹H

Alguns adutos de aminoácidos acetilados foram purificados e avaliados por RMN-¹H. Depois de purificados por RP/HPLC, os adutos foram liofilizados e mantidos a -20° C. Nos experimentos de RMN-¹H, as amostras foram ressuspensas no menor volume possível de D₂O para análise. Os espectros foram obtidos em equipamento DRX-500 da Bruker na Central Analítica do IQ-USP em colaboração com a Dr. Mírian Uemi (UNIFESP-Diadema). Todos os espectros empregaram o resíduo da água deuterada como referência secundária em 4,8 ppm e estão apresentados em Apêndice.

3.13. Estudo da acetilação de 2'-desoxiguanosina e 2'-desoxiadenosina pelo sistema biacetilo/peroxinitrito.

3.13.a Por RP/HPLC

Após modificação pelo sistema biacetilo/peroxinitrito, os nucleosídeos e os respectivos produtos de reação foram avaliados utilizando um sistema de HPLC Alliance 2690 da Waters composto por um controlador de gradiente automático, duas bombas e controlador de temperatura para amostras (4° C) e detector de absorvância (Dual Absorbance λ) modelo 2487 da WatersTM e uma coluna analítica Hydrosphere (C₁₈, 5 μ m, 250 x 46 mm). As fases móveis empregadas foram A: 20 mM formiato de amônio e B: 90% de ACN. O gradiente linear utilizado foi 0%-30% B em 30 minutos com fluxo de 1,2 mL/min e injeção de 50 μ L de amostra.

3.13.b Análise de adutos acetilados de nucleosídeos por LC-ESI/MS

Os nucleosídeos modificados pelo sistema biacetilo/peroxinitrito e biacetilo foram analisados em cromatógrafo líquido da Waters modelo Alliance 2690 com detector de absorvância (7956 Waters) e uma coluna analítica (hydrosphere C185 μm , 100 Å, 4,6 x 250 mm, YMC). As fases móveis empregadas foram A: 20 mM formiato de amônio e B: 95% ACN. O gradiente linear utilizado foi 0 a 30% de B em 30 min. As condições de análises do espectrômetro de massas foram: energia de colisão de 20 kV, vazão do N_2 utilizado como *sheath-gas* foi de $12 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ e do *Auxiliary sweep gas* de $8 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Os produtos de modificação nucleosídeos pelo sistema biacetilo/peroxinitrito de foi monitorado pela perda neutra (*neutral loss*) de 116 Da (Esquema 8) correspondente à perda da desoxiribose com energia de colisão de 20 kV. Após detecção dos adutos de acetilação, estes foram monitorados pela análise do produto iônico (*product ion*) de $m/z = 310$ Da correspondente à desoxiguanosina acetilada e $m/z = 294$ Da para desoxiadenosina acetilada. Nestes experimentos foram utilizadas duas energias de colisão: 20 kV e 40 kV. As análises foram realizadas no modo positivo $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Esquema 7. Perda neutra (NL, *neutral loss*) de 116 u.m.a correspondente à quebra da ligação glicosídica entre o açúcar e a base dos nucleosídeos apresentados.

3.14. Outros equipamentos

Liofilizador: Liofilizador a baixa temperatura da Edwards™ com refrigerador Modulyo 4K Freeze Dryer e bomba a vácuo E2M18 Edwards™ High Vacuum.

3.15. Tratamento dos dados

Todos os gráficos foram obtidos através do programa Origin 6.1 no qual foram realizadas as análises estatísticas pelo teste One-Way ANOVA ou Test-t. Os cromatogramas de HPLC e tratamento dos dados foram adquiridos no programa Empower™ 3 da Waters. Os espectros de massas foram analisados com o software MassLynx™ da Waters e DataAnalysis da Bruker Daltonics™ v 3.2, a fragmentação dos peptídeos e derivados de aminoácidos foram confrontadas com as geradas pelo software Peptide Companion™ v 2.5 (CSPS Pharmaceuticals Inc.). Os espectros de RMN-¹H foram analisados com o software TopSpin da Bruker™ v 6.4.

4. RESULTADOS

4.1. Estudo da acetilação dos derivados de lisina Ac-Lys-OMe e Z-Lys-OMe pelo sistema biacetilo/peroxinitrito

Os aminoácidos derivados de L-lisina, Ac-Lys-OMe e Z-Lys-OMe (Esquema 5), foram escolhidos por apresentarem o grupo ϵ -amina de lisina susceptível a modificações, enquanto os sistemas biacetilo/peroxinitrito e metilglioxal/peroxinitrito são descritos como fonte de radicais acetila (Massari *et al.* 2008 e 2010) que podem modificar grupos amina de aminácidos e nucleobases. O interesse em pesquisar a acetilação radicalar de resíduos de lisina está associado ao grande número relatado de proteínas que possuem este aminoácido acetilado no seu grupo ϵ -amina por transacetilases (epigenética). Estes derivados da lisina foram escolhidos pela facilidade de serem separados por RP/HPLC da lisina devido à sua natureza mais hidrofóbica.

Figura 1. Perfil de RP/HPLC da reação de modificação do aminoácido Z-Lys-OMe por biacetilo na presença e ausência de peroxinitrito. Comparação das reações de Z-Lys-OMe 0,5 mg/mL (preto) na presença de biacetilo 5,0 mM (vermelho), peroxinitrito 2,0 mM (verde) e biacetilo 2,0 mM na presença de peroxinitrito 2,0 mM (azul). Condições RP/HPLC: descritas no item 3.7.a.

Figura 2. Análise por RP/HPLC e por ESI-MS da reação de modificação do aminoácido Z-Lys-OMe modificado por biacetilo na presença de peroxinitrito. Cromatograma da amostra de Z-Lys-OMe 0,5 mg/mL modificado por biacetilo 5,0 mM na presença de peroxinitrito 2,0 mM. Condições RP/HPLC: descritas no item 3.7.a. Condições do ESI/MS: capilar 4,5 kV, saída do capilar 140 V, gás secante 220 °C com fluxo 5 mL/min, modo de ionização: ES⁺. Componente **B**: Z-Lys-OMe com $m/z = 295$ e **D**: produto de reação Z-Lys(Ac)-OMe com $m/z = 337$.

As amostras das reações de modificação dos aminoácidos por biacetilo 5,0 mM, peroxinitrito 2,0 mM e biacetilo 5,0 mM na presença de peroxinitrito 2,0 mM foram analisadas por HPLC e posteriormente purificadas e liofilizadas para análise por HPLC acoplada a LC-ESI/MS. O procedimento de purificação (descrito no item 3.7.a) deve ser realizado para eliminar a grande quantidade de fosfato do meio reacional, sendo este um interferente do processo de ionização das amostras nas análises por LC-ESI/MS.

A Figura 1 apresenta o cromatograma obtido para a separação de Z-Lys-OMe modificado por biacetilo (5,0 mM) e peroxinitrito (2,0 mM) por HPLC (em azul) e os controles de reação como indicado. Nesta amostra pode-se observar um pico com tempo de retenção de 22,6 min, ausente nas reações controle, que poderia corresponder a Z-Lys(Ac)-OMe. O pico B (Figura 2) revelou que aquele com tempo de retenção de 18, 1 min corresponde ao aminoácido Z-Lys-OMe com $m/z= 295$. O espectro de MS/MS do íon de $m/z= 295$ gerou os fragmentos de $m/z= 251, 187, 144$ e 84 de maior intensidade e os íons de $m/z= 277, 234, 219$ e 127 de menor intensidade. O íon de $m/z= 84$ é característico de resíduos de lisina. (Fenaille *et al.*, 2004; Cantú e Carrilho, 2008).

O aduto acetilado (Z-Lys(Ac)-OMe) corresponde ao pico D com tempo de retenção de 22,5 min e $m/z= 337$ (Figura 2), confirmado pelo aumento de 42 u.m.a. para o aminoácido Z-Lys-OMe (pico A). O espectro de fragmentação do aduto acetilado apresentou os fragmentos de $m/z= 293, 229, 126$ de maior intensidade e de $m/z= 321, 312, 303, 149$ e 198 de menor intensidade. O fragmento de $m/z= 126$ é característico de lisinas acetiladas no grupo ϵ -amina de acordo com dados da literatura (Fenaille *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2002). A fragmentação subsequente do íon de $m/z= 126$ gera o fragmento de $m/z= 84$, que corresponde à perda do grupo

acetila (Cantú e Carrilho, 2008, Fenaille *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2002). Os fragmentos de $m/z= 293$, 229 e 126 obtidos pelo espectro de MS^n revelam que o pico coletado com tempo de retenção de $22,1$ min é o produto acetilado (Z-Lys(Ac)-OMe) formado quando o aminoácido Z-Lys-OMe é tratado com biacetilo na presença de peroxinitrito.

O aminoácido Ac-Lys-OMe apresenta tempo de retenção de $5,3$ min. O possível aduto acetilado com tempo de retenção de $10,2$ min foi observado após a reação deste aminoácido com o sistema biacetilo $5,0$ mM e peroxinitrito $2,0$ mM pela análise por RP/HPLC assim como as amostras controle como indicado (Figura 3). Ambos os materiais correspondentes aos picos (A e B, Figura 4) foram coletados para injeção direta no espectrômetro de massas. O aminoácido Ac-Lys-OMe pôde ser caracterizado pela presença dos íons de $m/z= 203$ e o seu dímero com $m/z= 405$ (Figura 4).

Figura 3. Perfil de RP/HPLC da reação de modificação do aminoácido Ac-Lys-OMe por biacetilo, na presença e ausência de peroxinitrito. Comparação das reações de Ac-Lys-OMe $0,5$ mg/mL (preto) na presença de biacetilo $5,0$ mM (vermelho), peroxinitrito $2,0$ mM (verde) e biacetilo $2,0$ mM/peroxinitrito $2,0$ mM (azul). Condições RP/HPLC: descritas no item 3.7.a.

O espectro de MS/MS do íon de $m/z= 203$ apresentou os fragmentos de $m/z= 186$, 171, 153, 144, 129 e 84. O íon de $m/z= 129$ de maior intensidade, de acordo com a literatura é formado pela fragmentação de lisina acetilada no grupo α -amina, mas também é produto da fragmentação de lisina (Yalcin e Harrison, 1996; Fenaille *et al.*, 2004).

O produto acetilado Ac-Lys(Ac)-OMe, pico B (Figura 4), apresenta a razão $m/z= 245$ que é atribuída ao aumento de 42 u.m.a. do íon de $m/z= 203$. O espectro de MS/MS do íon de $m/z= 245$ gerou os fragmentos de $m/z= 213$ e 126 de maior intensidade e $m/z= 203$, 185 e 84 de menor intensidade. Os fragmentos de $m/z= 126$ e 84 sugerem a presença do resíduo de lisina acetilada no grupo ε -amina. **Os fragmentos de $m/z= 213$, 203, 185 e 126 (Figura 4) confirmam que o material correspondente ao pico B coletado é o aduto acetilado Ac-Lys(Ac)-OMe.**

A fragmentação do aminoácido Ac-Lys(Ac)-OMe mostrou que, embora ambos grupos amina de lisina apresentem um grupo acetila, apenas o íon de $m/z= 126$, característico da lisina acetilada no grupo ε -amina, está presente no processo de fragmentação (Figura 4).

Amostras de Z-Lys-OMe ($m/z= 295$), Ac-Lys-OMe ($m/z= 203$) e das reações controle destes derivados de aminoácidos com biacetilo 5,0 mM e com peroxinitrito 2,0 mM também foram purificadas por HPLC e liofilizadas para análise por LC-ESI/MS (dados não apresentados) na tentativa de demonstrar que os adutos de $m/z= 337$ e $m/z= 245$ não são contaminantes dos aminoácidos derivado de lisina, ou atribuíveis a um subproduto inespecífico de reação dos aminoácidos com o biacetilo ou dos aminoácidos com o peroxinitrito. **A ausência destes íons nas amostras confirma que os adutos acetilados são produtos da reação entre aminoácido e o radical acetila gerado pelo sistema biacetilo/peroxinitrito.**

Figura 4. Análise por RP/HPLC e ESI/MS/MS da reação de modificação do aminoácido Ac-Lys-OME por biacetilo na presença de peroxinitrito. Cromatograma da amostra de Ac-Lys-OME 0,5 mg/mL modificado por biacetilo 5,0 mM na presença de peroxinitrito 2,0 mM. Condições RP-HPLC: descritas no item 3.7.a. Condições do ESI-MS: idem ao descrito na Figura 2: ES^+ . Componente **A**: Ac-Lys-OME com $m/z=203$ e **B**: produto de reação Ac-Lys(Ac)-OME com $m/z=245$.

4.2. Estudo da acetilação dos derivados de lisina Ac-Lys-OMe e Z-Lys-OMe pelo sistema metilglioxal/peroxinitrito

A reação de Z-Lys-OMe com metilglioxal/peroxinitrito resultou na formação de dois produtos com tempo de retenção de 21,8 e 22,5 min, respectivamente, como observado no cromatograma obtido pela separação por RP/HPLC (Figura 5). Os materiais correspondentes aos picos foram coletados para análise por injeção direta por ESI/MS/MS. Dada à proximidade de ambos os picos (B e C, Figura 5) observa-se que os valores de m/z = 323 e 337 estão presentes em ambas as amostras coletadas e correspondem aos produtos de reação obtidos: o primeiro pico atribuível ao aduto formilado com aumento de 28 u.m.a. e o segundo, o aduto acetilado com m/z = 337 com aumento de 42 u.m.a. O aduto formilado, se correto o mecanismo proposto por Massari *et al.*, 2010, deve ser oriundo do ataque do peroxinitrito à carbonila cetônica do MG (Esquema 10). **Este dado per si demonstra certa estabilidade do radical formila.**

Os íons de m/z = 295 e 337 correspondentes a Z-Lys-OMe e Z-Lys(Ac)-OMe, respectivamente, apresentaram o padrão de fragmentação semelhante ao obtido na Figura 2. O íon de m/z = 323 apresentou o espectro de fragmentação com m/z = 279; 112 e 215, 9 com maior e menor intensidade, respectivamente.

A reação de Ac-Lys-OMe com metilglioxal/peroxinitrito resultou na formação de um único pico correspondente ao produto de reação com tempo de retenção de 9,9 min como observado no perfil de RP/HPLC (Figura 6). O material correspondente ao pico foi coletado para análise por injeção direta em ESI/MS a qual mostrou a presença de três íons de m/z = 231, 245 e 253 com maior intensidade, sendo o primeiro do aduto formilado e o segundo do aduto acetilado. O íon de m/z = 253 também presente no

espectro de massas do componente B não apresentou fragmentos correspondentes à lisina (dados não apresentados).

O aduto Ac-Lys(Ac)-OMe de $m/z= 245$ apresentou fragmentação com formação dos íons de $m/z= 213$ e 126, com maior intensidade, e íons de $m/z= 227$, 185 e 84, com menores intensidades. A fragmentação MS/MS do íon de $m/z= 213$ gera os fragmentos de $m/z= 126$ e 84, característicos de resíduo de lisina acetilada no grupo ϵ -amina. O aduto Ac-Lys(HCO)-OMe de $m/z= 231$ apresentou os fragmentos de $m/z= 199$ e 112 com maior intensidade e, com menor intensidade, os fragmentos de $m/z= 203$, 189, 171, 129 e 84 (Figura 6). Este último sugere um aduto de lisina e, o anterior confirma o resíduo de lisina com o grupo α -amina acetilado. O fragmento de $m/z= 203$ sugere a perda direta do grupo formil pelo íon r de $m/z= 231$.

Amostras das reações controle de Z-Lys-OMe, Ac-Lys-OMe com metilglioxal 10,0 mM e com peroxinitrito 2,0 mM também foram purificadas por HPLC e liofilizadas para análise por LC-MS (dados não apresentados), na tentativa de se demonstrar que os adutos de $m/z= 337$ e 323 para o Z-Lys-OMe acetilado e formilado, respectivamente, e $m/z= 245$ e 213 para o Ac-Lys-OMe acetilado e formilado, respectivamente, não são contaminantes dos aminoácidos derivados de lisina, ou um subproduto inespecífico de reação do aminoácido com o metilglioxal ou com o peroxinitrito. **Novamente, a ausência destes íons nas amostras confirma que os adutos acetilados e formilados são produtos da reação do aminoácido e o radical acetila ou o radical formila gerado pelo sistema metilglioxal/peroxinitrito.**

Figura 5. Análises por RP/HPLC e ESI/MS/MS da reação de modificação do aminoácido Z-Lys-OME por metilglioxal na presença de peroxinitrito. Cromatograma da amostra de Z-Lys-OME 0,5 mg/mL modificado por metilglioxal 10,0 mM na presença de peroxinitrito 2,0 mM. Condições RP/HPLC: descritas no item 3.7.a. Condições do ESI/MS: capilar 4,5 kV, saída do capilar 140 V, gás secante 220 °C com fluxo 5 mL/min, modo de ionização: ES⁺. Componente **A**: Z-Lys-OME com $m/z=295$ e produtos de reação **B**: Z-Lys(HCO)-OME com $m/z=323$ e **C** Z-Lys(Ac)-OME com $m/z=337$.

Figura 6. Análise por RP/HPLC e ESI/MS/MS da reação de modificação do aminoácido Ac-Lys-OME por metilglioxal na presença de peroxinitrito. Cromatograma da amostra de Ac-Lys-OME (0,5 mg/mL) modificado por metilglioxal 5,0 mM na presença de peroxinitrito 2,0 mM. Condições RP/HPLC: descritas no item 3.7.a. Condições do ESI/MS: idem ao descrito na Figura 5. Componente **A**: Ac-Lys-OME com $m/z=203$ e **B**: produtos Ac-Lys(Ac)-OME com $m/z=245$ e Ac-Lys(HCO)-OME com $m/z=231$.

4.3. Estudo do perfil de fragmentação dos padrões de Ac-Lys-OH E H-Lys(Ac)-OH por injeção direta em ESI/MS/MS

Figura 7. Espectro de ESI/MS/MS dos padrões de Ac-Lys-OH e H-Lys(Ac)-OH. Amostras dos derivados de lisina foram preparadas em água e diluídas previamente antes da análise direta no espectrômetro de massas. Condições do ESI/MS: capilar 4,5 kV, saída do capilar 140 V, gás secante 220 °C com fluxo 5 mL/min, modo de ionização: ES⁺.

Esquema 8. Fragmentação de (A) Ac-Lys-OH e (B) H-Lys(Ac)-OH. Mecanismo de fragmentação proposto para fragmentação do aminoácidos derivados de lisina acetilada de $m/z = 189$. Os fragmentos de $m/z = 84$ caracterizam a presença do resíduo de lisina. Ac-Lys-OH apresenta o fragmento de $m/z = 129$ (íon acilio) característico e a H-Lys(Ac)-OH o fragmento de $m/z = 126$ com maior intensidade (Reproduzido de Yalcin e Harrison, 1996, Fenaille *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2002).

Para avaliar a fragmentação de lisina acetilada nos grupos α -amina (Ac-Lys-OH) e no grupo ϵ -amina (H-Lys(Ac)-OH) padrões de cada amostra foram analisadas por infusão direta em ESI/MS (Figura 7).

O aminoácido Ac-Lys-OH apresentou $m/z= 189$ e a sua fragmentação gera os íons de $m/z= 171$, 129 (maior intensidade) e 84 como descrito por Yalcin e Harrison, 1996. O íon de massa carga $m/z= 171$ corresponde à perda de uma molécula de H_2O . O aminoácido H-Lys(Ac)-OH é um isômero de posição do Ac-Lys-OH e apresenta a mesma razão $m/z=189$, mas o espectro de fragmentação de Ac-Lys-OH apresenta os íons de $m/z= 143$, 126 (maior intensidade) e 84. O íon de $m/z= 143$ corresponde ao íon imônio acetilado e o íon de $m/z= 206$, conforme dados da literatura, é característico da lisina acetilada no grupo ϵ -amina, como já descrito anteriormente. Este fragmento é formado pelo ataque nucleofílico do grupo amina à carbonila e perda do grupo acetil-amônio (Fenaille *et al.*, 2004) (Esquema 8). Em ambos os casos aparece o íon de $m/z=84$, característico da fragmentação de peptídeos contendo lisina e derivados deste aminoácido.

4.4. Estudo de lisina modificada pelo sistema biacetilo/peroxinitrito por RP/HPLC

Amostras de lisina (0,5 mg/mL) foram tratadas com o sistema biacetilo 2,0 mM/peroxinitrito 2,0 mM em tampão fosfato 200 mM (pH 6,2-8,2) (Figura 9.A). Cerca de 100 μ L destas amostras foram injetadas no HPLC e a separação realizada em modo isocrático com 0,10% TFA/ H_2O . Amostras de lisina e lisinas acetiladas nos grupos α -amina e ϵ -amina foram injetadas para conhecermos o tempo de retenção dos padrões e comparar com o tempo de retenção dos produtos de reação. O pico

com tempo de retenção de 6,8 min corresponde ao padrão de lisina acetilada no grupo α -amina (Ac-Lys-OH) e o pico com tempo de retenção de 15 min corresponde ao padrão de lisina acetilada no grupo ϵ -amina (H-Lys(Ac)-OH) (Figura 8) Embora ambos tenham sido injetados na mesma concentração, observa-se que a lisina acetilada no grupo ϵ -amina (área= $1,8 \times 10^6$ u.a) apresenta uma maior absorbância no comprimento de onda de 210 nm em relação à lisina acetilada no grupo α -amina (área = $9,0 \times 10^5$ u.a). A lisina elui junto ao volume morto da coluna e a lisina acetilada no grupo α -amina apresentou tempo de retenção muito próximo ao volume morto da coluna dificultando a integração da sua área quando baixas concentrações deste aminoácido são injetadas/formadas. Apenas a concentração de lisina acetilada no grupo ϵ -amina (H-Lys(Ac)-OH) pôde ser determinada. Verificou-se uma tendência no aumento da concentração de lisina acetilada no grupo ϵ -amina em função do aumento do pH (Figura 9.B), assim como quando lisina foi tratada com o sistema biacetilo (2,0-10 mM)/peroxinitrito (2,0 mM) (Figura 9.C).

De acordo com os dados obtidos na Figura 9, observa-se uma tendência no aumento da concentração de lisina acetilada no grupo ϵ -amina em função do pH. Quando a reação de lisina (3,2 mM) com biacetilo 2,0 mM/peroxinitrito 2,0 mM foi realizada em pH 6,2 a concentração de lisina acetilada no ϵ -amina foi de $(10,3 \pm 0,2)$ uM, ou seja, 0,32% do total de lisina adicionada ao meio reacional foi acetilada. A elevação do pH para 7,2 e 8,2 resultou no aumento da concentração de H-Lys(Ac)-H para $(11,60 \pm 0,05)$ uM (0,36%) e $(36,9 \pm 0,3)$ uM (1,15%), respectivamente. A acetilação de lisina também aumentou em função do aumento da concentração do biacetilo. Com biacetilo 5,0 mM, o rendimento de produto acetilado foi $(19,4 \pm 0,3)$ uM (0,6%) e com 10 mM, $(28,1 \pm 0,3)$ uM (0,87%). Esses valores são atribuídos apenas à acetilação da lisina no grupo ϵ -amina. Estima-se um valor maior de lisina

acetilada, sendo que o grupo α -amina também é acetilado e este aduto não foi quantificado. Futuros experimentos de quantificação de lisina acetilada nos grupos α e ϵ -amina devem ser realizados por CE-MS dada a boa separação de lisina e os adutos de lisina acetilados como observado na Figura 10. Neste caso, a amostra de lisina (1,0 mg/mL) foi tratada com biacetilo 5,0 mM e peroxinitrito 2,0 mM. O CE-MS foi o melhor método para separar as amostras de lisinas acetiladas tanto no grupo α -amina quanto no ϵ -amina. As amostras não foram quantificadas por esta metodologia por problemas com o nosso equipamento de CE-MS, mas se mostra uma boa alternativa para futuras análises.

Figura 8. (A) Análise por RP/HPLC dos padrões de Ac-Lys-OH e H-Lys(Ac)-OH. O cromatograma corresponde à injeção de 100 μ L da mistura dos padrões, ambos na concentração 0,05 mM. **(B) curva de calibração para H-Lys(Ac)-OH.** Concentrações crescentes de H-Lys(Ac)-OH (4,3 μ M – 0,27 mM) foram injetadas para a construção da curva de calibração. Condições HPLC: 100 μ L das amostras foram injetadas em uma coluna analítica Luna[®] Phenomenex (C₁₈(2), 5 μ m, 100 Å, 250 x 4,6 mm), fluxo de 0,8 mL/min, com separação no modo isocrático com solvente H₂O/ 0,1% TFA. O cromatograma foi adquirido em $\lambda = 210$ nm.

Figura 9. (A) Análise por RP/HPLC da reação de modificação de lisina por biacetilo/peroxinitrito em função do pH. (B) Quantificação de ϵ -acetil lisina (H-Lys(Ac)-OH) em diferentes pHs. O cromatograma corresponde a injeção de 100 μ l das amostras de reação contendo (lisina 0,5 mg/mL) na presença de biacetilo 2,0 mM e peroxinitrito 2,0 mM em tampão fosfato 200 mM em pHs: 6,2; 7,2 e 8,2 ($p < 0,01$ e $n=2$). Condições de RP/HPLC descritas na Figura 8. (C) Quantificação de H-Lys(Ac)-OH em função do aumento da concentração de biacetilo (* $p < 0,01$ e $n=3$; $p < 0,01$ e $n=3$ para C).

Figura 10. Análise por CE-MS da amostra de reação de lisina (H-Lys-OH) 1,0 mM com biacetilo 5,0 mM na presença de peroxinitrito 2,0 mM. **A:** lisina, **B:** lisina acetilada no ϵ -amina (H-Lys(Ac)-OH) e **C:** lisina acetilada no α -amina (Ac-Lys-OH). Condições de CE-MS descritas no item 3.11.

4.5. Caracterização e purificação dos peptídeos brutos sintetizados para estudo da acetilação de lisina

Prosseguindo os estudos da acetilação radicalar de lisina sintetizamos três tetrapeptídeos: H-KALA-OH, H-K(Boc)ALA-OH e Ac-KALA-OH (Esquema 9). O peptídeo H-KALA-OH apresenta os grupos α -amina e ϵ -amina da lisina livres, o peptídeo H-K(Boc)ALA-OH tem um grupo Boc ligado ao grupo ϵ -amina da lisina e o resíduo α -amina livre e, o peptídeo Ac-KALA-OH está acetilado no grupo α -amina, mantendo apenas o grupo ϵ -amina livre. Com isso, objetivamos direcionar a acetilação radicalar aos grupos amina livres dos resíduos de lisina numa cadeia peptídica.

Após a síntese, os peptídeos foram analisados por HPLC acoplado a LC-ESI/MS. Pretendeu-se com este estudo, obter um perfil de separação dos possíveis subprodutos e contaminantes do meio reacional, como a piperidina ($m/z=135,9$) que pode ser observada com tempos de retenção de 7,4 min (Figuras 11, 12 e 13). Os tetrapeptídeos desejados apresentaram: tempo de retenção de 8,2 min e relação $m/z= 402,2$ para o H-KALA-OH (Figura 11); 9,6 min e $m/z= 444,2$ para o Ac-KALA-OH (Figura 12); e 16,9 min e $m/z= 502$ para o H-K(Boc)ALA-OH (Figura 13).

O processo de purificação foi realizado pela coleta de alíquotas de cada peptídeo para posterior liofilização do material. A coleta foi baseada no tempo de retenção obtido em coluna analítica para cada peptídeo pela separação RP/. A purificação foi realizada pela injeção de aproximadamente 5 mL de amostra em coluna semi-preparativa conforme descrito no item 3.10. Os peptídeos liofilizados foram mantidos em geladeira até o uso, sendo diluídos em tampão fosfato 200 mM pH 7.2 ou em água milli-Q para a realização dos experimentos.

Para confirmar a pureza dos peptídeos, estes foram analisados por LC-ESI/MS pela injeção de 10 μ L da amostra em LC-ESI/MS (dados não apresentados). Os cromatogramas obtidos por HPLC, após a purificação, mostram os peptídeos H-KALA-OH, H-K(Boc)ALA-OH e Ac-KALA-OH como únicos produtos da síntese (Figura 14).

Esquema 9. Estrutura dos tetrapeptídeos sintéticos em pH baixo. (A) tetrapeptídeo H-KALA-OH com dois sítios para acetilação na lisina, grupos α -amina e ϵ -amina livres; **(B) tetrapeptídeo H-K(Boc)ALA-OH** com apenas o grupo α -amina da lisina livre sendo o grupo ϵ -amina bloqueado pelo resíduo *Boc* e **(C) tetrapeptídeo Ac-KALA-OH** com o grupo ϵ -amina da lisina livre e o grupo α -amina bloqueado pelo acetila

Figura 11. Análise por LC-ESI/MS do peptídeo H-KALA-OH bruto resultante da síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS). Condições de RP/HPLC: injeção de 50 μ L, coluna Vydac (5 μ m 4,6 x 250 nm), λ :210 nm, fluxo 1,0 mL/min. Solventes A: 0,1% TFA/H₂O, B: 60% ACN/TFA 0,09%, e gradiente linear: 5%-95% B em 30 min. Condições do ESI-MS: capilar 3 kV, cone: 37 kV, modo de ionização: ES⁺. **A:** piperidina, m/z = 136,9; **B:** peptídeo desejado: H-KALA-OH; m/z = 402,2 e **C:** subproduto da reação de síntese, não identificado.

Figura 12. Análise por LC-ESI/MS do peptídeo Ac-KALA-OH bruto resultante da SFPS. Condições de RP/HPLC e ESI/MS como descrito na Figura 11. **A:** piperidina, $m/z = 136,9$; **B:** peptídeo desejado: Ac-KALA-OH; $m/z = 444,1$; **C:** subproduto da reação de síntese, não identificado.

Figura 13. Análise por LC/ESI-MS do peptídeo H-K(Boc)ALA-OH bruto resultante da SPFS. Condições de RP/HPLC e ESI/MS como descrito na Figura 11. **A:** piperidina, $m/z = 136,9$; **B:** peptídeo desejado: H-K(Boc)ALA-OH; $m/z = 502,2$.

Figura 14. Separação cromatográfica dos peptídeos H-KALA-OH, Ac-KALA-OH e H-K(Boc)ALA-OH purificados. Os peptídeos foram diluídos em tampão fosfato 200 mM, pH 7,2, simulando as condições de preparação das amostras de reação. Condições de HPLC: injeção de 50 μ L, coluna da Waters (Symmetry C18, 5 μ m 4,6 x 250 nm), λ 210 nm, fluxo 1,0 mL/min. Solventes A: 0,10% TFA/H₂O, B: 60% ACN/TFA 0,09%, e gradiente linear: 5-95% B em 30 min. (*tampão fosfato).

4.6. Estudo da acetilação do peptídeo H-KALA-OH pelo sistema biacetilo ou metilglioxal/peroxinitrito

Amostras de H-KALA-OH (0,5 mg/mL) foram modificadas pelos sistemas biacetilo ou metilglioxal 5,0 mM na presença de peroxinitrito 2,0 mM. As reações foram analisadas por HPLC e os produtos correspondentes aos picos do cromatograma foram coletados e avaliados por ESI/MS. Amostras de H-KALA-OH e de reações-controle com biacetilo 5,0 mM, metilglioxal 5,0 mM ou peroxinitrito 2,0 mM, assim como as amostras dos sistemas completos, também foram analisadas por LC-ESI/MS após purificação das amostras em HPLC para eliminação do fosfato e liofilização.

A análise do produto foi realizada por injeção direta em ESI/MS do material correspondente pico com tempo de retenção de 12.4 min, obtido pela análise por RP-HPLC (Figura 15). O aduto de H-KALA-OH acetilado foi confirmado pela presença do íon de $m/z = 444$. O espectro de fragmentação do íon de $m/z = 444$ consiste de picos com $m/z = 355$, 224 com maior intensidade e $m/z = 426$, 337, 327, 313, 274, 242, 185, 171, 157 e 129 com menor intensidade (Figura 15 e Apêndice B). **Análise da amostra de H-KALA-OH modificada por biacetilo/peroxinitrito por LC-ESI/MS da amostra purificada revelou que, além do produto com $m/z = 444$ (H-KALA-OH acetilado), outro composto com $m/z = 486$ foi formado, atribuível ao aduto di-acetilado (dado não apresentado).** As fragmentações de H-KALA-OH e Ac-KALA-OH seguem o modelo proposto no Apêndice A e B, respectivamente, os quais foram baseados nos fragmentos obtidos na Figura 15.

A reação de H-KALA-OH com metilglioxal/peroxinitrito apresentou dois produtos de reação com tempos de retenção de 11,2 e 12,0 min com $m/z = 430$ e $m/z = 444$, respectivamente (Figura 16). O íon de $m/z = 430$ apresentou espectro de fragmentação com $m/z = 323$ e 210 de maior intensidade e $m/z = 412$, 394, 341, 313, 228, 182, 157 e 139 de menor intensidade (Apêndice C). O espectro de fragmentação do componente C de $m/z = 444$ (H-KALA-OH acetilado pelo sistema metilglioxal/peroxinitrito; Figura 16) seguiu o padrão de fragmentação do aduto de H-KALA-OH acetilado no grupo α -amina como obtido pelo sistema biacetilo/peroxinitrito (Figura 15). **Análise da amostra por LC-ESI/MS, após prévia purificação e liofilização, indicou a presença do adutos com $m/z = 472$ e 486 correspondente ao peptídeo H-KALA-OH com duas modificações: formilado e acetilado respectivamente (dados não apresentados).**

Figura 15. Análise por RP/HPLC e ESI/MS da reação de modificação do peptídeo H-KALA-OH por biacetilo na presença de peroxinitrito. Cromatograma da amostra de H-KALA-OH (0,5 mg/mL) modificado por biacetilo 5,0 mM na presença de peroxinitrito 2,0 mM. Condições RP/HPLC: descritas no ítem 3.10.a. Condições do ESI/MS: capilar 4,5 kV, saída do capilar 140 V, gás secante 220 °C com fluxo 5 mL/min, modo de ionização: ES⁺. **Espectro de massas do componente A** corresponde ao H-KALA-OH com $m/z = 402$. **Espectro de massas do componente B** corresponde ao produto Ac-KALA-OH com $m/z = 444$.

Figura 16. Análise por RP/HPLC e ESI/MS da reação de modificação do peptídeo H-KALA-OH por metilglioxal na presença de peroxinitrito. Cromatograma da amostra de H-KALA-OH (0,5 mg/mL) modificado por metilglioxal 5,0 mM na presença de peroxinitrito 2,0 mM. Condições RP/HPLC: descritas no ítem 3.10.a. Condições do ESI/MS: como descrito na Figura 15. Componente **A**: H-KALA-OH com $m/z = 402$, **B**: produto de reação HCO-KALA-OH com $m/z = 430$ e **C**: produto de reação Ac-KALA-OH com $m/z = 444$.

4.7. Estudo da formação de Ac-KALA-OH pela reação de H-KALA-OH com biacetilo ou metilglioxal na presença de peroxinitrito

A acetilação do peptídeo H-KALA-OH na porção α -amino-terminal após reação com biacetilo 10,0 mM/peroxinitrito 2,0 mM e metilglioxal 10,0 mM/peroxinitrito 2,0 mM pôde ser confirmada ao utilizar o peptídeo Ac-KALA-OH sintético como padrão. Foi possível estimar a quantidade do aduto acetilado no grupo α -amina de H-KALA-OH por ambos os sistemas ao avaliar a área de Ac-KALA-OH em diferentes concentrações, obtida pela integração dos cromatogramas adquiridos no programa Empower™ 3 da Waters pelo tratamento de dados (Figura 17). Para construir a curva de calibração foi utilizada a 2-metilquinoxalina como padrão interno, que apresentou tempo de retenção de 5,4 min.

Figura 17. Curva de calibração para Ac-KALA-OH obtida por RP/HPLC. Variação da concentração de Ac-KALA-OH de 1,0 uM a 150 uM. Condições de HPLC: injeção de 50 uL, coluna (Symmetry C18, 5 um 4,6 x 250 nm), λ 210 nm, fluxo 1,0 mL/min. solventes A: 0,10% TFA/H₂O, B: 60% ACN/TFA 0,09%, λ 280 nm, fluxo 1,0 mL/min e gradiente linear: 5-95% B em 30 min. Metilquinoxalina foi utilizada como padrão interno.

Figura 18. Formação de Ac-KALA-OH pelo tratamento de H-KALA-OH com os sistemas biacetilo ou metilglioxal/peroxinitrito em função do pH. Perfil da formação de Ac-KALA-OH pelos sistemas **(A)** biacetilo/peroxinitrito e **(B)** metilglioxal/peroxynitrito. Reação de H-KALA-OH (1,25 mM) com biacetilo ou metilglioxal 10,0 mM na presença de peroxinitrito 2,0 mM. Condições de HPLC: como descrito na Figura 17, injeção de 100 uL de amostra (pH 6,2 e 6,4; pH 7,2 e 7,6 não são significativamente diferentes; outros valores, $p < 0,05$ e $n = 2$ para A e pH 6,2 e 6,4 não são significativamente diferentes; outros valores, $p < 0,01$ e $n = 2$ para B).

A reação com biacetilo/peroxinitrito apresentou uma maior concentração do aduto acetilado em pH 8,0 (Figura 18.A). A concentração do aduto acetilado no grupo α -amina da lisina neste pH corresponde a $(706,99 \pm 106,71)$ uM (28,0%). A reação de H-KALA-OH com metilglioxal/peroxinitrito apresentou uma maior concentração do aduto acetilado em pH 7.6 (Figura 18.B). A concentração do aduto acetilado foi de $(73,06 \pm 0,15)$ uM (5,12%). Em pH 7,2 a concentração do aduto acetilado foi de $(377,76 \pm 11,9)$ uM e $(62,12 \pm 16,53)$ uM para biacetilo e metilglioxal, respectivamente. **Em ambos os casos as reações foram conduzidas com a mesma concentração do biacetilo e metilglioxal, assim sendo concluímos que a reação com o biacetilo apresentou maior rendimento.**

4.8. Acetilação do peptídeo Ac-KALA-OH pelo sistema biacetilo ou metilglioxal/peroxinitrito

O peptídeo Ac-KALA-OH apresenta apenas o grupo ϵ -amina da lisina livre para reação de modificação pelo sistema biacetilo ou metilglioxal/peroxinitrito, situação análoga ao que ocorre na cadeia polipeptídica de proteínas. Ao ser tratado com biacetilo 5,0 mM na presença de peroxinitrito 2,0 mM, o peptídeo Ac-KALA-OH (0,5 mg/mL) foi modificado para gerar um produto com tempo de retenção de 14,6 min com $m/z = 486$ assinalável a um aduto acetilado Ac-K(Ac)ALA-OH. Seu espectro de MS/MS do íon de $m/z = 486$ apresentou o padrão de fragmentação de $m/z = 397$ e 284, com maior intensidade, e $m/z = 468$, 369 e 213 com menor intensidade (Figura 19), cuja fragmentação é proposta no Apêndice D. O mesmo aduto acetilado e o mesmo padrão de fragmentação foram observados quando amostra de Ac-KALA-OH foi modificada por metilglioxal 5,0 mM na presença de peroxinitrito 2,0 mM. Em ambos os casos, foi também traçado o espectro MS³ do íon de $m/z = 284$, cuja fragmentação gerou íons de $m/z = 126$ e 84, que caracterizam a presença de lisina acetilada no grupo ϵ -amina.

Figura 19. Análise por RP/HPLC e ESI/MS da reação de modificação do peptídeo Ac-KALA-OH por biacetilo na presença de peroxinitrito. Cromatograma da amostra de Ac-KALA-OH (0,5 mg/mL) modificado por biacetilo 5,0 mM na presença de peroxinitrito 2,0 mM. Condições RP/HPLC: descritas no item 3.10.a. Condições do ESI/MS: capilar 4,5 kV, saída do capilar 140 V, gás secante 220 °C com fluxo 5 mL/min, modo de ionização: ES⁺. Componente **A**: Ac-KALA-OH com $m/z=$ e **B**: produto Ac-K(Ac)ALA-OH com $m/z= 486$.

Figura 20. Análise por RP/HPLC e ESI/MS/MS da reação de modificação do peptídeo Ac-KALA-OH por metilglioxal na presença de peroxinitrito. Cromatograma da amostra de Ac-KALA-OH (0,5 mg/mL) modificado por metilglioxal 5,0 mM na presença de peroxinitrito 2,0 mM. Condições RP/HPLC: descritas no ítem 3.10.a. Condições do ESI/MS: como descrito na Figura 19. Componente **A**: Ac-KALA-OH com m/z = 444 e **B**: produtos Ac-K(HCO)ALA-OH com m/z = 472 e Ac-K(Ac)ALA-OH com m/z = 486.

Como esperado, outro aduto é formado quando metilglioxal foi substituído por biacetilo. O íon de $m/z= 472$ atribuível ao aduto formilado ao ser fragmentado gerou os íons de $m/z= 383, 270$ e 199 com maior intensidade e $m/z= 454, 355, 185, 171$ e 157 com menor intensidade (Figura 20). O Apêndice E apresenta as possíveis estruturas para os fragmentos observados. O peptídeo Ac-KALA-OH de $m/z= 444$ apresentou espectro de fragmentação de $m/z= 355$ e 224 com maior intensidade e $m/z= 426, 337, 327, 310, 242, 206, 185, 171, 157$ e 129 (Apêndice B), igual ao obtido pelos produtos de acetilação de H-KALA-OH pelos sistemas biacetilo/peroxinitrito e metilglioxal/peroxinitrito (Figuras 15 e 16, respectivamente).

4.9. Acetilação do peptídeo H-K(Boc)ALA-OH pelo sistema biacetilo/peroxinitrito

O peptídeo H-K(Boc)ALA-OH apresenta apenas o grupo α -amina livre para acetilação. Como esperado, o aduto acetilado foi obtido quando o peptídeo (0,5 mg/mL) foi tratado com biacetilo 5,0 mM na presença de peroxinitrito 2,0 mM. (Figuras 21). O peptídeo H-K(Boc)ALA-OH de $m/z= 502$ ao ser fragmentado apresenta como principal íon o fragmento de $m/z= 402$ correspondente à perda do resíduo Boc (Figura 21). A fragmentação subsequente corresponde ao peptídeo H-KALA-OH cujo espectro de fragmentação apresenta $m/z= 384, 295$ e 129 com maior intensidade. O aduto acetilado Ac-K(Boc)ALA-OH ($m/z= 544$) apresentou como espectro de MS/MS os fragmentos $m/z= 500$ e 444 , sendo este o mais intenso e corresponde à perda do grupo Boc (Figura 21), gerando o fragmento Ac-KALA-OH, cuja fragmentação consecutiva forma os íons de $m/z= 355$ e 224 com maior intensidade e $m/z= 426, 337, 327, 310, 274, 242, 206, 185, 171, 157$ e 129 , como o

apresentado nas Figuras 15 e 19. Os fragmentos obtidos nos espectros de MS/MS seguem as estruturas propostas nos Apêndices A e B.

Figura 21. Análise por RP/HPLC e ESI/MS da reação de modificação do peptídeo H-K(Boc)ALA-OH por biacetilo na presença de peroxinitrito. Cromatograma da amostra de H-K(Boc)ALA-OH (0,5 mg/mL) modificado por biacetilo 5,0 mM na presença de peroxinitrito 2,0 mM. Condições RP/HPLC: descritas no item 3.10.a. Condições do ESI/MS: capilar 4,5 kV, saída do capilar 140 V, gás secante 220 °C com fluxo 5 mL/min, modo de ionização: ES⁺. Componente **A**: H-K(Boc)ALA-OH com $m/z= 502$ e **B**: corresponde ao produto Ac-K(Boc)ALA-OH com $m/z= 548$.

4.10. Estudo da acetilação de isoleucina, leucina e metionina pelo sistema biacetilo/peroxinitrito

Leucina, isoleucina e metionina foram acetiladas pelo sistema biacetilo/peroxinitrito e os produtos das reações foram separados e purificados por RP/HPLC (Figuras 22, 23 e 24, respectivamente). Os espectros de ESI/MSⁿ foram obtidos após coleta dos produtos correspondente aos picos obtidos nos cromatogramas e injeção direta dos mesmos em espectrômetro de massas. Os espectros de fragmentação apresentaram o íon imônio correspondente como principal fragmento, sendo o de $m/z = 86$ para leucina e isoleucina – isômeros de posição (Figuras 22 e 23, respectivamente), e $m/z = 104$ para metionina (Figura 24) (Cantú e Carrilho, 2008; James, 2001).

Os adutos de leucina e isoleucina acetilados, ao serem fragmentados, formam os íons de $m/z = 156$, 132, 128 e 86. Em ambos os casos, o fragmento de $m/z = 132$ corresponde à perda do grupo acetila pelo íon de $m/z = 174$. Para confirmar a formação do aduto acetilado, aproximadamente 5 mL de mistura de reação de isoleucina (1,0 mg/mL) com biacetilo 5,0 mM e peroxinitrito 2,0 mM foram purificadas por HPLC e apenas o material correspondente ao aduto acetilado foi coletado e liofilizado. A amostra foi ressuspensa em 600 uL de D₂O para análise por RMN-¹H (Apêndice F). O espectro de RMN-¹H da isoleucina acetilada apresenta os seguintes deslocamentos químicos e constantes de acoplamento: H2 (4,2 ppm, 1H, d, $J = 5,94$ Hz), H3 (1,91 ppm, 1H, m), H3¹ (0,95 ppm, 3H, d, $J_{3'1-3} = 6,82$ Hz), H4a (1,46 ppm, 1H, m), H4b (1,23 ppm, 1H, m), H5 (0,91 ppm, 3H, t, $J_{5,4} = 7,40$ Hz) e Hβ' (2,06 ppm, 3H, s).

Figura 22. Análise por RP/HPLC e ESI/MS da reação de modificação de leucina por biacetilo na presença de peroxinitrito. Cromatograma de leucina (0,5 mg/mL) modificado por biacetilo 5,0 mM na presença de peroxinitrito 2,0 mM. Condições RP/HPLC: descritas no item 3.12.a. Condições do ESI/MS: capilar 4,0 kV, saída do capilar 102,3 V, gás secante 300 °C com fluxo 5 mL/min, modo de ionização: ES^+ . Componente **A**: leucina com $m/z = 132$ e **B**: leucina acetilada com $m/z = 174$.

Figura 23. Análise por RP/HPLC e ESI/MS da reação de modificação de isoleucina por biacetilo na presença de peroxinitrito. Cromatograma da amostra de isoleucina (0,5 mg/mL) modificado por biacetilo 5,0 mM na presença de peroxinitrito 2,0 mM. Condições RP/HPLC: descritas no item 3.12.a. Condições do ESI/MS: como descrito na Figura 22. Componente **A**: isoleucina com $m/z = 132$ e **B**: isoleucina acetilada com $m/z = 174$.

Figura 24. Análise por RP/HPLC e ESI/MS da reação de modificação de metionina por biacetilo na presença de peroxinitrito. Cromatograma da amostra de metionina (0,5 mg/mL) modificado por biacetilo 5,0 mM na presença de peroxinitrito 2,0 mM. Condições RP/HPLC: descritas no item 3.12.a. Condições do ESI/MS: como descrito na Figura 22. Componente **A**: metionina com $m/z = 150$ e **B**: metionina acetilada com $m/z = 192$.

A metionina acetilada ($m/z = 192$) apresentou o espectro de MS/MS com fragmentos de $m/z = 174$, 146 e 104 (Figura 24). O íon de $m/z = 146$ corresponde ao íon imônio de metionina acetilado e sua fragmentação forma o íon imônio de metionina pela perda de 42 Da. A acetilação do grupo α -amina foi confirmada após análise por RMN- ^1H do aduto acetilado em D_2O . Neste experimento, o aduto acetilado foi obtido pela coleta do material correspondente, pela purificação de aproximadamente 10 mL de reação de metionina (1,0 mg/mL) com biacetilo 5 mM e peroxinitrito 2,0 mM. O espectro de RMN- ^1H da metionina acetilada em D_2O apresenta os seguintes deslocamentos químicos e constantes de acoplamento: H2 (4,2 ppm, 1H, dd, $J_{2,3a} = 8,50$ Hz e $J_{2,3b} = 4,56$ Hz), H3a (2,00 ppm, 1H, m), H3b (2,15 ppm, 1H, m), H4 (2,6 ppm, 2H, m), H6 (2,05 ppm, 3H, s) e H β' (2,13 ppm, 3H, s) (Apêndice G). Os picos com deslocamento químico de 1,19 e 3,67 ppm correspondem ao acetato. Recordando o mecanismo proposto por Massari *et al.*, 2008, o acetato é produto da reação de captação do radical acetila pelo oxigênio molecular dissolvido na mistura reacional (Esquema 2).

4.11. Estudo da reação de fenilalanina e o sistema biacetilo/peroxinitrito ou metilglioxal/ peroxinitrito

Fenilalanina foi modificada pelos sistemas biacetilo/peroxinitrito e metilglioxal/peroxinitrito. O aduto de fenilalanina acetilada foi observado em ambos os tratamentos (Figuras 25 e 26). O aduto formilado, como esperado, foi observado apenas pela modificação de fenilalanina no tratamento com o sistema metilglioxal/peroxinitrito (Figura 26).

As amostras foram preparadas pela reação de fenilalanina (0,5 mg/mL) na presença de biacetilo 5,0 mM e peroxinitrito 2,0 mM e o perfil de separação por RP/HPLC é

apresentado na Figura 25. A fenilalanina apresenta tempo de retenção de 13,7 min e a fenilalanina acetilada, 23,8 min. Os materiais correspondentes a ambos os picos foram coletados e analisados por injeção direta em ESI/MS/MS. A fenilalanina ($m/z=166$) apresentou apenas o íon imônio de $m/z=120$ como produto da fragmentação. Por sua vez, a fragmentação de fenilalanina acetilada ($m/z=208$) apresentou a relação de $m/z=190, 166, 162$ e 120 . O fragmento de $m/z=162$ corresponde ao íon imônio acetilado de fenilalanina e o fragmento de $m/z=166$ corresponde à perda direta do grupo acetila (COCH_3) pelo íon de $m/z=208$, confirmando a presença da fenilalanina acetilada (Figura 25). O material correspondente ao aduto de fenilalanina acetilada foi purificado por RP/HPLC e após liofilização a amostra foi diluída em D_2O para análise por RMN- ^1H como apresentado no Apêndice H. Aproximadamente 10 mL de reação de fenilalanina (1,0 mg/mL) com biacetilo 5,0 mM na presença de peroxinitrito 2,0 mM foram purificados e liofilizados. O espectro de RMN- ^1H apresenta os seguintes deslocamentos químicos e constantes de acoplamento: H_α (4,51 ppm, 1H, dd, $J_{\alpha,\beta^a}=8,9$ Hz e $J_{\alpha,\beta^b}=5,0$ Hz), $\text{H}\beta^a$ (3,22 ppm, 1H, dd, $J_{\beta^a,\beta^b}=14,1$ Hz e $J_{\beta^a,\alpha}=13,8$ Hz), $\text{H}\beta^b$ (2,96 ppm, 1H, dd, $J_{\beta^b,\beta^a}=14,1$ Hz e $J_{\beta^b,\alpha}=13,8$ Hz), H_2 e H_6 (7,31 ppm, 2H, m), H_3 e H_5 (7,39 ppm, 2H, m), H_4 (1,4 ppm, 1H, t) e $\text{H}\beta'$ (1,94 ppm, 3H, s), assim como no espectro de RMN- ^1H da fenilalanina acetilada, os picos em 1,20 e 3,68 ppm correspondem ao acetato (Apêndice H).

Como observado no cromatograma da Figura 26, o aduto acetilado de fenilalanina também foi observado quando o biacetilo foi substituído por metilglioxal. Neste experimento, a fenilalanina apresentou tempo de retenção de 13,7 min e a fenilalanina acetilada (pico C, Figura 26), 23,7 min; e o aduto formilado de fenilalanina, 23,1min (pico B, Figura 26). O aduto formilado foi caracterizado pela

injeção direta em ESI/MS/MS e apresentou $m/z = 194$ e gerou fragmentos de $m/z = 176, 166, 148$ e 120 .

Figura 25. Análise por RP/HPLC e ESI/MS/MS da reação de modificação de fenilalanina por biacetilo na presença de peroxinitrito. Cromatograma da amostra de fenilalanina (0,5 mg/mL) modificado por biacetilo 5,0 mM na presença de peroxinitrito 2,0 mM. Condições RP/HPLC: descritas no item 3.12.a. Condições do ESI/MS: capilar 4,0 kV, saída do capilar 102,3 V, gás secante 300 °C com fluxo 5 mL/min, modo de ionização: ES⁺. **Componente A:** fenilalanina $m/z = 166$ e **B:** fenilalanina acetilada com $m/z = 208$.

Figura 26. Análise por RP/HPLC e ESI/MS/MS da reação de modificação de fenilalanina por metilglioxal na presença de peroxinitrito. Cromatograma da amostra de fenilalanina (0,5 mg/mL) modificado por metilglioxal 5,0 mM na presença de peroxinitrito 2,0 mM. Condições RP/HPLC: descritas no ítem 3.12.a. Condições do ESI/MS: como descrito na Figura 25. Componente **A**: fenilalanina com $m/z=166$ (dado não apresentado) **B**: fenilalanina formilada com $m/z=160$ e **C**: fenilalanina acetilada com $m/z=208$ (dado não apresentado). Os espectros de massas e o perfil de MS/MS para o componente A e B apresenta mesmo perfil de fragmentação aos obtidos na Figura 25. O aduto acetilado foi confirmado pela injeção de padrão comercial de fenilalanina acetilada (dados não apresentados).

A formação de acetil-fenilalanina pelos sistemas biacetilo/peroxinitrito e metilglioxal/peroxinitrito foi quantificada utilizando-se os cromatogramas extraídos dos dados do detector PDA em 210 nm. A identidade do pico foi confirmada pela injeção do padrão comercial de fenilalanina acetilada, o qual também foi utilizado para a construção da curva-padrão. Soluções de fenilalanina acetilada foram

preparadas em diferentes concentrações (3,8 μ M - 0,24 mM) e 50 μ L destas amostras foram injetadas no HPLC, a curva-padrão de fenilalanina acetilada foi obtida a partir da integração dos picos em 210 nm (Figura 27).

A formação de fenilalanina acetilada aumenta quando biacetilo é adicionado em concentrações crescentes (Figura 28 A). Quando peroxinitrito 2,0 mM foi adicionado ao meio reacional contendo fenilalanina 2,4 mM e biacetilo 1,0; 2,0 e 5,0 mM a concentração do aduto acetilado formado foi de $(12,1 \pm 0,4)$; $(26,1 \pm 1,6)$ e $(75,9 \pm 6,3)$ μ M, respectivamente. Como pode ser observado, para as mesmas concentrações do composto carbonílico, a formação do aduto acetilado pelo sistema biacetilo/peroxinitrito é superior àquela pelo sistema metilglioxal/peroxinitrito (Figura 28. B). Quando peroxinitrito 2,0 mM foi adicionado ao meio reacional contendo fenilalanina 2,4 mM e metilglioxal 1,0; 2,0 e 5,0 mM a concentração do aduto acetilado formado foi de $(0,91 \pm 0,18)$; $(1,45 \pm 0,02)$; e $(1,54 \pm 0,02)$ μ M, respectivamente.

Figura 27. A: Análise por RP/HPLC do padrão de fenilalanina acetilada (Ac-Phe-OH) em concentrações crescentes (3,8 μ M - 0,24 mM). Condições RP-HPLC: descritas no item 3.12.a. e B: curva padrão de fenilalanina acetilada obtida pela integração das áreas do pico de Ac-Phe-OH em 210 nm.

Figura 28. Reação de fenilalanina (2,4 mM) com peroxinitrito 2,0 mM e A: biacetilo (1,0 – 5,0 mM) e B: metilglioxal (1,0 – 5,0 mM). Condições de RP/HPLC: injeção de 50 μ L, coluna (Luna C18(2), 5 μ m 250 x 4,6 nm), λ :210 nm, fluxo 1,0 mL/min. solventes A: 0,1% TFA/H₂O, B: 60% ACN/TFA 0,09%, fluxo 1,0 mL/min e gradiente linear: 5%-60% B em 30 min. ($p < 0,01$ e $n = 3$ para A; $p < 0,05$ e $n = 3$ para B).

4.12. Estudo da reação de triptofano com o sistema biacetilo ou metilglioxal/peroxinitrito

O triptofano foi modificado por peroxinitrito na presença e ausência de biacetilo como observado no cromatograma da Figura 29. Os materiais correspondentes aos picos A, B e C foram coletados e analisados por injeção direta em ESI/MS/MS e correspondem ao triptofano, triptofano nitrado (NO₂-Trp) e triptofano acetilado, respectivamente (Figura 29). O triptofano nitrado apresentou as fragmentações de $m/z = 233$ (maior intensidade), 204 e 176 (menor intensidade), sugerindo a nitração na posição 6 como descrito por Ishii *et al.*, 2007. O componente B também apresentou espectro de absorção (Figura 29) similar ao de 6-NO₂-triptofano como relatado por Yamakura e Ikeda, 2005.

O triptofano acetilado (pico C, Figura 29) apresentou as fragmentações de $m/z = 229$ e 201 de maior intensidade e $m/z = 205$, 188, 159 e 130 de menor intensidade. O fragmento de $m/z = 205$ sugere a perda do grupo acetila (42 u.m.a.) pelo íon de $m/z = 247$. Amostra de triptofano (2,03 mM) modificada por biacetilo 5,0 mM e peroxinitrito 2,0 mM também foi purificada por RP/HPLC para eliminar o fosfato e após liofilização, foi ressuspensa em menor volume possível para análise por LC/ESI-MS. Neste estudo, diversos adutos de triptofano nitrado e oxidados foram observados além do 6-NO₂-triptofano e o triptofano acetilado (Apêndice K). Esses produtos de reação (nitração, nitrosilação e oxidação) são característicos da reação de triptofano com peroxinitrito (Nuriel *et al.*, 2011) e também foram observados pelo tratamento de triptofano com o sistema biacetilo/peroxinitrito. Como indicado no Apêndice K, observa-se adutos com aumento de 45 u.m.a. (adição de um grupo NO₂), 32 u.m.a. (dois átomos de oxigênio), 16 u.m.a. (um átomo de oxigênio), 4 u.m.a. (oxidação) e combinações destes, que podem ser atribuídos ao dihidroxitriptofano ($m/z = 237$), 1-nitroso-triptofano ($m/z = 234$), 5-hidroxi-6-nitrotriptofano ($m/z = 266$), N-formilquinurenina ($m/z = 237$), quinurenina ($m/z = 209$), 2-hidroxi-triptofano e a sua forma tautomérica *oxindol-3-alanine* ($m/z = 221$) como relatado por Yamakura e Ikeda, (2005). Apenas aduto como aumento de $m/z = 42$ u.m.a. correspondente ao triptofano acetilado foi observado em adicional aos dados de Yamakura e Ikeda. Aproximadamente 10 mL de reação de triptofano (2,0 mM) com biacetilo 5 mM e peroxinitrito 2,0 mM foram purificados para coleta dos adutos nitrado e acetilado, os quais após liofilização foram ressuspensos em 600 uL de D₂O para estudo por RMN-¹H.

O espectro de RMN-¹H de NO₂-triptofano foi obtido após tratamento dos dados com supressão do pico da água e apresenta os seguintes deslocamentos químicos e

constantes de acoplamento: H- α (4,08 ppm, 1H, dd, $J_{\alpha,\beta^a} = 7,5$ Hz e $J_{\alpha,\beta^b} = 5,2$ Hz), H- β^a (3,50 ppm, 1H, dd, $J_{\beta^a,\beta^b} = 15,6$ e $J_{\beta^a,\alpha} = 7,6$ Hz), H- β^b (3,39 ppm, 1H, dd, $J_{\beta^b,\beta^a} = 15,6$ Hz e $J_{\beta^b,\alpha} = 7,6$ Hz), H-2 (7,65 ppm, 1H, s), H-4 (7,81 ppm, 1H, d, $J_{4,5} = 8,9$ Hz), H-5 (8,05 ppm, 1H, dd, $J_{5,4} = 8,9$ Hz e $J_{5,7} = 2,1$ Hz), H-7 (8,49 ppm, 1H, d, $J_{7,5} = 2,1$ Hz) (Apêndice I).

A região de 8,6 – 7,0 ppm do espectro de RMN- ^1H do NO_2 -triptofano corresponde à porção aromática, tal como o relatado por Yamakura e Ikeda, 2005. A presença do triplete com $\delta = 7,36$ ppm sugere a formação de isômeros de nitração na posição H-7 ou H-4. Considerando a nitração na posição 7, temos a seguinte atribuição: H5 (7,36 ppm, 1H, t, $J_{5,4} = J_{5,6} = 8,1$ Hz), H4 (8,06 ppm, dd, 1 H, $J_{4,5} = 8,0$ Hz e $J_{4,6} = 0,9$ Hz) e H6 (7,92 ppm, 1H, dd, $J_{6,5} = 8,1$ Hz e $J_{6,4} = 0,9$ Hz), H α (3,91 ppm, 1 H, dd, $J_{\alpha,\beta^a} = 8,6$ Hz e $J_{\alpha,\beta^b} = 6,0$ Hz), H β^a (3,34 ppm, 1H, dd, $J_{\beta^a,\beta^b} = 15,1$ Hz e $J_{\beta^a,\alpha} = 8,6$ Hz) H β^b (3,69 ppm, 1H, dd, $J_{\beta^b,\beta^a} = 15,1$ Hz e $J_{\beta^b,\alpha} = 6,0$ Hz).

De acordo com Nuriel *et al.* (2011) e Sala *et al.* (2004) a formação de 6- NO_2 triptofano é favorecida em pH neutro em relação ao triptofano nitrado nas posições 4, 5 e 7. Para o experimento de coleta do material correspondente ao aduto de triptofano nitrado foi preparada a reação de adição de peroxinitrito 2,0 mM à mistura contendo triptofano 2,0 mM e biacetilo 5,0 mM. Considerando que a formação de NO_2 é aumentada quando, ao meio reacional, é adicionado peroxinitrito na presença de biacetilo se comparada a peroxinitrito isolado (Esquema 2), espera-se que a nitração de triptofano ocorra em diferentes posições como relatado por Sala *et al.* (2004).

Figura 29. Análise por RP/HPLC e ESI/MS/MS da reação de modificação de triptofano por biacetilo na presença de peroxinitrito. Cromatograma da amostra de triptofano (2,0 mM) modificado por biacetilo 5,0 mM na presença de peroxinitrito 2,0 mM. Condições RP/HPLC: descritas no item 3.12.a. Condições do ESI/MS: capilar 4,0 kV, saída do capilar 102,3 V, gás secante 300 °C com fluxo 5 mL/min, modo de ionização: ES⁺. Componente **A**: triptofano $m/z=205$, **B**: 6-NO₂-triptofano com $m/z=250$ e **C**: triptofano acetilado com $m/z=247$.

Figura 30. Análise por RP/HPLC e ESI/MS/MS da reação de modificação de triptofano por metilglioxal na presença de peroxinitrito. Cromatograma da amostra de triptofano (2,0 mM) modificado por biacetil 5,0 mM na presença de peroxinitrito 2,0 mM. Condições RP/HPLC: descritas no item 3.12.a. Condições do ESI/MS: como descrito na Figura 29. Componente **A**: triptofano, **B**: 6-NO₂-triptofano com m/z = (dado não apresentado), **C**: triptofano formilado com m/z =247 e **D**: triptofano acetilado com m/z = (dado não apresentado).

O aduto nitrado obtido no estudo por RMN-¹H é uma mistura de isômeros, sendo esperado o 6-NO₂-Trp em maior concentração (pico B, Figura 29; Apêndice I).

O espectro de RMN-¹H do triptofano acetilado apresenta os seguintes deslocamentos químicos e constantes de acoplamento: H_α (4,55 ppm, 1H, dd, $J_{\alpha,\beta a}$ = 7,8 Hz e $J_{\alpha,\beta b}$ = 4,9 Hz), H_{βa} (3,17 ppm, 1H, dd, $J_{\beta a,\alpha}$ = 7,8 Hz e $J_{\beta a,\beta b}$ = 14,7 Hz), H_{βb} (3,38 ppm, 1H, dd, $J_{\beta b,\alpha}$ = 4,9 Hz e $J_{\beta b,\beta a}$ = 14,9 Hz), H1 (7,71 ppm, 1H, d, $J_{1,2}$ = 8.0 Hz), H2 (7,24ppm, 1H, d, $J_{2,1}$ = 8.0 Hz), H4 (7,71 ppm, 1H, d, $J_{4,5}$ = 10,0 Hz), H5 (7,19

ppm, 1H, t, $J = 7,0$ Hz), H6 (7,26 ppm, 1H, t, $J = 7,0$ Hz), H7 (7,52 ppm, 1H, d, $J = 8,0$ Hz) e H β' (7,24 ppm, 1H, s) (Apêndice J).

O sistema metilglioxal 5,0 mM na presença de peroxinitrito 2,0 mM leva à acetilação do grupo α -amina de triptofano e formação de 6-NO₂-triptofano (Figura 30). O aduto formilado ($m/z = 233$) característico da reação de metilglioxal com peroxinitrito também foi observado. Ao ser fragmentado, o íon de $m/z = 233$ gerou os fragmentos de $m/z = 215$, 205, 187 e 130. O fragmento de $m/z = 187$ apresentou maior intensidade e corresponde ao íon imônio de triptofano acrescido de 28 Da (HCO).

O aduto de triptofano acetilado formado pela reação de triptofano (2,0 mM) com diferentes concentrações de biacetilo e metilglioxal (1,0 - 5,0 mM)/peroxinitrito (0,5 - 2,0 mM) foi quantificado utilizando-se cromatogramas extraídos dos dados do detector PDA em 210 nm. A identidade do pico foi confirmada pela injeção do padrão comercial de triptofano acetilado, o qual também foi utilizado para a construção da curva-padrão. Soluções de triptofano acetilado foram preparadas em diferentes concentrações (3,8 μ M - 0,24 mM) e 50 μ L destas amostras foram injetadas no HPLC. A curva-padrão de triptofano acetilado foi obtida a partir da integração dos picos em 210 nm (Figura 31).

Observou-se que a concentração do aduto de triptofano acetilado aumenta em função do aumento da concentração de biacetilo ou metilglioxal (1,0 - 5,0 mM) quando a concentração de peroxinitrito é mantida constante (2,0 mM) (Figuras 32 A e B, respectivamente). Considerando que a concentração de biacetilo ou metilglioxal é 5,0 mM e a de peroxinitrito 2,0 mM, a concentração de triptofano acetilado corresponde a $(33,0 \pm 2,8)$ μ M e $(1,50 \pm 0,04)$ μ M, respectivamente. Assim sendo, aproximadamente 1,63% do triptofano adicionado ao meio reacional foi acetilado pelo sistema biacetilo/peroxinitrito e 0,07% do triptofano é acetilado quando biacetilo

é substituído por metilglioxal. Quando a concentração de biacetilo é de 2,0 mM e 1,0 mM, mantendo peroxinitrito 2,0 mM, a concentração de triptofano acetilado é (11 ± 4) e $(5,5 \pm 0,1)$ uM, respectivamente (Figura 32.A.). Substituindo metilglioxal por biacetilo, a concentração de triptofano acetilado é de $(0,90 \pm 0,03)$ e $(0,60 \pm 0,06)$ uM, respectivamente (Figura 32.A.) Novamente, ressaltamos que, em meio aquoso, metilglioxal acha-se quase totalmente na forma mono e dihidratada, não reativa, enquanto o biacetilo acha-se presente na forma livre, em equilíbrio com sua forma monohidrata, em concentração muito superior (cerca de 30%). Ou seja, a concentração de biacetilo na forma livre é muito superior à de metilglioxal, o que explica maior rendimento de acilação do triptofano por biacetilo na presença de peroxinitrito.

O 6-NO₂-triptofano é relatado pela literatura como produto de reação de triptofano e peroxinitrito (Alvarez *et al.*, 1996; Sala *et al.*, 2004; Yamakura e Ikeda, 2006) e a tendência é que sua concentração aumente quando triptofano reage com biacetilo ou metilglioxal na presença de peroxinitrito (Figura 33), sendo o NO₂ um dos produtos de reação da adição nucleofílica de peroxinitrito a biacetilo ou metilglioxal como já relatado anteriormente (Esquemas 2 e 10). A Figura 33 mostra o aumento da área do pico correspondente ao aduto de 6-NO₂-triptofano oriundo de peroxinitrito ou do sistema metilglioxal/peroxinitrito.

Figura 31. A: Análise por RP/HPLC do padrão de triptofano acetilado em diferentes concentrações (3,2 μM - 0,2 mM) e curva padrão. Condições RP/HPLC: descritas no item 3.12.a. e B: curva padrão de triptofano acetilado obtida pela integração da área em 210 nm.

Figura 32. Formação de acetil-triptofano pela reação de triptofano (2,03 mM) com peroxinitrito 2,0 mM na presença de A: biacetilo (5,0 – 1,0) mM e B: metilglioxal (5,0 – 1,0) mM. Condições de HPLC: injeção de 50 uL, coluna (Luna C18(2), 5 μm 250 x 4,6 nm), λ:210 nm, fluxo 1,0 mL/min. solventes A: 0,1% TFA/H₂O, B: 60% ACN/TFA 0,09%, fluxo 1,0 mL/min e gradiente linear: 5%-60% B em 30 min. (p<0,01 e n=3 para A e B).

Figura 33. Formação de nitrotriptofano em função da concentração de metilglioxal. **A:** área correspondente ao pico de NO₂-Trp-OH. Reações de modificação de triptofano (2,03 mM) por metilglioxal (0,0 – 5,0 mM) na presença de peroxinitrito 2,0 mM e **B:** concentração de 6-NO₂-Trp-OH determinados pelo coeficiente de extinção molar de 3320 M⁻¹cm⁻¹ em 420 nm. Reações de modificação de triptofano (2,03 mM) por metilglioxal (0,0 – 5,0 mM) na presença de peroxinitrito 2,0 mM. (p<0,01 e n=3 para A; p<0,05 e n=3 para B).

4.13. Estudo da reação de tirosina com o sistema biacetilo ou metilglioxal/peroxinitrito

A modificação de tirosina pelo sistema biacetilo/peroxinitrito resultou na formação de 3-nitrotirosina e tirosina acetilada como observado no perfil de RP/HPLC apresentado na Figura 34. O material correspondente aos picos A, B e C foram coletados e analisados por injeção direta em ESI/MS/MS. Os materiais coletados correspondem à tirosina (m/z= 182), 3-nitrotirosina (m/z= 227) e tirosina acetilada (m/z= 224), respectivamente.

Figura 34. Análise por RP/HPLC e ESI/MS/MS da reação de modificação de tirosina por biacetilo na presença de peroxinitrito. Cromatograma da amostra de triptofano (0,5 mg/mL) modificado por biacetilo 5,0 mM na presença de peroxinitrito 2,0 mM. Condições RP/HPLC: descritas no item 3.12.a. Condições do ESI/MS: capilar 4,0 kV, saída do capilar 102,3 V, gás secante 300 °C com fluxo 5 mL/min, modo de ionização: ES⁺. Componente **A**: tirosina com $m/z=182$, **B**: 3-nitro-tirosina com $m/z=227$ e **C**: tirosina acetilada com $m/z=224$.

A fragmentação de tirosina apresentou os íons de $m/z = 165$ e 136 (imônio). O íon de $m/z = 227$ ao ser fragmentado apresentou como fragmento de maior intensidade o imônio nitrado de tirosina de $m/z = 181$ característico da 3-nitrotirosina (Yi *et al.*, 2000). O aduto de tirosina acetilada apresentou como fragmento o íon imônio acetilado de tirosina com $m/z = 178$.

Observa-se que a formação de 3-nitrotirosina é aumentada quando tirosina é tratada com peroxinitrito na presença de biacetilo (Figuras 34 e 35), resultado da liberação de NO_2 como proposto no mecanismo de adição nucleofílica de peroxinitrito a biacetilo proposto por Massari *et al.*, 2008 (Esquema 2).

Como pode ser observado na Figura 35, houve um aumento de 3-nitrotirosina em função da concentração de peroxinitrito. As concentrações de 3-nitrotirosina eram correspondentes a $(27,2 \pm 5,2)$; $(52,3 \pm 4,6)$ e $(93,5 \pm 0,4)$ μM quando peroxinitrito 0,5; 1,0 e 2,0 mM foram adicionados ao meio reacional contendo tirosina 2,2 mM, respectivamente. Concentrações superiores de 3-nitrotirosina $(42,6 \pm 6,1)$; $(64,8 \pm 5,6)$ μM e $(0,108 \pm 0,005)$ mM foram determinadas quando peroxinitrito 0,5; 1,0 e 2,0 mM foram adicionados ao meio reacional contendo tirosina 2,2 mM e biacetilo 2,0 mM, respectivamente.

Figura 35. Formação de 3-nitrotirosina por peroxinitrito e sistema biacetoilo/peroxinitrito. A: Curva padrão de 3-nitrotirosina e espectro de absorvância de 3-nitrotirosina obtido pela integração das áreas correspondente ao aduto nitrado em 210 nm após análise das amostras de reação de tirosina (0,5 mg/mL) com biacetoilo (1,0 – 2,0 mM) e peroxinitrito (0,5 -2,0 mM) por RP/HPLC. Condições RP/HPLC: descritas no item 3.12.a. **B:** Os valores de 6-nitrotirosina foram determinados pela integração das áreas do pico correspondente ao aduto. (* $p < 0,01$, $p < 0,05$ e $n = 3$ para B; $p < 0,01$ e $n = 3$ para C).

4.14. Estudo da acetilação de 2'-desoxiguanosina e 2'-desoxiadenosina pelo sistema biacetoilo/peroxinitrito

As amostras de 2'-desoxiguanosina e 2'-desoxiadenosina (2,0 mM) foram modificadas pelo sistema biacetoilo 5,0 mM/peroxinitrito 6 mM, sendo o peroxinitrito

adicionado em três alíquotas de 2,0 mM seguido da correção do pH com ácido fosfórico 1,0 M para garantir que a solução não sofresse grande alteração do pH pela adição da solução de básica de peroxinitrito. Após estudo dos adutos de 2'-desoxiguanosina pelo sistema biacetilo/peroxinitrito por RP/HPLC (dados não apresentados) as amostras foram analisadas por LC/ESI-MS. Primeiramente o estudo foi realizado avaliando a perda neutra (NL = Neutral Loss) de 116 Da correspondente à perda da desoxirribose. O aduto de acetilação apresenta $m/z=310$ e de acordo com os experimentos realizados, são formados em baixas quantidades (Figura 36). Outro estudo foi realizado na tentativa de avaliar o produto iônico de $m/z=310$. Neste caso também obtivemos os fragmentos de MS/MS dos adutos com $m/z=310$ (Figura 37), com isso foi possível identificar quatro adutos de acetilados. Após análise dos espectros de MS/MS dos adutos, podemos notar que dois adutos com tempo de retenção de 14,6 min e 18,1 min (picos A e D, Figura 37) foram acetilados na desoxirribose, como indicado pelo fragmento de $m/z=152$, correspondente a perda neutra de (116 + 42) u.m.a. Os outros dois adutos, com tempo de retenção de 14,8 min e 17,3 min (picos B e C, Figura 37), apresentam fragmento de $m/z=194$, correspondente à perda apenas da desoxirribose (116 u.m.a.). Os dados de avaliação da perda neutra mostraram-se insuficientes na avaliação da acetilação de 2'-desoxirribose dado que a desoxirribose pode também ser acetilada, como observado pelo estudo do produto iônico. O estudo por LC-ESI/MS mostrou-se importante dado ao baixo rendimento dos adutos acetilados, os quais não foram observados quando o estudo por HPLC/UV foi realizado.

Adutos derivados de 2'-desoxiguanosina atacada diretamente por biacetilo foram encontrados na amostra tratada com biacetilo/peroxinitrito. Como controle de reação 2'-desoxiguanosina modificada por biacetilo foi analisada por LC-ESI/MS (Apêndice L)

pela avaliação da perda neutra de 116 u.m.a. Como pode ser observado, os adutos da adição de biacetilo a 2'-deoxiguanosina são consistentes com os relatados com o metilglioal e glioal (Awada e Dedon 2001; Frischmann, *et al.*, 2005; Olsen, *et al.*, 2005) (Apêndice M).

A 2'-desoxiadenosina foi modificada pelo sistema biacetilo/peroxinitrito como observado na Figura 38 e apresentou apenas um produto de acetilação, mostrando que a 2'-desoxiguanosina é menos reativa quando comparado à 2'-desoxiguanosina. Neste caso, não foram observados adutos de biacetilo com a 2'-desoxiguanosina.

Figura 36. Análise por LC-ESI/MS/MS da reação de modificação de 2'-desoxiguanosina pelo sistema biacetilo/peroxinitrito. Condições LC-ESI/MS como descrito no item 3.11, a separação cromatográfica e os dados de massas foram obtidos pelo monitoramento da perda neutra de 116 u.m.a. Foi injetado 50 μ L da reação de 2'-desoxiguanosina (1,0 mg/mL) modificada por biacetilo 5,0 mM e peroxinitrito 6,0 mM.

Figura 37. Análise por LC-ESI/MS/MS da reação de modificação 2'-desoxiguanosina pelo sistema biacetilo/peroxinitrito. A separação cromatográfica e os dados de massas foram obtidos pelo monitoramento do produto iônico de $m/z=310$. Foram injetados 50 μ L da mistura de 2'-desoxiguanosina (1,0 mg/mL) modificada por biacetilo 5,0 mM e peroxinitrito 6,0 mM. Condições LC-ESI/MS como descrito no item 3.11.

Figura 38. Análise por LC-ESI/MS/MS da reação de modificação de 2'-desoxiadenosina pelo sistema biacetilo/peroxinitrito. Condições LC-ESI/MS como descrito no item 3.11, a separação cromatográfica e os dados de massas foram obtidos pelo monitoramento da perda neutra de 116 u.m.a. Foram injetados 50 uL da mistura de reação de 2'-desoxiguanosina (1,0 mg/mL) modificada por biacetilo 5,0 mM e peroxinitrito 2,0 mM.

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os resultados apresentados nesta Tese confirmam que, o radical acetila gerado pelo sistema biacetilo/peroxinitrito e metilglioxal/peroxinitrito pode ser adicionado a grupos amina de aminoácidos e nucleobases. Um destaque especial foi dado à lisina, compreendida como principal alvo de acetilação enzimática de proteínas em processos pós-traducionais, pois além do α -amina, o seu ϵ -amina grupo (Figura 2, 4, 5 e 6) pode ser modificado quando este aminoácido está presente no interior da cadeia polipeptídica de uma proteína.

O estudo inicial da acetilação do aminoácido L-lisina foi realizada por CE-MS, mas num primeiro momento, o estudo não nos permitiu identificar a posição da acetilação pois os dados de fragmentação apresentavam a presença dos fragmentos de $m/z= 129$ (acetilado no α -amino) e $m/z= 126$ (acetilado no ϵ -amino). Posteriormente, tal fato, foi atribuído a não separação dos dois adutos acetilados de lisina. Na tentativa de direcionar acetilação para o grupo ϵ -amina da lisina em estudos-modelo, foram realizados experimentos com os derivados de lisina Z-Lys-OMe e Ac-Lys-OMe. Ambos os aminoácidos foram acetilados pelo sistema biacetilo/peroxinitrito, como confirmado pelo aumento de 42 u.m.a. e pelo espectro de fragmentação dos adutos Z-Lys(Ac)OMe (Figura 2) e Ac-Lys(Ac)-OMe (Figura 3) que apresentam o íon de $m/z= 126$ característico de lisina acetilada no grupo ϵ -amina (Yalcin e Harrison, 1996, Fenaille *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2002). Os mesmos resultados foram obtidos pelo tratamento com o sistema metilglioxal/peroxinitrito (Figuras 5 e 6). Os mesmos experimentos de acetilação foram realizados com os peptídeos modelos H-KALA-OH, Ac-KALA-OH e H-K(Boc)ALA-OH na tentativa de direcionar a acetilação da lisina. A reação de H-KALA-OH com biacetilo na presença de peroxinitrito

apresentou como principal produto o aduto acetilado no grupo α -amina. Estudo por LC-ESI/MS da amostra previamente purificada por RP/HPLC apresentou além do produto com $m/z= 444$ (acetilado) outro composto com $m/z= 486$ formado em menor extensão, atribuível ao aduto di-acetilado (dado não apresentado). Como o principal produto da reação de H-KALA-OH foi o Ac-KALA-OH, a sua formação foi avaliada em diferentes pHs (6,2-8,2) (Figura 18.). Observou-se uma tendência de aumento do peptídeo acetilado pelo sistema biacetilo/peroxinitrito em pH 8,0 (Figura 18.A.) e pelo sistema metilglioxal/peroxinitrito em pH 7,6 (Figura 18.B.). Como comentado em Resultados, pHs superiores a 7,2 favorecem a produção de radical acetila e daí o rendimento de acetilação do aminoácido devido à conjunção de três fatores; aumento da concentração do nucleófilo peroxinitrito ($pK_a \sim 7$), diminuição da concentração de $H_2PO_4^-$ ($pK_a \sim 7.2$), o catalisador da adição nucleofílica de peroxinitrito à carbonila do substrato (Massari *et al.*, 2008) e aumento da população do peptídeo com o grupo amina desprotonado (aumento do caráter nucleofílico), o que favorece a sua reação com o radical acetila.

As análises dos peptídeos (H-KALA-OH, Ac-KALA-OH e H-K(Boc)ALA-OH) e os respectivos adutos acetilados e formilados foram realizados por ESI/MS/MS com analisador Ion trap e portanto com baixa energia de colisão (low-energy CID). Neste caso, os fragmentos que foram observados são oriundos da quebra da ligação peptídica, os íons da série b que contém a porção n-terminal do peptídeo, que foram sugeridos pelos Apêndices (A-E). Outros fragmentos observados nas Figuras (15 e 16, 19-21) incluem a perda de água e amônia pelos íons b e estes foram designados por b-18 u.m.a e b-17 u.m.a, respectivamente; e perda de CO pelos íons b, representados por b-28 u.m.a, similar ao íons da série a. Em todos os espectros de fragmentação dos peptídeos em estudo, observa-se a formação de um único

produto de clivagem interna com $m/z = 185$ que corresponde ao íon $(y_1b_1)_2$ que corresponde a clivagem na posição 1 (fragmentação tipo íon b) da porção amino terminal e clivagem na posição 1 (fragmentação tipo íon y) da porção carboxi terminal, e com 2 resíduos. Nas análises de fragmentação dos peptídeos e peptídeos acetilados ou formilados, o íon imônio de lisina não foi observado como era esperado de acordo com dados da literatura (James, 2001).

Os vinte aminoácidos testados nesta Tese foram acetilados no grupo α -amina por ambos os sistemas biacetilo/peroxinitrito e metilglioxal/peroxinitrito, como demonstrado nos estudos por CE-MS/MS (dados não apresentados). Apenas a lisina apresentou acetilação na cadeia lateral (Figura 10). Nestes resultados foi possível separar os dois adutos de lisina acetilado e confirmar a diferença nos espectros de fragmentação quando lisina acetilada no α -amina ou no ε -amina (Esquema 8). Mas os resultados obtidos por CE-MS não confirmaram os dados da literatura (van der Vliet *et al.*, 1994; Lyman *et al.*, 1996; Yamakura e Ikeda, 2006; Ishii *et al.*, 2007; Nuriel *et al.*, 2011), nos quais aminoácidos como tirosina e triptofano são nitrados e oxidados por peroxinitrito. Apenas os adutos acetilados foram observados quando estes aminoácidos foram tratados com o sistema biacetilo ou metilglioxal/peroxinitrito; o mesmo ocorreu quando realizado o tratamento destes apenas com peroxinitrito (dados não apresentados). Em ambos os casos, não foram detectados os adutos nitrados (3-nitrotirosina e 6-nitrotriptofano) os quais são esperados em maior rendimento quando comparados aos produtos de oxidação que também deveriam ser identificados. A formação dos adutos nitrados de triptofano e tirosina deveriam ser identificados por CE-MS, pois a sua formação era sugerida pela coloração amarelada da solução observada após a reação com biacetilo/peroxinitrito ou metilglioxal/peroxinitrito, indicativo da formação do aduto

nitrado (Koppenol, 1998). Os subprodutos de reação só foram observados pelas análises das amostras em RP/HPLC, quando foi possível separar os adutos acetilados, nitrados e oxidados de triptofano (Figura 29 e apêndice J) e tirosina (Figura 34).

A produção de NO₂-triptofano e 3-nitrotirosina são encontradas em níveis aumentados quando tirosina e triptofano são tratados com os sistemas biacetilo/eroxinitrito ou metilglioxal/eroxinitrito (Figuras 33. e 35) se comparado ao tratamento com peroxinitrito isolado. O aumento da formação destes adutos nitrados está relacionado ao fato de o radical NO₂ ser subproduto do ataque nucleofílico do peroxinitrito ao composto carbonílico como descrito por Massari *et al.* (2008 e 2009), Uppu *et al.*, 1997 e Nakao,*et al.*,1999. A formação de 6-nitrotriptofano para o tratamento de triptofano (2,03 mM) com peroxinitrito (2,0 mM) foi de (0,15±0,01) mM e aumentou para (0,17±0,01) mM (13,3%) e (0,22±0,01) mM (46,6%), quando a mesma concentração de triptofano foi modificada por peroxinitrito (2,0 mM) na presença de metilglioxal 2,0 mM e 5,0 mM, respectivamente (Figura 33.B.). Um rendimento ainda maior foi observado para a formação de 3-nitrotirosina pelo sistema biacetilo/eroxinitrito. O tratamento de tirosina (2,76 mM) com peroxinitrito (2,0 mM) resultou na formação de (0,09±0,02) mM de 3-nitrotirosina, sendo que a mesma concentração de tirosina ao ser modificada por biacetilo 2,0 mM e 5,0 mM na presença de peroxinitrito (2,0 mM) resultou na formação de (0,108±0,05) mM e (0,187±0,001) mM caracterizando um aumento de 20% e 107,7% no conteúdo de 3-nitrotirosina, respectivamente (Figura 35.C.).

Esquema10. Mecanismo de reação de metilglioxal com peroxinitrito. O metilglioxal, assim como o biacetilo, sofre adição nucleofílica de peroxinitrito, seguida de homólise e clivagem β , que geram radical dióxido de nitrogênio, **(1)** radical acetila e ânion formato, **(2a)** radical formila e ânion acetato, **(2a)** radical metila e ânion glioxalato (Adaptado de Massari *et al.*, 2010).

Os estudos da modificação de aminoácidos, derivados de aminoácidos e peptídeos pelo sistema metilglioxal/peroxinitrito por RP/HPLC e LC-ESI/MS mostraram que, surpreendentemente, houve formação do aduto formilado além do aduto acetilado. A geração dos radicais formila, acetila e metila é de fato prevista pelo mecanismo descrito por Massari *et al.*, 2010, mas nos estudos realizados anteriormente, apenas o aduto acetilado de lisina foi descrito como produto de reação de lisina com o sistema biacetilo/metilglioxal. As amostras dos vinte aminoácidos modificados pelo sistema metilglioxal/peroxinitrito não apresentaram a formação do aduto formilado

quando as análises foram realizadas por CE-MS, neste caso apenas os adutos acetilados foram detectados (dados não apresentados).

Além disso, os experimentos de EPR spin-trapping realizados para sequestrar radical formila gerado por glioxal/peroxinitrito, utilizando o captador MNP, não foram bem sucedidos. Atribuímos a não detecção deste radical à instabilidade do aduto MNP-HCO, o qual só foi identificado quando se utilizou técnica em fluxo constante (Heinzel *et al.*, 1989).

Nesta Tese, foi possível demonstrar a formilação dos aminoácidos Z-Lys-OMe e Ac-Lys-OMe (Figuras 5 e 6, respectivamente) pelo sistema metilglioxal/peroxinitrito, talvez por constituírem adutos mais estáveis que MNP-HCO, o que ampliaria a relevância potencial desta Tese com vistas à acilação radicalar de proteínas.

O presente estudo revela uma tendência de aumento no rendimento do produto acetilado pelo sistema biacetilo/peroxinitrito quando comparado ao sistema metilglioxal/peroxinitrito. Embora a reação de metilglioxal com peroxinitrito ocorra com $k_2=1,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ pH 7,4, 25° C (Massari *et al.*, 2010) e a reação de biacetilo com peroxinitrito, $k_2=1,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ pH 7,4, 25° C (Massari *et al.*, 2008), o fator determinante para o maior rendimento da reação de acetilação pelo biacetilo está associado à hidratação deste quando comparado ao metilglioxal como pode ser observado na estimativa da formação de Ac-KALA-OH pelo tratamento de H-KALA-OH com ambos os sistemas. O biacetilo existe em equilíbrio dinâmico com sua forma monohidratada (76,7%, menos reativa) (Yang *et al.*, 1999). Confrontado ao metilglioxal que apresenta apenas 1% na sua forma ceto-aldeídica (forma mais reativa), sendo predominante o equilíbrio entre suas formas mono-hidratada (56-62%) e di-hidratada (38-44%) (Nemet *et al.*, 2004). O efeito do pH (Figuras 9. A. e 18) e é consistente com o relatado por Massari *et al.* (2008), ao verificar que a

reação de biacetilo com peroxinitrito tem perfil de pH em forma de sino, com máximo em pH 7,2, aposto à curva de dissociação do ácido peroxinitroso a peroxinitrito ($pK_a = 6.5-7.3$) e àquela de dissociação de $H_2PO_4^-$ ($pK_a = 7.2$), catalisador da reação de adição nucleofílica de peroxinitrito à carbonila. O deslocamento da curva para valores maiores de pH é acrescido ao aumento da desprotonação dos grupos amina da lisina (peptídeo H-KALA-OH apresenta $pI \sim 7,74$; $pK_a(\alpha\text{-amina}) = 8,95$ e $pK_a(\epsilon\text{-amina}) = 10,53$, sendo duas ordens de grandeza inferior ao valor de pI calculado, $pI = (8,95 + 10,53)/2 = 9,74$).

Dando continuidade à investigação iniciada por Massari *et al.* (2008), estudamos a acetilação de 2'-deoxiguanosina pelo sistema biacetilo/peroxinitrito por RP/HPLC-UV/Vis e LC-ESI/MS. Os resultados de RP/HPLC/UV/Vis não foram promissores (dados não apresentados), pois diversos produtos de reação presentes na amostra de 2'-deoxiguanosina modificada por biacetilo/peroxinitrito também eram observados na reação controle de 2'-deoxiguanosina e biacetilo, indicativos da adição do próprio biacetilo aos grupos amina da 2'-deoxiguanosina, posteriormente confirmados pela análise por LC-ESI/MS. Nas nossas condições experimentais, a presença de dois adutos acetilados de $m/z = 310$ foi observada pelo estudo por LC-ESI/MS quando monitorado a perda neutra de 116 u.m.a. (Figura 36). Sabendo que a acetilação pode ocorrer na porção desoxiribose (Massari *et al.*, 2008) foi realizado o monitoramento do produto iônico de $m/z = 310$, sendo possível identificar quatro adutos de 2'-deoxiguanosina acetilados. Os espectros de fragmentação dos adutos acetilados sugerem que dois deles apresentam a acetilação do anel da desoxiribose pela presença do fragmento de $m/z = 152$ assinaláveis à perda da desoxiribose acetilada (Figura 37). Os outros dois adutos acetilados são oriundos da adição do grupo acetila na guanosina e a fragmentação gera o íon de $m/z = 194$ atribuível à

perda da desoxirribose, tal como previamente observado nos experimentos de perda neutra de 116 u.m.a. (Figuras 36 e 37). Os espectros de fragmentação seguem o perfil descrito por Nukaya *et al.* (1990) e Massari *et al.* (2008). Os adutos acetilados apresentaram baixo rendimento como consequência das reações secundárias do biacetilo com a nucleobase (ApêndiceL).

A 2'-desoxiadenosina apresentou apenas um aduto acetilado de $m/z = 297$ após tratamento com o sistema biacetilo/peroxinitrito (Figura 38). Novos estudos devem ser realizados na tentativa aumentar o rendimento da reação, identificar e caracterizar novas posições de acetilação na 2'-desoxiguanosina e na 2'-desoxiadenosina. É importante lembrar que modificações, principalmente na porção da base purínica/pirimídica, em especial no grupo amina exocíclico, podem acarretar em alteração no pareamento entre as bases resultando em transições que caracterizam o início do processo de mutação se não forem reparadas. O estudo da acetilação radicalar destas bases e do próprio DNA devem ser realizados na tentativa de verificar se a acetilação é uma modificação que altera o pareamento entre as bases, caso esta não seja uma modificação corrigida durante o processo de tradução/transcrição. A formação de aduto acetilado de guanosina também é relatada por Nukaya (1990 e 1993) e Tada (1996), os quais sugerem uma possível atuação desta modificação como agente de mutação.

Como perspectiva no estudo com nucleosídeos, experimentos devem ser realizados para identificar a posição da acetilação, que possivelmente deve ocorrer no grupo amino exocíclico da 2'-desoxyguanosina e 2'-desoxiadenosina. A acetilação também pode ocorrer em outro grupo amino do anel purínico (N7), ou ainda nos C4, C5, O6 e C8. Nitração e oxidação destas posições do anel purínico já foram relatadas pelo tratamento de 2'-desoxiguanosina com peroxinitrito. A presença dos radicais HO[•] e

$\text{CO}_3^{\cdot-}$ derivados do peroxinitrito acarretam a oxidação via 1-eletron de guanosina produzindo o radical cátion correspondente. Uma vez formado, o radical cátion da guanosina ($\text{pK}_a=3.9$) deprotona em pH fisiológico formando o radical neutro de guanosina (Steenken, 1989), o qual apresenta densidade eletrônica do elétron desemparelhado nas posições O6, C5 e C8. Os adutos nitrados são formados pela combinação do radical de guanina com o radical $\cdot\text{NO}_2$ ($E^\circ=1,04\text{V}$; Stanbury, 1989) e o radical de guanina nas posições C8 e C5, formando a 8-nitro-guanina (8- NO_2G) e 5-nitro-4-guanidinoidantoína (Niles *et al.*, 2001), respectivamente. O peroxinitrito também se adiciona ao cátion intermediário de guanina formando o aduto peroxo-derivado correspondente (posições C5 e C8). Em ambos os casos, após clivagem da ligação O-O e eliminação de radical $\cdot\text{NO}_2$, formam-se os radicais alcóxila correspondentes (posições C5 e C8). O primeiro sofre reações subsequentes que resultam na abertura do anel purínico (Douki e Cadet, 1996), e o segundo, na formação de 8-oxo-guanosina (Douki e Cadet, 1996; Niles *et al.*, 2006; Yermilov *et al.*, 1995).

A acetilação de 2-desoxicitidina também deve ser estudada, pois este nucleosídeo apresenta um grupo amino exocíclico assim como a 2'-desoxiguanosina e a 2'-desoxiadenosina, que pode ser o alvo de modificação por acetilação radicalar pelo tratamento com os sistemas biacetilo/ peroxinitrito e metilglioxal/peroxinitrito. Dados da literatura mostram que a 2'-deoxicitidina sofre oxidações por espécies reativas como os radicais $\text{HO}^\cdot$ e $\text{CO}_3^{\cdot-}$ que, resultam na eliminação ou modificação do grupo amino exocíclico, alterando a propriedade de pareamento da citosina, causando transição desta para timina (C→T) durante a replicação (Tremblay *et al.*, 2007, Wagner e Cadet, 2010).

A acetilação radicalar proposta nesta Tese pode modificar os grupos amina exocíclico de 2'-desoxiguanosina e 2'-desoxiadenosina como sugerem os experimentos realizados (Figuras 36, 37 e 38). Sabendo que acetilação radicalar do DNA uma modificação que ocorre no grupo amino exocíclico, o qual participa do pareamento entre as bases; se esta modificação não for reparada durante o processo de replicação, o aduto acetilado pode causar transições de bases e se apresentar como resultado promissor no processo de mutação. Novos experimentos devem ser realizados na tentativa de aumentar o rendimento dos adutos acetilados de 2'-desoxiguanosina e 2'-desoxiadenosina. Os mesmos devem ser isolados para posterior identificação da posição de acetilação. Espera-se que esta modificação também ocorra na 2'-desoxicitidina, reações que devem ser adicionalmente investigadas, dado o crescente interesse no estudo de adutos de 2'-desoxicitidina no processo de mutação. Como controle de reação, os adutos com biacetilo, metilglioxal, nitrados e oxidados também devem ser identificados e caracterizados.

Os estudos desta Tese mostraram que os sistemas biacetilo/peroxinitrito e metilglioxal/peroxinitrito geram radicais acetila e formila que podem ser adicionados a grupos amina de biomoléculas. Acetilação na posição ϵ -amina de lisina nos derivados deste aminoácido e nos peptídeos sintetizados fortalece a nossa hipótese de que, o sistema biacetilo/peroxinitrito e metilglioxal podem principalmente acetilar resíduos de lisina internos na cadeia polipeptídica de proteínas (não como aminoácido amino-terminal como nos peptídeos modelo utilizados). Estes resultados fundamentam a idéia de que os sistemas biacetilo/peroxinitrito e metilglioxal/peroxinitrito estudado nesta Tese têm o potencial de agir como fonte endógena de acetilação não-enzimática de proteínas *in vivo*, e sugerem que, em condições fisiopatológicas, o acúmulo destes compostos dicarbonílicos e

peroxinitrito podem resultar na acetilação/formilação de proteínas além dos processos de nitração, oxidação e formação de adutos de condensação/bases de Schiff já bem conhecidos. A acetilação radicalar de proteínas podem ocorrer em resíduos de lisina que são acetilados enzimaticamente, podendo assim ser reparados, mas podem ocorrer adicionalmente em resíduos de lisina que não sejam reconhecidos pelas enzimas desacetilases, caracterizando assim uma modificação não reparada, fato que pode alterar o destino/função celular desta proteína.

Como perspectivas este projeto vislumbra o estudo da acilação de proteínas e DNA pelos sistemas biacetilo/peroxinitrito e metilglioxal/peroxinitrito. Dando continuidade a utilização de peptídeos, novas sínteses devem ser realizadas em colaboração com o grupo da Prof. Dr. Maria Terêsa Machini, na tentativa de alterar o microambiente na proximidade da lisina, com inserção de grupos ácidos e aromáticos para avaliar o comportamento da acetilação, formilação e também nitração, nitroação e oxidações. Outros peptídeos de importância biológica também devem ser utilizados para este estudo, sendo estes sintetizados ou obtidos comercialmente.

Crescente importância vem sendo dada ao estudo de inflamação das vias respiratórias ocasionado pela exposição a vapores de biacetilo (Morgan *et al.*, 2008; Larsen *et al.*, 2009), o que seria um interessante modelo de avaliação de atuação do sistema biacetilo/peroxinitrito como agente modificador de proteínas atrelado ao acúmulo desta dicetona e ao modelo de inflamação no qual o peroxinitrito pode ser gerado.

Estudos iniciais com macrófagos (dados não apresentados) indicaram que a formação de 3-nitrotirosina e proteínas acetiladas são superiores quando tratados com peroxinitrito na presença de biacetilo versus peroxinitrito isolado e acetilação basal, indicando que o mecanismo de reação de biacetilo ou metilglioxal/peroxinitrito

leva à formação dos radicais NO_2 e acetila (Esquemas 2 e 10). A utilização de macrófagos ativados, simulando um processo inflamatório no qual o peroxinitrito pode ser formado, seria um interessante modelo para avaliar a reação de peroxinitrito com biacetilo ou metilglioxal e sua capacidade de ambos os sistemas atuarem como agente modificador de proteínas.

A utilização de geradores de peroxinitrito como SIN-1 (Singh *et al.*, 1998) podem ser empregados como uma fonte de peroxinitrito na tentativa de aumentar o rendimento da reação. Nos experimentos relatados nesta Tese o biacetilo ou metilglioxal sempre estavam em concentração superior ou próxima a do peroxinitrito e em ambas as situações não eram totalmente consumidos pelo peroxinitrito adicionado ao meio reacional (dados não apresentados). Sabe-se que os sistemas biológicos são compartimentalizadas e a reação entre os compostos podem ser favorecidas dependendo do ambiente celular no qual estes se encontram. Assim sendo, embora a concentração de metilglioxal, biacetilo e peroxinitrito no meio celular sejam baixas, a compartimentalização e fluxo contínuo destes, devem ser considerados como fator importante para o rendimento destas reações.

6. REFERÊNCIAS

- Allfrey, V.G., Faulkner, R. e Mirskey, A.E. (1964) Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* vol. 51, p. 786-794.
- Alvarez, B., Rubbo, H., Kirk, M., Barnes, S., Freeman, B.A. e Radi, R. (1996) Peroxynitrite-dependent tryptophan nitration. *Chem. Res. Toxicol.* vol. 9, p. 390-396.
- Arriba, S.G., Krügel, U., Regenthal, R., Vissienon, Z., Verdaguer, E., Lewerenz, A., Jordá-García, E., Pallas, M., Camins, A., Münch, G., Nieber, K. e Allgaier, C. (2006) Carbonyl stress and NMDA receptor activation contribute to methylglyoxal neurotoxicity. *Free Radic. Biol. Med.* vol. 40, p. 779-790.
- Arribas-Lorenzo, G. e Morales, F.J. (2010) Analysis, distribution, and dietary exposure of glyoxal and methylglyoxal in cookies and their relationship with other heat-induced contaminants. *J. Agric. Food. Chem.* vol. 58, p. 2966-2972.
- Awada, M. e Dedon, P.C. (2001) Formation of the 1,N2-glyoxal adduct of deoxyguanosine by phosphoglycolaldehyde, a product of 3'-deoxyribose oxidation in DNA. *Chem. Res. Toxicol.* vol.14, p. 1247-1253.
- Barros, A., Rodrigues, J.A., Almeida, P.J. e Oliva-Teles, M.T. (1999) Determination of glyoxal, methylglyoxal, and diacetyl in selected beer and wine, by HPLC with UV spectrophotometric detection, after derivatization with o-phenylenediamine. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* vol. 22, p. 2061-2069.
- Bartlett, D., Church, D.F., Bounds, P.L. e Koppenol, W.H. (1994) The kinetics of the oxidation of L-ascorbic acid by peroxynitrite. *Free Radic. Biol. Med.* vol. 18, p. 85-92.
- Bartowsky, E.J. e Henschke, P.A. (2004) The 'buttery' attribute of wine – diacetyl – desirability, spoilage and beyond. *Int. J. Food Microbiol.* vol. 96, p. 235-252.

Beckman, J.S., Beckman, J.S., Chen, J., Marshall, P.M. e Freeman, B.A. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* vol. 87, p. 1620-1624.

Bednarski, W., Jedrychowski, L., Hammond, E.G. e Nikolov, Z.L. (1989) A method for the determination of α -dicarbonyl compounds. *Dairy Sci.* vol. 72, p. 2474-2477.

Berndsen, C.E., Albaugh, B.N., Tan, S. e Denu, J.M. (2007) Catalytic mechanism of a myst family histone acetyltransferase. *Biochemistry* vol. 39, p. 623-629.

Bielski, B.J.H., Cabelli, D.E., Arudi, R.L. e Ross, A.B. (1985) Reactivity of $\text{HO}_2/\text{O}_2^{\cdot-}$ radicals in aqueous solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* vol 14, p. 1041-1100.

Bird, M.I., Nunn, P.B. e Lord, L.A.J. (1984) Formation of glycine and aminoacetone from L-threonine by rat liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* vol. 802, p. 229-236.

Blough, N.V e Zafiriou, O.C. (1985) Reaction of superoxide with nitric oxide to form peroxynitrite in alkaline aqueous solution. *Inorg. Chem.* vol. 24, p. 3502-3504.

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

Cantú, M.D. e Carrilho, E. (2008) Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. *Quim. Nova*, vol. 31, p. 669-675.

Casazza, J.P., Felver, M.E. e Veech, R.L. (1984) Metabolism of acetone in rat. *J. Biol. Chem.* vol. 259, p. 231-236.

Chaplen, F.W.R., Fahl, W.E. e Cameron, D.C. (1996) Effect of endogenous methylglyoxal on Chinese hamster ovary cells growth in culture, *Cytotechnology* vol. 22, p. 3–42).

Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielse, M.L., Rehman, M., Walter, T.C., Olsen, J.V. e Mann, M. (2009) Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* vol. 325, p. 834 – 840.

Cress, W.D. e Seto, E. (2000) Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. *J. Cell. Physiol.* vol. 184, p. 1-16.

De Revel, G., Pripis-Nicolau, L., Barbe, J. C. e Bertrand, A. (2000) The detection of α -dicarbonyl compounds in wine by formation of quinoxaline derivatives *J. Sci. Food Agric.* vol. 80, p. 102-108.

Denicola, A., Freeman, B.A., Trujillo, M. e Radi, R. (1996) Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: Kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations. *Arch. Biochem. Biophys.* vol. 333, p. 49-58.

Denicola, A., Souza, J.M. e Radi, R. (1998) Diffusion of peroxynitrite across erythrocytes membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* vol. 95, p. 3566-3571.

Douki, T e Cadet, J.(1996) Peroxynitrite mediated oxidation of purine bases of nucleosides and isolated DNA. *Free Radic. Res.* vol. 24, p. 369–380.

Dubuisson, M., Stricht, D.V., Clippe, A., Nauser, T., Kissner, R., Koppenol, W.H., Rees, J.F. e Knoops, B. (2004) Human peroxiredoxin 5 is a peroxynitrite reductase. *FEBS Letters* vol. 571, p. 161-165.

Durrin, L.K., Mann, R.K., Kayne, P.S. e grunstein, M. (1991) Yeast histone H4 N-terminal sequence is required for promoter activation in vivo. *Cell.* vol. 65, p. 1023-1031.

Dutra, F., Knudsen, F.S., Curi, D. e Bechara, E.J.H. (2001) Aerobic oxidation of aminoacetone, a threonine catabolite: Iron catalysis and coupled iron release from ferritin. *Chem. Res. Toxicol.* vol. 14, p. 1323-1329.

Fedan, J.S., Dowdy, J.A., Fedan, K.B. e Hubbs, A.F. (2006) Popcorn worker's lung: In vitro exposure to diacetyl, an ingredient in microwave popcorn butter flavoring, increases reactivity to methacholine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* vol. 215, p. 17-22.

Fenaille, F., Tabet, J. e Guy, P.A. (2004) Study of peptides containing modified lysine residues by tandem mass spectrometry: precursor ion scanning of hexanal-modified peptides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* vol.18, p. 67-76.

Ferreira, A.C.S., Reis, S., Rodrigues, C., Oliveira, C. e Pinho, P.G. (2007) Simultaneous determination of ketoacids and dicarbonyl compounds, key Maillard intermediates on the generation of aged wine aroma. *J. Food Sci.* vol. 72: p. S314-318.

Fielden, E.M., Roberts, P.B., Bray, R.C., Lowe, D. J., Mautner, G.N., Rotilio, G., Calabrese, L. (1974) Mechanism of action of superoxide dismutase from pulse radiolysis and electron paramagnetic resonance. Evidence that only half the active sites function in catalysis. *J. Biochem.* vol. 139, p. 49-60.

Finnin, M.S., Donigian, J.R., Cohen, A., Richon, V.M., Rifkind, R.A., Marks, P.A., Breslow, R. e Pavletich, N.P. (1999) Structure of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* vol. 401, p. 188-193.

Frischmann, M., Bidmon, C., Angerer, J. e Pischetsrieder, M. (2005) Identification of DNA adducts of methylglyoxal. *Chem. Res. Toxicol.* vol. 18, p. 1586-1592.

Floris, R., Piersma, S.R., Yang, G., Jones, P. e Wever, R. (1993) Interaction of myeloperoxidase with peroxynitrite. *Eur. J. Biochem.* vol. 215, p.767-775.

Frischmann, M., Bidmon, C., Angerer, J. e Pischetsrieder, M. (2005) Identification of DNA Adducts of Methylglyoxal *Chem. Res. Toxicol.* vol. 18, p. 1586-1592.

Fujioka, K. e Shibamoto, T. (2006) Determination of toxic carbonyl compounds in cigarette smoke. *Environm. Toxicol.* vol. 21, p. 47-54.

Glozak, M.A., Sengupta, N., Zhang, X. e Seto, E. (2005) Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* vol. 363, p. 15-23.

Gnad, F., Ren, S., Cox, J., Olsen, J.V., Macek, B., Kumar, C. e Mann, M. (2007) PHOSIDA (phosphorilation site database): Management, structural and evolutionary investigation, and prediction of phosphosites. *Genome Biol.* vol. 8, p. R250-R250.

Goldstein, S. e Czapski, G. (1995) The reaction of NO^* with O_2^{*-} and HO_2^* : a pulse radiolysis study. *Free Radic. Biol. Med.* vol. 19, p. 505-510.

Gow, A., Duran, D., Thom, S.R. e Ischiropoulos, H. (1996) Carbon dioxide enhancement of peroxynitrite-mediated protein nitration. *Arch. Biochem. Biophys.* vol. 333, p. 42-48.

Groves, J.T. e Marla, S.S. (1995) Peroxynitrite-induced DNA strand scission mediated by manganese porphyrin. *J. Am. Chem. Soc.* vol. 117, p. 9578-9579.

Guarente, I. e Picard, F. (2005) Caloric restriction – the SIR2 connection. *Cell* vol. 120, p. 473-482.

Haigis, M.C. e Guarente, I. (2006) Mammalian sirtuins – emerging roles in physiology, aging, and caloric restriction. *Genes Dev.* vol. 20, p. 2913-2921.

Halliwell, B. e Gutteridge, J.M.C. (2007) Free Radicals in Biology and Medicine. Biosciences Oxford: Oxford Univ. Press 4^aEd., Capítulo 3 - Antioxidant defences: endogenous and diet derived, p.82.

Harber, P., Saechao, K. e Boomus, C. (2006) Diacetyl-induced lung disease. *Toxicol. Rev.* vol. 25, p. 261-272.

Heinzel, A., Holze, R., Hamann, C.H. e Blum, J.K. (1989) The electrooxidation of methanol and formaldehyde at a platinum electrode: a SEESR study of radical intermediates-I. *Eletrochim. Acta* vol. 34, p. 657-661.

Hirschey, M.D., Shimazu, T., Goetzman, E., Jing, E., Schwer, B., Lombard, D.B., Grueter, C.A., Harris, C., Biddinger, S., Ilkayeva, O.R., Stevens, R.D., Li, Y., Saha, A.K., Ruderman, N.B., Bain, J.R., Newgard, C.B., Farese Jr., R.V., Alt, F.W., Kahn, C.B. e Verdin, E. (2010) SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation. *Nature* vol. 466, p. 121-125.

Hong, L., Schroth, G.P., Mattewa, H.R., Yau, P. e Bradbury, E.M. (1993) Studies of the DNA binding prpterties of histone H4 amino terminus. *J. Biol. Chem.* vol. 268, p. 305-314.

Houk, K.N., Condroski, D.R. e Pryor, W.A. (1996) Radical and concerted mechanisms in oxidations of amines, sulfides, and alkenes by peroxyxynitrite, peroxyxynitrous acid, and the peroxyxynitrite-CO₂ adduct: density functional theory transition structures and energetic. *J. Am. Chem. Soc.* vol. 118, p. 13002-13002.

Huang, W.Y. e Tang, J. (1972) Modification of arginyl residue in pepsin by 2,3-butanedione. *J. Biol. Chem.* vol. 247, p. 2704-2710.

Hughes, M.N. e Nicklin, H.G. (1968) The chemistry of peroxonitrites. Part I. The kinetics of decomposition of peroxyxynitrous acid. *J. Chem. Soc. (A)*, p. 450-453.

Huie, R.E. e Padmaja, S. (1993) The reaction of NO with superoxide. *Free Radical Res. Commun.* vol. 18, p. 195-199.

Iakoucheva, L.M., Radvojac, P., Brown, C.J., O'Conner, T.R., Sikes, J.G., Obradovic, Z. e Dunker, A.K. (2004) The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation. *Nucleic Acids Res.* vol. 32, p.1037-1049.

Imai, S., Armstrong, C.M., Kaeberlein, M. e Guarente, L. (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* vol. 403, p. 795-800.

Isenberg, I. (1979) Histones. *Ann Rev. Biochem.* vol. 48, p. 159-191.

Ishii, Y., Ogara, A., Katsumata, T., Umemura, T., Nishikawa, A., Iwasaki, Y., Saito, K., Hirose, M. e Nakazawa, H. (2007), Quantification of nitrated tryptophan in proteins and tissue by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* vol. 44, p. 150-159.

IUPAC -Nomenclature of inorganic chemistry recommendations. Oxford, London, Blackwell; 1990:1.

IUPAC (1984) Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. *Biochem. J.* vol. 219, p. 354-373.

James, P. (2001) Proteome Research: Mass Spectrometry. Cap.8. Interpreting peptide tandem mass spectrometry fragmentation spectra. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, p. 143-165.

Kaiser, E., Colescott, R.L., Bossinger, C.D. e Cook, P.I. (1970) Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* vol. 34, p. 595-598.

Kanade, S.R., Pasupuleti, N. Nagaraj, R.H. (2009) Role of cysteines in the enhancement of chaperone function in the methylglyoxal-modified human alpha A-cristallin. *Mol. Cell. Biochem.* vol. 322, p. 185-191.

Khairutdinov, R.F., Coddington, J.W. e Hurst, J.K. (2000) Permeation of phospholipid membranes by peroxynitrite. *Biochemistry* vol. 39, p. 14238-14249.

Kiyota, S., Fanzoni, I., Nicastro, G., Benedetti, A., Oyama Jr., S., Wiwiani, W., Gambarini, A.G., Spini, A. e Miranda, M.T.M. (2003) Introduction of a chemical

constraint in a short peptide derived from human acidic fibroblast growth factor elicits mitogenic structural determinants. *J. Med. Chem.* vol. 46, p. 2325-2333.

Kim, J.J., Kim, K.W., Kwon, .J., Lee, D.W. e Yoo, J.S. (2002) Probing lysine acetylation with a modification-specific marker íon using hight-performance liquid chromatography/electrospray-mass spectrometry with collision-induced dissociation. *Anal. Chem.* vol 74, p. 5443-5449.

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

Klug, D., Rabani, J. e Fridovich, I. (1972) A direct demonstration of the catalitic action of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis. (1972) *J. Biol. Chem.* vol. 247, p. 4839-4842.

Knudsen, F.S., Penatti, C.A.A., Royer, L.O., Bidart, K.A., Christoff, M., Ouchi, D. e Bechara, E.J.H. (2000) Chemiluminescent aldehyde and β -diketone reactions promoted by peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* vol. 13, p. 317-326.

Koppenol, W.H. (1998) The chemistry of peroxynitrite, a biological toxin. *Quím. Nova* vol.21, p. 326-331.

Kovacic, P. e Cooksy, A.L. (2005) Role of diacetyl metabolite in alcohol toxicity and addiction via electron transfer and oxidative stress. *Arch.Toxicol.* vol. 79, p. 123-128.

Kouzarides, T. (2000) Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *E.M.B.O.* vol. 9, p. 1176-1179.

Kuhla, B., Luth, H.J., Haferburg, D., Boeck, K., Arendt, T. e Munch, G. (2005) Methylglyoxal, glyoxal, and their detoxification in Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* vol. 1043, p. 211-216.

Larsen, S.T., Alarie, Y., Hammer, M. e Nielsen, G.D. (2009) Acute airway effects of diacetyl in mice. *Inhalation Toxicol.* vol. 21, p. 1123-1128.

Lancaster, J.R. (1994) Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* vol. 91, p. 8137-8141.

Lederer, M.O. e Klaiber, R.G. (1999) Cross-linking of proteins by Maillard process: Characterization and detection of lysine-arginine cross-links derived from glyoxal and methylglyoxal. *Bioorg. Medical Chem.* vol. 7, p. 2499-2507.

Lee, D.Y., Hayes, J.J., Pruss, D. e Wolffe, A.P. (1993) A positive role for histone acetylation in transcription factors access to nucleosomal DNA. *Cell* vol.72, p. 73-84.

Li, Y., Cohnforf, M.A., Dutta, U. e Dain, J.A. (2008) The structural modification of DNA nucleosides by nonenzymatic glycation: an *in vitro* study based on the reactions of glyoxal and methylglyoxal with 2'-desoxyguanosine. *Anal. Bioanal. Chem.* vol. 390, p. 679-688.

Lo, T.W.C., Westwood, M.E., McLellan, A.C., Selwood, T. e Thornalley, P.J. (1994) Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions: a kinetic and mechanistic study with N α -acetylarginine, N α -acetylcysteine, and N α -acetylysine, and bovine serum albumin. *J. Biol. Chem.* vol. 269, p. 32299-32305.

Loffredo, C., Assunção, N.A., Gerhardt, J. e Miranda, M.T.M. (2009) Microwave-assisted solid -phase peptide synthesis at 60°C: alternative conditions with low enantiomerization. *J. Pept. Sci.* vol. 808-817.

Lyman, S.V. e Hurst, K. (1995) Rapid reaction between peroxyxynitrite ion and carbon dioxide: implications for biological activity. *J. Am. Chem. Soc.* vol. 117, p. 8867-8868.

Lyman, S.V., Jiang, Q. e Hurst, J.K. (1996) Mechanism of carbon dioxide-catalyzed oxidation of tyrosine by peroxyxynitrite. *Biochemistry* vol. 35, p. 7855-7861.

Lyman, S.V., Khairutdinov, R.F. e Hurst, J.K. (2003) Hydroxyl radical formation by O-O Bond homolysis in peroxyxynitrous acid. *Inorg. Chem.* vol. 42, p. 5259-5266.

Lynch, R.E. e Fridovich, I. (1978) Permeation of the erythrocyte stroma by superoxide radical. *J. Biol. Chem.* vol. 253, p. 4697-4699

Machado, A., Sforça, M.L., Miranda, A., Daffre, S., Pertinhez, T.A., Spisni, A. e Miranda, M.T.M. (2007) Truncation of amidated fragment 33-61 of bovine α -hemoglobin: Effects on the structure and anticandidal activity. *Biopolym. (Pept. Sci.)* vol. 88, p. 413-426.

Malik, R., Nigg, E.A. e Korner, R. (2008) Comparative conservation analysis of the human mitotic phosphoproteome. *Bioinformatics* vol. 24, p. 1426-1432.

Marla, S.S., Lee, J. e Groves, J.T. (1997) Peroxynitrite rapidly permeates phospholipid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* vol. 94, p. 14243-14248.

Marmorstein, R. (2001) Structure of histone acetyltransferase. *J. Mol. Biol.* vol. 311, p. 433-444.

Massari, J., Fujiy, D.E., Dutra, F., Vaz, S.M., Costa, A.C.O., Micke, G.A., Tavares, M.F.M., Tokikawa, R., Assunção, N.A. e Bechara, E.J.H. (2008) Radical acetylation of 2'-deoxyguanosine and L-histidine coupled to the reaction of diacetyl with peroxynitrite in aerated medium. *Chem. Res. Toxicol.* vol. 21, p. 879-887.

Massari, J., Tokikawa, R., Zanolli, L., Tavares, M.F.M., Assunção, N.A. e Bechara, E.J.H. (2010) Acetyl radical production by the methylglyoxal-peroxynitrite system: A possible route for L-lisine acetylation. *Chem. Res. Toxicol.* vol. 23, p. 1762-1770.

Massari, J., Tokikawa, R., Medinas, D.B., Angeli, J.P., Di Mascio, P., Assunção, N.A. e Bechara, E.J.H. (2011) Generation of singlet oxygen by the glyoxal-peroxynitrite system. *J. Am. Chem. Soc.* vol. 133, p. 20761-20768.

Merrifield, R.B. (1963) Solid phase synthesis I synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* vol. 85, p. 2149-2154.

Miller, A.G., Meade, S.J. e Gerrard, J.A. (2003) New insights into protein crosslinking via the Maillard reaction: structural requirements, the effect of enzyme function, and predicted efficacy of crosslinking inhibitors as anti-ageing therapeutics. *Bioorg. Med. Chem.* vol. 11, p. 843-852.

Moree-Testa, P. e Saint-Jalm, Y. (1981) Determination of α -dicarbonyl compounds in cigarette smoke. *J. Chromatogr.* vol. 217, p. 197-208.

Morgan, D.L., Flake, G.P., Kirby, P.J. e Palmer, S.M. (2008) Respiratory toxicity of diacetyl in mice C57Bl/6 mice. *Toxicol. Sci.* vol. 103, p. 169-180.

Murata-Kamiya, N., Kamiya, H., Kaji, H. e Kasai, H. (2000) Methylglyoxal induces G:C to C:G and G:C to T:A transversions in the supF gene on a shuttle vector plasmide replicated in mammalian cells. *Mutat. Res.* vol. 468, p. 173-182.

Nagaraj, R., Shipanova, I.N. e Faust, F.M. (1996) Protein cross-linking by the Maillard reaction. *J. Biol. Chem.* vol. 271, p. 19338-19345.

Nakagawa, T., Lomb, D.J., Haigis, M.C. e Guarente, L. (2009) SIRT5 deacetylates carbamoyl phosphate synthetase I and regulates the urea cycle. *Cell* vol. 137, p. 560-570.

Nakao, L.S., Ouchi, D. e Augusto, O. (1999) Oxidation of acetaldehyde by peoxynitrite and hydrogen peroxide/iron (II). Production of acetate, formate, and methyl radicals. *Chem. res. Toxycol.* vol. 12, p. 1010-1018.

Nemet, I.; Vikić-Topić, D. e Varga-Defterdarović, L. (2004) Spectroscopic studies of methylglyoxal in water and dimethylsulfoxide. *Bioorg. Chem.* vol. 32, p. 560-570.

Nemet, I., Varga-Defterdarović, L. e Turk, Z. (2006) Methylglyoxal in food and living organisms. *Mol. Nutr. Food Res.* vol. 50, p. 1105-1117.

Niles, J.A., Wishnok, J.S. e Tannenbaum, S.R. (2006) Peroxynitrite-induced oxidation and nitration products of guanine and 8-oxoguanine: Structures and mechanisms of products formation. *Nitric Oxide* vol. 14, p. 109-121.

Norton, V.G., Imai, B.S., Yau, P. e Bradbury, M. (1989) Histone acetylation reduces nucleosome core particle linking number change. *Cell* vol. 57, p. 449-457.

Nukaya, H., Iwami, H., Ishida, H., et al. (1990) N2-Acetylation of 2'-deoxyguanosine by coffee mutagens, methylglyoxal and hydrogen peroxide. *Mutat. Res.* vol. 245, p. 251-257.

Nukaya, H., Inaoka, Y., Ishida, H., et al. (1993) Modification of the amino group of guanosine by methylglyoxal and other D-ketoaldehydes in the presence of H₂O₂. *Chem. Pharm.* vol. 41, p. 649-653.

Nuriel, T., Hansler, A. e Gross, S.S. (2011) Protein nitrotryptophan: Formation, significance and identification. *J. Proteom.* vol. 74, p. 2300-2312.

Olsen, R., Molander, P., Overbo, S., Ellingsen, D.G., Thorud, S., Thomassen, Y., Lundanes, E., Greibrokk, T., Backman, J., Sjöholm, R e Kronberg, L. (2005) Reaction of glyoxal with 2'-deoxyguanosine, 2'-deoxycytidine, cytidine, thymidine, and calf thymus DNA: Identification of DNA adducts. *Chem. Res. Toxicol.* vol. 18, p. 730-739.

Oya, T., Hattori, N., Mizuno, Y., Miyata, S., Maeda, S., Osawa, T. e Uchida, K. (1999) Methylglyoxal modification of proteins. *J. Biol. Chem.* vol. 274, p. 18492-18502.

Phillips, D.M.P. (1963) the presence of acetyl groups in histones. *Biochem. J.* vol. 87, p. 258-263.

Phillips, S.A. e Thornalley, P.J. (1993) The formation of methylglyoxal from triose phosphates: investigation using a specific assay for methylglyoxal. *Eur. J. Biochem.* vol. 212, p. 101-105.

Polevoda, B. e Sherman, F. (2000) N^α-terminal acetylation of eucaryotic proteins. J. Biol. Chem. vol. 275, p. 36479-36482.

Pryor, W.A., Jin, X. e Squadrito, G.L. (1995) One- and two-electron oxidations of methionine by peroxynitrite. Proc. Natl. Acad. Sci. USA vol. 91, p. 11173-11177.

Quijano, C., Hernandez-Saavedra, D., Castro, L., Mccord, J.M., Freeman, B.A. e Radi, R. (2001) Reaction of peroxynitrite with Mn-superoxide dismutase: Role of the metal Center in decomposition kinetics and nitration. J. Biol. Chem. vol. 267, p. 11631-11638.

Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M. e Freeman, B.A. (1991) Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. J. Biol. Chem. vol. 266, p. 4244-4250.

Radi, R. (1998) Peroxynitrite reactions and diffusion in biology. Chem. Res. Toxicol. vol. 11, p. 720-721.

Radi, R., Rodríguez, M., Castro, L. e Telleri, R. (1994) Inhibition of Mitochondrial Electron Transport by Peroxynitrite. Arch. Biochem. Biophys. vol. 308, p. 89-95.

Randell, E.W., Vasdev, S e Gill, V. (2005) Measurement of methylglyoxal in rat tissue by electrospray ionization mass spectrometry and liquid chromatography. J. Pharmacol. Toxicol. Methods. vol. 51, p. 153-157.

Romero, N., Denicola, A., Souza, J.M. e Radi, R. (1999) Diffusion of peroxynitrite in the presence of carbon dioxide. Arch. Biochem. Biophys. vol. 368, p. 23-30.

Sala, A., Nicolis, S., Roncone, R. e Casella, L. (2004) Peroxidase catalyzed nitration of tryptophan derivatives. Mechanism, products and comparison with chemical nitrating agents. Eur. J. Biochem. vol. 271, p. 2841-2852.

Sauve, A.A. (2010) Sirtuins chemical mechanism. Biochim. Biophys. Acta. vol. 1804, p. 1591-1603.

Schwer, B., Eckersdorff, Y.L., Li, Y., Silva, J.C., Fermin, D., Kurtev, M.V., Giallourakis, C., Comb, M.J., Alt, F.W., Lombard, D.B. (2009) Caloric restriction alters mitochondrial protein acetylation. *Aging Cell* vol. 8, p. 604-606.

Shapiro, R. e Hachmann, J. (1966) The reaction of guanine derivatives with 1,2-dicarbonyl compounds. *Biochemistry* vol. 5, p. 2799-2807.

Shaw, A.W. e Vosper, A.J. (1977) Solubility of nitric oxide in aqueous and nonaqueous solvents. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I* vol. 8, p.1239-1244

Sies, H., Sharov, V.S., Klotz, L.O. e Briviba, K. (1997) Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. *J.Biol. Chem.* vol. 272, p. 27812-27817.

Singh, R.J., Hogg, N., Joseph, J., Konorev, E. e Kalyanaraman, B. (1998) The peroxynitrite generator, SIN 1, becomes a nitric oxide donor in the presence of electron acceptors. *Arch. Biochem. Biophys.* vol. 361, p. 331-339.

Squadrito, G.L. e Pryor, W.A. (2002) Mapping the reaction of peroxynitrite with CO₂: energetic, reactive species, and biological implications. *Chem. Res. Toxicol.* vol. 15, p. 885-895.

Smith, J.S., Brachmann, C.B., Celic, I., Kenna, M.A., Muhammad, S., Starai, V.J., Avalos, J.L., Escalante-Semerena, J.C., Grubmeyer, C., Wolberder, C. e Boeke, J.D. (2000) A phylogenetically conserved NAD⁺-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. *Proc. Natl. Am. Sci. U.S.* vol. 6, p. 6658-6663.

Souza, M.P., Tavares, M.F.M. e Miranda, M.T.M. (2004) Racemization in stepwise solid-phase peptide synthesis at elevated temperatures. *Tetrahedron.* vol. 60, p. 4671-4681.

Stanbury, D.M. (1989) Reduction potentials involving inorganic free radicals in aqueous solution. *Adv. Inorg. Chem.* vol. 33, p. 69-138.

Stern, M.K., Jensen, M.P. e Kramer, K.J. (1996) Peroxynitrite decomposition catalysts. *J. Am. Chem. Soc.* vol. 118, p. 8735-8736.

Sterner, R., Vidali, G. e Alfrey, V.G. (1979) Studies of acetylation and deacetylation in high mobility group proteins. Identification of the sites of acetylation in HMG-I. *J. Biol. Chem.* vol. 254, p. 11577-11583.

Steenken, S. (1989) Purine-bases, nucleosides and nucleotides-aqueous solution redox chemistry and transformation reactions of their radical cations and e- and $\cdot\text{OH}$ adducts. *Chem. Rev.* vol. 89, p. 503-520.

Synold, T., Wuenschell, G.E., Tamae, D., Figarola, J.L., Rahbar, S. e Termini, J. (2008) Advanced Glycation End Products of DNA: Quantification of N^2 -(1-Carboxyethyl)-2'-deoxyguanosine in Biological Samples by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* vol. 21, p. 2148-55.

Tada, A., Wakabayashi, K., Totsuba, Y., Sugimura, T., Tsuji, K. e Nukaya, H. (1996) ^{32}P -Postlabelling analysis of a DNA adduct, an N^2 -acetyl derivative of guanine, formed *in vitro* by methylglyoxal and hydrogen peroxide in combination. *Mutat. Res.* vol. 351, p. 173-180.

Timmermann, S., Lehrmann, H., Polesskaya, A. e Harel-Bellan, A. (2001) Histone acetylation and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* vol. 58, p. 728-736.

Thornalley, P.J. (1996) Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification-a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *Gen. Pharmacol.* vol. 27, p. 565-573.

Tremblay, S., Gantchev, T., Tremblay, L., Lavigne, P., Cadet, J. e Wagner, J.R. (2007) Oxidation of 2'-deoxycytidine to four interconverting diastereomers of N_1 -carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxoimidazolidine nucleosides. *Org. Chem.* vol. 72, p. 3672-3678.

Ugrinova, I., Pasheva, E.A., Armengaud, J. e Pashev, I.G. (2001) In vitro acetylation of HMGI protein enhances its binding affinity to distorted DNA structures. *Biochemistry* vol. 40, p. 14655-14660.

Ulrich, P. e Cerami, E. (2001) Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Prog. Horm.*, v. 56, p. 1-21.

Uppu, R.M.; Winston, G.W. e Pryor, W.A. (1997) Reactions of peroxynitrite with aldehydes as probes for reactive intermediates responsible for biological nitration. *Chem. Res. Toxicol.* v. 10, p. 1331-1337.

U.S. Food and Drug Administration, <<http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASSubstancesSCOGSDatabase/ucm261273.htm>> , acessado em 10/01/2012.

Vannini, A., Volpari, C., Filoocamo, G., Casavola, E.C., Brunetti, M., Renzoni, D., Chakravarty, P., Paolini, C., De Francesco, R., Gallinari, P., Steinkuhler, C. e Di Marco, S. (2004) Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* vol. 101, p. 15064-15069.

Varanda, L.M. e Miranda, M.T. (1997) Solid-phase peptide synthesis at elevated temperatures: a search for an optimized synthesis condition of unsulfated cholecystinin-12. *J. Peptide Res.* vol. 50, p. 102-108.

Vásquez-Vivar, J., Denicola, A., Radi, R. e Augusto, O. (1997) Peroxynitrite-mediated decarboxylation of pyruvate to both carbon dioxide and carbon dioxide radical anion. *Chem. Res. Toxicol.* vol. 10, p. 786-794.

Vetteese-Dadey, M., Grant, P.A., Hebbes, T.R., Crane-Robinson, C., Allis, C.D. e Workman, J.L. (1996) acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA in vitro. *EMBO. J.* vol. 15, p. 2508-2518.

Vidali, G., Boffa, L.C., Bradbury, E.M. e Allfrey, V.G. (1978) Butyrate suppression of histone deacetylation leads to accumulation of multiacetylated forms of histone H3 and H4 and increased DNase I sensitivity of the associated DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* vol. 75, p. 2239-2243.

van der Vliet, A., O'Neill, C.A., Halliwell, B., Cross, C.E. e Kaur, H. (1994) Aromatic hydroxylation and nitration of phenylalanine and tyrosine by peroxynitrite. Evidence for hydroxyl radical production from peroxynitrite. *F.E.B.S. Lett.* vol. 339, p. 89-92.

Voet, D. e Voet, J.D. (2006) *Bioquímica*. Editora Artmed 3^a Edição, Capítulo 34: Expressão gênica de eucariótica p. 1475.

Zhang, K., Williams, K., Huang, L., Yau, P., Siino, J.S., Bradbury, E.M., Jones, P.R., Minch, M.J. e Burlingame, A.L. (2002) Histone acetylation and deacetylation: Identification of Acetylation and Methylation Sites of HeLa Histone H4 by Mass Spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* vol. 1, p. 500-508.

Zoccali, C., Mallamaci, F., e Tripepi, G.. (2000) AGEs and Carbonyl stress: potential pathogenetic factors of long-term uraemic complications. *Nephrol. Dial. Transplant.* vol.15, p. 7-11.

Yalcin, T. e Harrison, A.G. (1996) Ion chemistry of protonated lysine derivatives. *J. Mass Spectrom.* vol. 31, p. 1237-1243.

Yamakura, F. e Ikeda, K. (2006) Modification of tryptophan and tryptophan residues in proteins by reactive nitrogen species. *Nitric Oxide* vol. 14, p. 152-161.

Yang, D., Tang, Y.C., Chen, J., Wang, X.C., Bartberger, M.D., Houk, K.H. e Olson, L. (1999) Ketone-catalyzes decomposition of peroxynitrite via dioxirane intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* vol. 121, p. 11976-11983.

Yang, X.J. e Seto, E. (2008) Lysine acetylation: Codified crosstalk with other posttranslational modifications. *Mol. Cell* vol. 31, p. 449-461.

Yankeelov, J.A. (1970) Modification of arginine in proteins by oligomers of 2,3-butanedione. *Biochemistry* vol. 9, p. 2433-2439.

Yermilov, Y., Rubio, J., Becchi, M., Friesen, M.D., Pignatelli, B. e Ohshima, H. (1995) Formation of 8-nitroguanine by the reaction of guanine with peroxynitrite *in vitro*. *Carcinogenesis* vol. 16, p. 2045-2050.

Yi, D-H., Ingelse, B.A., Duncan, M.W. e Smyth, G.A. (2000) Quantification of 3-nitrotyrosine in biological tissues and fluids: generating valid results by eliminating artifactual formation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* vol. 11, p. 578-586.

Yoshida, M., Horinouchi, S. e Beppu, T. (1995) Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function. *Bioessays*. vol. 17, p. 423-430.

Wagner, J.R. e Cadet, J. (2010) Oxidation reactions of cytosine DNA components by hydroxyl radicals and one-electron oxidants in aerated aqueous solutions. *Accounts Chem. Res.* vol. 43, p. 564-571.

Weigel, K.U., Opitz, T. e Henle, T. (2004) Studies on the occurrence and formation of 1,2-dicarbonyls in honey. *Eur. Food. Res. Technol.* vol. 218, p. 147-151.

Wink, D.A. e Mitchell, J.B. (1998) Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol. Med.* vol 25, p. 434-56.

APÊNDICE A

$(M+H)^{+1} = 402 \text{ u.m.a}$

Proposta de fragmentação do peptídeo H-KALA-OH.

APÊNDICE B

$(M+H)^{+1} = 444 \text{ u.m.a}$

Proposta de fragmentação do peptídeo Ac-KALA-OH.

APÊNDICE C

$(M+H)^{+1} = 430 \text{ u.m.a}$

Proposta de fragmentação dos peptídeos HCO-KALA-OH

APÊNDICE D

$(M+H)^{+1} = 486 \text{ u.m.a}$

Proposta de fragmentação do peptídeo Ac-K(Ac)ALA-OH.

APÊNDICE E

Proposta de fragmentação do peptídeo Ac-K(HCO)ALA-OH.

APÊNDICE F

Rita Ile-Ac 16/Dez/2011 DRX500 T=298k

Espectro de RMN-¹H de isoleucina acetilada por biacetilo/peroxinitrito .

Espectro de RMN-¹H de isoleucina acetilada por biacetilo/peroxinitrito Expansão 1.

Espectro de RMN- ^1H de isoleucina acetilada por biacetilo/peroxinitrito – Expansão 2.

Metionina-Ac em 600 uL de D2O 26/Dez/2011 DRX500 T=298k

Espectro de RMN-¹H de metionina acetilada por biacetilo/peroxinitrito .

Metionina-Ac em 600 uL de D2O 26/Dez/2011 DRX500 T=298k

Espectro de RMN-¹H de metionina acetilada por biacetilo/peroxinitrito – Expansão 1.

Espectro de RMN- ^1H de metionina acetilada por biacetilo/peroxinitrito – Expansão 2.

APÊNDICE H

Espectro de RMN-¹H de fenilalanina acetilada por biacetilo/peroxinitrito – Expansão 1.

APÊNDICE I

Espectro de RMN-¹H de triptofano nitrado por biacetilo/peroxinitrito .

Espectro de RMN-¹H de triptofano nitrado por biacetilo/peroxinitrito – Expansão 1.

Espectro de RMN-¹H de triptofano nitrado por biacetilo/peroxinitrito – Expansão 2.

Espectro de RMN- ^1H de triptofano nitrado por biacetilo/peroxinitrito – Expansão 3.

APÊNDICE J

Triptofano-AC em 600 uL de D2O sem supressão do pico da água 26/Dez/2011 DRX500 T=298k

Espectro de RMN-¹H de triptofano acetilado por biacetilo/peroxinitrito .

Triptofano-AC em 600 uL de D2O sem supressão do pico da água 26/Dez/2011 DRX500 T=298k

— 7.722
— 7.706

— 7.529
— 7.513

— 7.278
— 7.264
— 7.247

— 7.207
— 7.205
— 7.191
— 7.177

Espectro de RMN-¹H de triptofano acetilado por biacetilo/peroxinitrito – Expansão 1.

Triptofano-AC em 600 uL de D2O sem supressão do pico da água 26/Dez/2011 DRX500 T=298k

4.565
4.566
4.560
4.540

3.394
3.385
3.371
3.364
3.355

3.186
3.171
3.157
3.141

Espectro de RMN-¹H de triptofano acetilado por biacetilo/peroxinitrito – Expansão 2.

Espectro de RMN- ^1H de triptofano acetilado por biacetilo/peroxinitrito – Expansão 3.

APÊNDICE K

Análises por RP-HPLC e ESI-MS/MS da reação de modificação de triptofano modificado por biacetilo/peroxinitrito por LC/ESI-MS e possíveis adutos formados com base nos resultados obtidos por Yamakura, 2005; Ishii, 2007; Nuriel, 2011. Reação de triptofano 2,03 mM com biacetilo 5,0 mM e peroxinitrito 2,0 mM em tampão fosfato 200 mM pH 7,2. Condições do LC: injeção de 50 μ L de amostra em coluna analítica Luna[®] Phenomenex (C₁₈(2), 5 μ m, 100 Å, 250 x 4,6 mm). As fases móveis empregadas foram A: H₂O/0,1% TFA e B: 60% ACN/0,09% TFA/H₂O. O gradiente linear utilizado foi 5%-60% B em 30 min. condições do ESI-MS: capilar 4,0 kV, saída do capilar 102,3 V, gás secante 300 °C com fluxo 5 mL/min, modo de ionização: ES⁺.

Possíveis adutos secundários formados pelo tratamento de triptofano com o sistema biacetilo/peroxinitrito. Os adutos foram desenhados com base nos dados de LC/ESI-MS obtidos nesta Tese e nos adutos formados pela reação de triptofano e peroxinitrito relatados por Yamakura, 2005; Ishii, 2007; Nuriel, 2011.

APÊNDICE L

Análise por LC/ESI-MS/MS da reação de modificação de 2'-deoxiguanosina por biacetilo.

Reação de 2'-deoxiguanosina 1,0 mM na presença de biacetilo 5,0 mM em tampão fosfato 200mM pH 7,2.. Condições LC/ESI-MS como descrito no item 3.11, a aquisição dos dados de massas foram realizados pela análise da perda neutra de 116 Da.

APÊNDICE M

Proposição de mecanismo para adutos de 2'-deoxiguanosina e biacetilo. Os adutos foram desenhados com base nos dados de LC/ESI-MS obtidos nesta Tese e nos adutos formados pela reação de 2'-deoxiguanosina e metilglioxal relatados por Awada e Dedon (2001); Frischmann, *et al.* (2005) e Olsen, *et al.*, (2005).

ANEXO A

Co-autoria no Artigo:

Chem. Res. Toxicol. **2008**, *21*, 879–887

879

Radical Acetylation of 2'-Deoxyguanosine and L-Histidine Coupled to the Reaction of Diacetyl with Peroxynitrite in Aerated Medium

Júlio Massari,[†] Débora E. Fujiy,[†] Fernando Dutra,[‡] Sandra M. Vaz,[†] Ana C. O. Costa,[§]
Gustavo A. Micke,^{§,||} Marina F. M. Tavares,[§] Rita Tokikawa,[†] Nilson A. Assunção,[†] and
Etelvino J. H. Bechara^{*,†}

Departamento de Bioquímica and Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, C.P. 26077, 05513-970 São Paulo, SP, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Cruzeiro do Sul, SP, and Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, Brazil

Received August 2, 2007

Radical Acetylation of 2'-Deoxyguanosine and L-Histidine Coupled to the Reaction of Diacetyl with Peroxynitrite in Aerated Medium

Júlio Massari,[†] Débora E. Fujiy,[†] Fernando Dutra,[‡] Sandra M. Vaz,[†] Ana C. O. Costa,[§] Gustavo A. Micke,^{§,||} Marina F. M. Tavares,[§] Rita Tokikawa,[†] Nilson A. Assunção,[†] and Etelvino J. H. Bechara^{*,†}

Departamento de Bioquímica and Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, C.P. 26077, 05513-970 São Paulo, SP, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Cruzeiro do Sul, SP, and Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, Brazil

Received August 2, 2007

Diacetyl, like other α -dicarbonyl compounds, is reportedly cytotoxic and genotoxic. A food and cigarette contaminant, it is related with alcohol hepatotoxicity and lung disease. Peroxynitrite is a potent oxidant formed in vivo by the diffusion-controlled reaction of the superoxide radical anion with nitric oxide, which is able to form adducts with carbon dioxide and carbonyl compounds. Here, we investigate the nucleophilic addition of peroxynitrite to diacetyl forming acetyl radicals, whose reaction with molecular oxygen leads to acetate. Peroxynitrite is shown to react with diacetyl in phosphate buffer (bell-shaped pH profile with maximum at 7.2) at a very high rate constant ($k_2 = 1.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) when compared with monocarbonyl substrates ($k_2 < 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Phosphate ions (100–500 mM) do not affect the rate of spontaneous peroxynitrite decay, but the H_2PO_4^- anion catalyzes the nucleophilic addition of the peroxynitrite anion to diacetyl. The intermediacy of acetyl radicals is suggested by a three-line spectrum ($a_N = a_H = 0.83 \text{ mT}$) obtained by EPR spin trapping of the reaction mixture with 2-methyl-2-nitrosopropane. The peroxynitrite reaction is accompanied by concentration-dependent oxygen uptake. Stoichiometric amounts of acetate from millimolar amounts of peroxynitrite and diacetyl were obtained under nonlimiting conditions of dissolved oxygen. In the presence of either L-histidine or 2'-deoxyguanosine, the peroxynitrite/diacetyl system afforded the corresponding acetylated molecules identified by HPLC-MSⁿ. These studies provide evidence that the peroxynitrite/diacetyl reaction yields acetyl radicals and raise the hypothesis that protein and DNA nonenzymatic acetylation may occur in cells and be implicated in aging and metabolic disorders in which oxygen and nitrogen reactive species are putatively involved.

Introduction

In living organisms, dioxygen and nitric oxide (NO) originate a small but highly reactive family of chemical species that govern health, disease, and death. Among them, the pair peroxynitrous acid (HOONO)/peroxynitrite (ONOO^-) ($\text{p}K_a = 6.8$), formed by the diffusion rate-limited reaction of the superoxide anion radical with NO ($k_2 \sim 3\text{--}20 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (*1*), stands out for the one- and two-electron oxidations, nitrosations, and nitrations that it can cause, directly or through radical-mediated mechanisms, to proteins, lipids, and DNA, impairing protein expression, enzyme activities, and signaling routes (*1, 2*). Peroxynitrite has been shown to react directly with many substrates, including some amino acids, nucleosides, carbonyl metabolites, sulfhydryls, ebselen, metal complexes, heme proteins, ascorbate, and urate (*3–5*). Increased formation of peroxynitrite in tissues has been linked to Alzheimer's disease, rheumatoid arthritis, atherosclerosis, lung injury, amyotrophic lateral sclerosis, diabetes, cancer, drug-dependent toxicity, and many other diseases (*1*).

On the other hand, reactive carbonyl compounds such as alkanals (e.g., acetaldehyde, *n*-hexanal), alkenals (e.g., acrolein,

heptadienals, and nonadienals), β -keto acids (e.g., acetoacetate, 2-methylacetoacetate), β -diketones (e.g., succinylacetone), and α -dicarbonyls (e.g., diacetyl, 4,5-dioxovaleric acid, and methylglyoxal) have been identified as oxidation products of carbohydrates (*6*), lipids (*6, 7*), proteins (*6, 8, 9*), and DNA (*10*) and have been implicated in several age-related disorders (*11*), including diabetes (*9, 12, 13*), Alzheimer's disease (*9, 14*), and cancer (*15*). The accumulation of reactive carbonyls and consequent chemical injury to biological systems with loss of native functions have been referred to as "carbonyl stress" (*16*).

Of potential interest regarding carbonyl and nitrosative stress is the nucleophilic addition of peroxynitrite anion to aldehydes, ketones, and carbon dioxide, by virtue of a set of reactive oxidants that may result, including carbon and oxygen-centered radicals, nitrogen oxides, and carbonate radical (*17*). Carbon dioxide prevails in intracellular (12 mM), interstitial (30 mM), and other body fluids over carbonyl metabolites and end products and rapidly undergoes the addition of the peroxynitrite anion (pH-independent, $k_2 = 5.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, at 37 °C), thereby acting as a sink for peroxynitrite (*18*). Among biological carbonyls of interest for reaction with peroxynitrite, we can list ketone bodies (6–25 mM) in the blood of diabetic patients (*19*); succinylacetone (0.1–0.3 mM) in the urine of hereditary tyrosinemia type 1 carriers (*20*); and methylglyoxal (1–10 μM) in normal human (*21*) and rat plasma (*22*) and a higher methylglyoxal concentration (20–50 μM) in the plasma of

* To whom correspondence should be addressed.

[†] Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo.

[‡] Universidade Cruzeiro do Sul.

[§] Departamento de Química Fundamental, Universidade de São Paulo.

^{||} Universidade Federal de Santa Catarina.

Scheme 1. Hypothetical Routes for the Carbonyl-Catalyzed Isomerization of Peroxynitrite to Nitrate, Accompanied by Formation of Carboxylic Acids and Nitro Compounds^a

^a Adapted from Uppu et al. (24) and Nakao et al. (25) (routes a and b) and from Yang et al. (26) (route c).

insulin-nondependent and in insulin-dependent ($60\ \mu\text{M}$) diabetics (23). In addition to the fact that they are present in very low physiological concentrations, aldehyde and ketone reactions with peroxynitrite are much slower than with carbon dioxide (18). For example, rate constants are as follows: acetaldehyde ($k_2 = 680\ \text{M}^{-1}\ \text{s}^{-1}$, pH 7.4, $37\ ^\circ\text{C}$), propionaldehyde ($k_2 = 530\ \text{M}^{-1}\ \text{s}^{-1}$, pH 7, $25\ ^\circ\text{C}$), isobutanal ($k_2 = 344\ \text{M}^{-1}\ \text{s}^{-1}$, pH 7.2, $25\ ^\circ\text{C}$), pyruvate ($k_2 = 88\ \text{M}^{-1}\ \text{s}^{-1}$, pH 7.4, $37\ ^\circ\text{C}$), and 3-methylacetoacetone ($k_2 = 166\ \text{M}^{-1}\ \text{s}^{-1}$, pH 7, $25\ ^\circ\text{C}$) (24–26). Hence, these reactions have been considered of negligible biological relevance.

In contrast, α -dicarbonyls such as glyoxal, α -oxoaldehydes, and α -diketones are expected to undergo much faster nucleophilic additions than their monocarbonyl counterparts due to the electron-withdrawing effect of the adjacent carbonyl group. Thus, a comparison of the rate constants and reaction mechanisms of peroxynitrite added to mono- and α -dicarbonyls in aqueous medium is fully warranted. Biological α -dicarbonyls include several amino acid, carbohydrate, and lipid catabolites such as methylglyoxal (from triose phosphates, acetone, and threonine) (6), diacetyl (from alcohol (27), cigarettes (28), and some foods (29, 30)), oxazones (from aminosugars) (31), and 4,5-dioxovaleric acid (from 5-aminolevulinic acid) (32). Tissue accumulation of these catabolites, albeit not yet directly determined due to analytical difficulties imposed by their high reactivity with proteins, has been associated with clinical manifestations of several inborn and acquired disorders, for example, methylglyoxal in diabetes (6), diacetyl in alcohol hepatotoxicity (27) and lung disease (30), oxazones in aging-related diseases (31), and 5-aminolevulinic acid in lead poisoning, intermittent acute porphyria, and type 1 hereditary tyrosinemia (32). Glyoxal and methylglyoxal are reported as active in vitro and in vivo protein cross-linkers via Maillard reactions (6), while diacetyl has been found to modify arginine and lysine residues of proteins (33).

Otsuka et al. (34) evaluated diacetyl concentration in the plasma of volunteer male students who had ingested ethanol as ranging from 0.25 to $0.75\ \mu\text{M}$, whereas that of acetoin was about $2.2\ \mu\text{M}$. Interestingly, 2,3-butanediol raised from 10 to $50\ \mu\text{M}$

in the plasma and from 50 to $300\ \mu\text{M}$ in the urine of an aldehyde dehydrogenase 2 defective student, 3 h after ethanol ingestion. The C4 metabolites diacetyl, acetoin, and 2,3-butanediol had been previously found to be interconvertible in liver, brain, and kidney of rats (35). In addition, about $3\ \mu\text{M}$ diacetyl and $2\ \mu\text{M}$ acetoin were found in the plasma of adult rats, and $3.4\ \text{nmol}$ diacetyl and $3.6\ \text{nmol}$ acetoin per gram were found in the liver (36).

Pursuant to peroxynitrite nucleophilic addition to short chain aldehydes, according to Uppu et al. (24), a putative nitrosoperoxycarbonate intermediate decays into regenerated aldehyde and nitrate plus a set of secondary minor products, including organic acids and organic nitrates (Scheme 1, routes a and b). In parallel, Nakao et al. (25) reported that roughly $1\ \text{mM}$ acetate and formate can be obtained from the reaction of acetaldehyde ($100\ \text{mM}$) with peroxynitrite ($10\ \text{mM}$) in slightly alkaline medium by the same mechanism proposed by Uppu et al. (24). Two years later, Yang et al. (26) suggested that the nitrosoperoxycarbonate adduct from the reaction of diacetyl and other activated ketones cleaves to a dioxirane intermediate plus nitrite before reforming the ketone and generating nitrate (Scheme 1, route c). This hypothesis was based on the observed alkene epoxidation property of peroxynitrite/carbonyl mixtures.

We revisit here the oxygen-consuming reaction of peroxynitrite with diacetyl in phosphate buffer under continuous stirring to render molecular oxygen nonlimiting, which yields large amounts of acetyl radical intermediates and ultimately acetate ion (Scheme 2). We also show that this reaction can be coupled to the acetylation of L-histidine or 2'-deoxyguanosine (dGuo)¹ added to the reaction mixture. These findings raise the hypothesis that α -dicarbonyl catabolites produced during nitrosative and carbonyl stresses may exert cyto- and genotoxicity not only by their activity of cross-linking DNA bases and proteins but also by radical acetylation of these pivotal biopolymers.

¹ Abbreviations: CTAB, cetyltrimethylammonium bromide; dGuo, 2'-deoxyguanosine; EPI, enhanced product ion; MNP, 2-methyl-2-nitrosopropane; MRM, multiple reaction monitoring.

Scheme 2. Hypothetical Mechanism of the Phosphate-Catalyzed Reaction of Diacetyl with Peroxynitrite in Stirred Aerated Aqueous Medium, Mediated by Acetyl Radicals, Leading to Acetic Acid

Materials and Methods

Chemicals and Reagents. Acetonitrile, ammonium formate, cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), Chelex-100, dGuo, deuterium oxide, diacetyl, formic acid, L-histidine-HCl, 2-hydroxyisobutyric acid 2-methyl-2-nitrosopropane (MNP), phosphoric acid, sodium tetraborate, and sodium nitrite were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Acetic acid, chloroform D-1, hydrochloric acid, hydrogen peroxide, manganese(IV) oxide, sodium carbonate, sodium hydroxide, disodium hydrogen phosphate dodecahydrate, and sodium phosphate monobasic monohydrate were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Diacetyl was distilled before use. Peroxynitrite was synthesized from sodium nitrite (0.6 M), hydrogen peroxide (0.7 M) in hydrochloric acid (1.1 M), and sodium hydroxide (1.5 M) in a quench-flow reactor (37). The excess hydrogen peroxide in alkali peroxynitrite solution was eliminated with manganese(IV) oxide. Concentrations of hydrogen peroxide and peroxynitrite were determined from their absorbances at 240 ($\epsilon = 42 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and 302 nm ($\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), respectively. The concentration of peroxynitrite in stock solutions obtained by this method ranged from 300 to 400 mM. All of the solutions were prepared in distilled water treated in a Millipore Milli-Q system, and the buffer solutions were pretreated with Chelex-100.

Oxygen Consumption. Oxygen uptake was followed in a Hansatech oxygraph equipped with a Clark type electrode. All of the experiments were carried out in air-equilibrated 200 mM phosphate buffer, pH 7.2, whose oxygen concentration was taken to be 220 μM at 37 $^{\circ}\text{C}$.

HPLC-MS Analyses. LC-MS analyses were carried out using an 2000 Q TRAP (hybrid triple quadrupole ion trap mass spectrometer) equipped with a 1100 Agilent HPLC system consisting of a binary pump, automatic solvent degasser, thermostatted autosampler and column compartment, and a Synergy polar RP column (4 $\mu\text{m} \times 150 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm}$). HPLC elution was made with an aqueous phase consisting of 0.1% formic acid and 1.0 mM ammonium formate (A) and an organic phase obtained with 0.1% formic acid and 1.0 mM ammonium formate in acetonitrile:H₂O (19:1) (B), at a flow rate of 250 $\mu\text{L min}^{-1}$. L-Histidine products from the peroxynitrite/diacetyl reaction were analyzed by isocratic elution with 95% A, and those from dGuo were analyzed by a linear gradient formed with 95% A (30 s) and 95% B (7 min), followed by elution with 95% B up to 11 min. Five microliters of sample was used in both analyses. The mass spectrometer was operated in the positive mode under the following conditions: voltage, 4000 V; curtain gas, 25; temperature, 370 $^{\circ}\text{C}$; gas 1, 50; gas 2, 60; DP, 21; EP, 4.5; CEP, 25; CE, 20; resolution unit for performing the experiments by enhanced product ion (EPI); and MS³.

Stopped-Flow Kinetics. The rate of peroxynitrite decomposition was monitored with a stopped-flow spectrophotometer (Applied Photophysics model SX-18V) at 302 nm. The temperature was maintained constant at $25 \pm 0.2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, and the pH values of the reaction mixtures were determined by a simulated experiment in Eppendorf tubes under the same conditions. The peroxynitrite concentration was kept at 500 μM . Pseudofirst-order rates, k_{obs} (s^{-1}) were determined by nonlinear least-squares fitting of stopped-flow data to a single-exponential function with a nonzero offset. The results of 9–12 measurements were averaged to obtain each rate constant. The apparent second-order rate constant ($k_{2,\text{app}}$) was

calculated from slopes of the plots of k_{obs} vs the concentration of diacetyl. The rate of peroxynitrite decay in the buffer solution, k_0 , was subtracted from k_{obs} before plotting data against pH or phosphate buffer concentration. The data were fitted using Origin 6.1 (Microcal Software, Inc.).

EPR Spin-Trapping Experiments. EPR spin-trapping spectra with MNP were recorded at room temperature using a Bruker EMX spectrometer. All of the spectra were recorded after 4 min of reagents incubation, in 500 mM phosphate buffer, pH 7.2. At the end of the experiment, the pH was measured to detect possible changes caused by the addition of alkaline stock solutions of peroxynitrite to the buffered reaction mixtures. The instrumental conditions were as follows: microwave power, 20.21 mW; modulation amplitude, 0.1 mT; time constant, 163.840 ms; and receiver gain, 2.52×10^3 .

Capillary Electrophoresis. The electropherogram traces for acetate analysis were obtained with an electrophoretic system (Agilent Technologies, model HP ³D CE, Palo Alto, CA) equipped with a diode array detector set at 191 nm and the temperature control device maintained at 25 $^{\circ}\text{C}$. The background electrolyte was 20 mM sodium tetraborate and 0.3 mM CTAB. Fused-silica capillaries (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ) with dimensions of 48.5 cm total length (40 cm effective length) and 75 $\mu\text{m ID} \times 375 \mu\text{m OD}$ were used. Separation was performed at a constant voltage (-22 kV). Samples were injected hydrodynamically with 50 mbar for 3 s. Aliquots of peroxynitrite and phosphoric acid (5 mM), sufficient to obtain a final pH ranging from 7.1 to 7.5, were added to the millimolar diacetyl-containing solution vigorously stirred with a Vortex system before taking capillary electrophoresis measurements. 2-Hydroxyisobutyric acid was used as an internal standard, and the acetate in the reaction mixture was analyzed immediately. Tests carried out 4 min, 20 min, and 24 h after the addition of peroxynitrite revealed that the remaining diacetyl slowly underwent further oxidation, thus augmenting the final concentration of acetate in the reaction mixture.

Results

Peroxynitrite Decay. Experiments on peroxynitrite/diacetyl mixtures (Figure 1A,B) monitored at 302 nm by UV spectrophotometry/stopped-flow confirmed data previously reported by Yang et al. (26) to the fact that peroxynitrite reacts much faster ($k_2 = 1.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, in 1:9 acetonitrile:water) with diacetyl in phosphate buffer than do monocarbonyl substrates ($k_2 < 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for acetaldehyde, propionaldehyde, and pyruvate) in similar experimental conditions. In the present work, the observed pseudofirst-order rate constants (k_{obs}) obtained from the peroxynitrite decay in the presence of diacetyl minus the rate of spontaneous peroxynitrite decomposition under the same conditions (k_0) were plotted against the diacetyl concentration to calculate the apparent second-order rate constant ($k_{2,\text{app}} = 2.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Figure 1B). This value was then corrected for the fraction of hydrated diacetyl in aqueous medium, 76% according to Yang et al. (26). The resulting k_2 value for the addition of peroxynitrite to diacetyl was then calculated as $1.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, therefore approaching that reported by Lyman and Hurst (38) and Denicola et al. (18) for carbon dioxide: 2.9

Figure 1. Stopped-flow experiments with the diacetyl/peroxynitrite system. (A) pH profile of the reaction of diacetyl (1.0 mM) with peroxynitrite (500 μM) in normally aerated 250 mM phosphate buffer. (B) Pseudofirst-order rate constants (k_{obs}) for the decomposition of peroxynitrite (500 μM) in the presence of increasing concentrations of diacetyl in the same buffer, pH 7.2, at 25 $^{\circ}\text{C}$.

$\times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at 24 $^{\circ}\text{C}$ and $5.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, at 37 $^{\circ}\text{C}$, respectively. The fact that H_2PO_4^- acts as a general acid catalyst of the nucleophilic addition of peroxynitrite to diacetyl was supported by the rising values of ($k_{\text{obs}} - k_0$) measured at increasing concentrations of phosphate (not shown). A 6-fold increase in the rate constant was observed by raising the phosphate concentration, pH 7.8, from 100 to 500 mM (not shown). In addition, the peroxynitrite self-decomposition rate ($k_{\text{obs}} = 6 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$) was not significantly affected by the phosphate concentration. The bell-shaped pH profile of this reaction peaks at roughly 7.2, probably reflecting the overlap of two titration curves: the peroxynitrous acid dissociation ($\text{p}K_{\text{a}} = 6.8$) to peroxynitrate, a reactive nucleophile, which prevails in the ascending part, and the decrease of $[\text{H}_2\text{PO}_4^-]$ ($\text{p}K_{\text{a}}$ of $\text{H}_2\text{PO}_4^- = 7.2$), the catalyst of nucleophilic addition of peroxynitrite to diacetyl, which governs the downward curvature (Figure 1A).

Oxygen Uptake. The addition of peroxynitrite (0.25–1.0 mM) to a normally aerated 200 mM phosphate solution ($[\text{O}_2] \sim 220 \mu\text{M}$), pH 7.2, containing diacetyl (1.0–5.0 mM) rapidly triggers oxygen consumption (Figure 2A,B). The oxygen uptake rate responds to the increase of both peroxynitrite and diacetyl

Figure 2. Time course of oxygen uptake by diacetyl treated with peroxynitrite in 200 mM phosphate buffer, pH 7.2, at 37 $^{\circ}\text{C}$. (A) Diacetyl (5.0 mM) in the absence of peroxynitrite (a) and diacetyl 1.0 (b), 2.0 (c), 3.0 (d), and 5.0 mM (e), treated with peroxynitrite (1 mM). (B) Diacetyl (1.0 mM) in the absence (a) and in the presence of 0.25 (b), 0.50 (c), 0.75 (d), 1.0 (e), 1.25 (f), and 1.5 mM (g) peroxynitrite.

concentrations. Under our experimental conditions, molecular oxygen evolution from peroxynitrite alone was observed (control) but occurred in negligible amounts ($<5\%$) as reported previously (39). As mentioned earlier herein, the effective concentration of diacetyl is actually much lower than the nominal value due to its hydration in phosphate-buffered solutions: $[\text{hydrate}]/[\text{ketone}] = 3.3$ for diacetyl and 0 (zero) for acetone (26). This difference reflects the higher electrophilicity of diacetyl than acetone due to the electron-deficient carbonyl group of free diacetyl (Scheme 2).

Product Analysis. The reaction pathway depicted by Scheme 1 predicts formation of acetate by the reaction of diacetyl with peroxynitrite in aerated medium. Uppu et al. reported that carboxylic acids are formed in low yields from the reaction of aldehydes with peroxynitrite (~ 0.2 mol acetate/mol peroxynitrite) (24), whereas Yang et al. (26) disregarded the formation of carboxylic fragments from the reaction of various ketones with peroxynitrite.

Peroxyntite was added dropwise to a stirring solution of aqueous diacetyl contained in aluminum foil-darkened Eppendorf tubes, and the final reaction mixture was immediately subjected to electrophoretic analysis (Figure 3). To prevent interference of high phosphate in the electropherograms, the reactions were run by finely controlled, calculated additions of peroxynitrite and phosphoric acid aliquots to the diacetyl-

Figure 3. Electropherogram of acetate detected in the final reaction mixture of diacetyl/peroxynitrite. The reaction was performed in the presence (A) and absence (B) of diacetyl. (C) Standard mixture: acetate + 2-hydroxyisobutyrate (internal standard). Experimental conditions: 20 mM sodium tetraborate; 0.30 mM CTAB; capillary L_{det} , 40 cm; L_{tot} , 48.5 cm; ID, 75 μm ; detection, 191 nm; voltage, -22 kV ; injection, 3 s; 50 mbar; and 25°C . Equipment Agilent CE³D. Peak identification: 1, CTAB; 2, nitrate + nitrite; 3, phosphate; 4, acetate; and 5, 2-hydroxyisobutyrate.

Table 1. Chemical Yields (mM) of Acetate Produced by the Reaction of Diacetyl with Peroxynitrite in Aerated Aqueous Solution and Determined by Capillary Electrophoresis^a

[ONOO ⁻] (mM)	[diacetyl] (mM)		
	0.50	2.0	5.0
0.00	ND ^b	ND ^b	0.09 $\pm$ 0.04
0.19	0.24 $\pm$ 0.03	0.46 $\pm$ 0.05	0.52 $\pm$ 0.05
0.25	0.32 $\pm$ 0.03	0.57 $\pm$ 0.06	0.65 $\pm$ 0.06
0.38	0.37 $\pm$ 0.04	0.72 $\pm$ 0.07	0.94 $\pm$ 0.09
0.56	0.41 $\pm$ 0.04	1.01 $\pm$ 0.06	1.2 $\pm$ 0.1
0.75	0.54 $\pm$ 0.04	1.18 $\pm$ 0.09	1.6 $\pm$ 0.1

^a The final pH is in the range of 7.1–7.5. ^b Not detected.

containing aqueous solution aiming to reach a final pH of approximately 7.2. Only reaction mixtures with pH values ranging from 7.1 to 7.5 were analyzed by capillary electrophoresis. Peroxynitrite was added to the diacetyl-containing solution under constant Vortex agitation, so that the dissolved oxygen concentration was kept at a saturating, nonlimiting level. Roughly stoichiometric acetate yields, based on the peroxynitrite concentration, were found in the spent reaction mixture in which diacetyl was not limiting (5.0 mM) (Table 1). Trace amounts of acetate, attributable to adventitious metal-catalyzed oxidation of diacetyl by dissolved oxygen, were found in the control without peroxynitrite: 0.09 mM acetate from 5.0 mM diacetyl stirred under the same conditions.

EPR Spin Trapping. EPR spin-trapping studies with MNP were conducted in normally aerated diacetyl- and peroxynitrite-containing phosphate buffer to detect and possibly identify carbon-centered radical intermediates. The intensity of the EPR signal, assignable to an MNP-acetyl radical adduct ($a_N = 0.83\text{ mT}$; lit. NIEHS 0.78–0.83 mT), is enhanced at increasing concentrations of either diacetyl or peroxynitrite (Figure 4A,B). Acetyl radical had been previously found by EPR spin trapping to be formed in the chemiluminescent reaction of 3-methylacetoacetone with hydrogen peroxide/horseradish peroxidase in normally aerated phosphate buffer. In this case, acetyl radical results from the α -cleavage of triplet diacetyl formed during the chemiluminescent reaction. As expected, the acetyl adduct signal is quenched upon addition of bicarbonate due to the competition between 5 mM diacetyl ($k_2 = 1.4 \times 10^4\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$) and resulting 2.5–20 mM CO_2 ($k_2 = 5.8 \times 10^4\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$) (18)

for the nucleophile peroxynitrite (2.5 mM) (Figure 5). Noteworthy is that complete elimination of the acetyl radical adduct could be attained only at 20 mM bicarbonate.

Once formed from the adduct diacetyl-peroxynitrite, acetyl radical is expected to be rapidly destroyed by the dissolved oxygen yielding acetylperoxyl radical, whose dismutation generates acetyloxyl radical and restores half of the oxygen consumed. Dimerization of acetyloxyl radical gives acetic peroxyanhydride, whose hydrolysis produces acetic acid and peracetic acid, and the combination of acetyloxyl radical with acetyl radical yields acetic anhydride, whose hydrolysis yields the final product, acetic acid. This hypothesis is summarized by Scheme 2.

Histidine and dGuo Radical Acetylation. The HPLC trace and mass spectrum of the spent reaction mixture of diacetyl with peroxynitrite in the presence of histidine monitored in the EPI positive mode are depicted by Figure 6A,B. The single charged ion at m/z 198 corresponds to an acetyl-histidine adduct not yet identified. Products attributable to polyacetylated histidine (e.g., $m/z = 240$ or 282) were not detected. Because amino acids with apolar side chains such as alanine, valine, and leucine were found to be equally acetylated by the diacetyl/peroxynitrite system (not shown) and EPR analysis of the histidine-containing reaction mixture did not exhibit any extra carbon-centered radical adduct signals but that of acetyl radical, it is tempting to assign the spin adduct to the N(α)-acetyl-L-histidine isomer. Noteworthy in this regard is that recent theoretical calculations conducted by Kyne et al. (40) on methanimine, ethylene, and aminoethylene indicated that the energy activation values for acetyl radical addition to $\text{C}=\text{N}$ and $\text{C}=\text{C}$ bonds are much lower in the latter case, which would predict formation of a carbon-centered adduct upon addition of acetyl radical to the histidine imidazole moiety.

Figure 7A shows the HPLC chromatogram of the final reaction mixture of diacetyl with peroxynitrite in dGuo-containing aerated phosphate buffer. The separation was also monitored in the EPI mode, using the m/z 310 ion (monoacetylated dGuo) as the precursor. Three peaks (1, 2, and 3) with the same molecular mass (310) appeared in the chromatogram, attesting the formation of three dGuo-derived acetylated isomers. The mass spectra of analytes 1–3 are shown by the spectra in Figure 7B–D, respectively. Interestingly, analytes 1 and 2 present similar mass spectra whereas analyte 3 does not originate fragment m/z 194, suggesting acetylation at the guanine moiety since 194 refers to acetylguanine. Furthermore, EPI experiments were conducted using the 352 and 394 m/z ions as precursors, corresponding to di- and triacetylated dGuo, respectively, and were carried out, but only the m/z 352 ion was detected (not shown). Aiming to confirm that analyte 3 does not originate fragment 194, an MS^3 experiment was performed using the m/z 310 ion as precursor 1 and the 194 ion as precursor 2.

That in fact acetyl radical produced by the peroxynitrite/diacetyl system is scavenged by both histidine and dGuo was shown by EPR spin-trapping competitive experiments with MNP at similar experimental conditions. Histidine (0.50 and 1.0 mM) added to the reaction mixture of diacetyl (5.0 mM) and peroxynitrite (2.5 mM) containing MNP (20 mM) was shown to quench the EPR signal of the MNP-acetyl radical adduct by 65 and 90%, respectively. With dGuo (0.25 mM), 75% quenching was observed with 2.5 mM diacetyl, 1.0 mM peroxynitrite, and 5.0 mM MNP in the standard phosphate buffer.

Figure 4. EPR spectra of an MNP radical adduct obtained with 20 mM MNP in phosphate buffer 500 mM, pH 7.2, after incubation with diacetyl/ peroxyntirite for 4 min at room temperature. (A) Diacetyl (10 mM) without (a) and with 1 (b), 2.5 (c), and 5 mM (d) peroxyntirite. (B) Peroxyntirite (2.5 mM) without (a) and with 5 (b), 10 (c), and 20 mM (d) diacetyl. MNP-CH₃CO[•] adduct: $a_N = a_H = 0.83$ mT (lit. NIEHS = 0.78–0.83 mT for the MNP-acetyl radical adduct).

Figure 5. Carbonate effect on the amplitude of the EPR signal of the putative MNP-CH₃CO[•] adduct. The reaction of peroxyntirite with diacetyl was performed in 200 mM aerated phosphate buffer, pH 7.2, 4 min of incubation, at room temperature. Diacetyl (5.0 mM) and peroxyntirite (2.5 mM) without (a) and with 2.5 (b), 5.0 (c), 10.0 (d), and 20 mM (f) bicarbonate.

Discussion

Uppu et al. (19), Vásquez-Vivar et al. (41), and Nakao et al. (20) reported that, following the nucleophilic attack of peroxyntirite anion on the carbonyl group of propanal, pyruvate, and acetaldehyde, respectively, a small fraction of the nascent 1-hydroxyalkylperoxyntirite anion adduct undergoes O—O homolysis, yielding NO₂ and an alkoxyl radical whose β -cleavage produces a carboxylate anion and an alkyl radical (Scheme 1, route 1b). The majority of the peroxo adduct mediated by either homolytic or heterolytic cleavage at the O—O bond was suggested to give a radical or an ion pair, respectively, which rearranges to nitrate and regenerated carbonyl reagent. Consequently, the main role of carbonyls in such reactions is to catalyze the isomerization of peroxyntirite to nitrate. The studies of the aforementioned authors, in general carried out in

Figure 6. HPLC/MS studies of the reaction of diacetyl with peroxyntirite in the presence of L-histidine. (A) HPLC chromatogram of 5.0 mM diacetyl treated with 2.0 mM peroxyntirite and 2.0 mM L-histidine in 200 mM phosphate buffer, pH 7.2, at 25 °C. Acetyl-histidine (1.80 min peak) separation was monitored at 198 amu. (B) Mass spectrum of the acetylhistidine adduct, whose identification is confirmed by the molecule fragments.

nonbuffered pH 7 aqueous solutions containing millimolar amounts of carbonyl compound (≥ 10 mM), revealed low chemical yields of carboxylate anion byproducts: 19% from acetaldehyde (24), 18% from pyruvate (41), and 8% formate

Figure 7. HPLC/MS studies of the reaction of diacetyl with peroxynitrite in the presence of dGuo. (A) HPLC chromatogram of 5.0 mM diacetyl treated with 2.0 mM peroxynitrite and 2.0 mM dGuo in 200 mM phosphate buffer, pH 7.2, at 25 °C. Peaks 1, 2, and 3, corresponding to dGuo and acetyl radical adducts, were monitored at 310 amu. Inset A shows the yield of adduct 1 at increasing concentrations of diacetyl. (B–D) Acetyl-dGuo mass spectra corresponding to peaks 1–3, respectively, detected by multiple reaction monitoring (MRM) system (310: 152 amu).

and 25% acetate from acetaldehyde (25). All of the yields were calculated from the added peroxynitrite of 1–10 mM.

On the basis of a study of peroxynitrite additions to diacetyl and other ketones “activated” by vicinal electron-withdrawing groups, Yang et al. (26) reported an alkene epoxidative capacity of the peroxo adduct, which was attributed to the formation of a dioxirane intermediate plus nitrite ion, whose redox combination yields reformed ketone and nitrate (Scheme 1, route c). In 0.16 M phosphate buffer, pH 7.4, the addition of 0.64 mM peroxynitrite to 2.9 mM diacetyl led to a final consumption of only 10% of diacetyl, possibly converted to carboxylic acids (acetic acid?). However, when carried out in the presence of 1,3-dimethylcyclohexene, the diacetyl/peroxynitrite reaction also afforded 23% of *trans*-olefin epoxide, which was taken as irrefutable evidence of a diacetyl dioxirane intermediate. Possible olefin epoxidation driven by peracetic acid, expected to be formed by the reaction between diacetyl and peroxynitrite (Scheme 2), was not experimentally investigated.

We confirm here that peroxynitrite (0.25–1.5 mM) reacts rapidly with diacetyl (1–5 mM) in phosphate buffer at pH 6.4–8.0, describing a bell-shaped profile with a maximum at pH 7.2 (Figure 1A) (26). This pH profile and the phosphate concentration-dependent rates depicted in Figure 1B are consistent with the proposal that the reaction proceeds by H_2PO_4^- ($\text{p}K_a \sim 7.2$)-catalyzed nucleophilic addition of the peroxynitrite anion to the carbonyl group. Because each diacetyl carbonyl group is activated by the adjacent electron-withdrawing carbonyl group, it is not surprising that the measured k_2 rate constant for the pair diacetyl/ ONOO^- — $1.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (in water; this work) and $1.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (in acetonitrile:water 19:1), pH 7.4, at 24 °C (26)—approaches that reported for the addition of peroxynitrite to CO_2 ($5.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (18). Although the physiological concentrations of both peroxynitrite and diacetyl, or other α -dicarbonyls such as methylglyoxal, are expected to be several orders of magnitude lower than those tested in the present work, a high second-order rate constant ($10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) may render this reaction kinetically favorable if it occurs in a cell microenvironment where the formation of both NO, superoxide radicals, and carbonyls formation is exacerbated, as in the case of diabetes (42), D-serine-induced nephrotoxicity (43), and inflammatory conditions (44). The study described here should be viewed in perspective, as the actual physiological and pathological concentrations of both diacetyl and peroxynitrite are not known. Nevertheless, chemical damage to biomolecules in pathological conditions has to be characterized as a result from long-term toxicant exposure and in situ processes.

Figure 2AB indicates that the reaction of peroxynitrite with diacetyl is accompanied by oxygen uptake dependent on the concentration of both reagents, while Table 1 shows that acetate, analyzed by capillary electrophoresis (Figure 3), is the main product from this reaction. Important to note is that the acetate yields were measured in the spent reaction mixtures obtained by dripping peroxynitrite on vigorously stirred diacetyl solutions in aqueous medium, whose pH (7.1–7.5) was ascertained by the addition of calculated amounts of phosphoric acid. Under these experimental conditions, molecular oxygen is not a limiting factor for full substrate oxidation. The stoichiometric formation of acetate (0.43 mM) was obtained from 0.19 mM peroxynitrite and excess diacetyl (5.0 mM) and from 0.75 mM peroxynitrite and 5.0 mM diacetyl (Table 1). As expected, at limiting diacetyl concentrations (0.5 mM), the acetate yields were much lower: 36–66% acetate based on added peroxynitrite (0.19–0.75 mM).

The fact that, in the presence of oxygen, the reaction of peroxynitrite with diacetyl to acetate ions proceeds via acetyl radicals was strongly suggested by EPR spin-trapping experiments with MNP. A three-line spectrum with $a_H = a_N = 0.83$

Scheme 3. Radical Acetylation of L-Histidine and 2'-Deoxyguanosine Coupled to the Reaction of Peroxynitrite with Diacetyl in Aerated Aqueous Medium

mT characteristic of the MNP- $\text{CH}_3\text{CO}^\bullet$ adduct was traced with MNP-containing peroxynitrite/diacetyl mixtures (Figure 4). The signal amplitudes responded to the concentrations of both reagents. In agreement with the relative k_2 rate constants measured for the reaction of peroxynitrite with diacetyl ($1.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) and carbon dioxide ($5.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), a competition was observed between diacetyl (5 mM) and added carbonate (2.5–20 mM) for the spin trap. Complete quenching of the diacetyl EPR adduct signal was verified at 20 mM carbonate (Figure 5).

Knowing that the pair peroxynitrite/diacetyl produces acetyl radicals at apparently high yields (Figure 3A,B) prompted us to check whether this reagent can acetylate amino acids and DNA bases. Indeed, the final reaction mixtures obtained by the addition of peroxynitrite to L-histidine and dGuo-containing diacetyl solutions were shown to contain the corresponding acetylated fragments: His- COCH_3 ($M^+ m/z = 198$) and dGuo- COCH_3 ($M^+ m/z = 310$), indicated in Figures 6 and 7, respectively. The spectrum depicted by Figure 7B is identical to that reported by Nukaya et al. for standard N^2 -acetyl-2'-deoxyguanosine ($m/z = 310$ ($M + 1$)) (45). The daughter ions 194 (base peak) and 152 were assigned to fragments formed by the release of sugar and acetyl substituents, respectively.

Scheme 3 summarizes the data reported here. Worth noting is that the enzymatic acetylation/deacetylation of histones, transcription factors, nuclear import factors, α -tubulin, lenticular crystalline, adenylate kinase, cytochrome *c*, and many other proteins regulates diverse cellular functions, including DNA repair, hormone signaling, and the cell cycle (46–48). On the other hand, physiological and xenobiotic-triggered post-translational covalent alkylation of DNA bases leading to altered DNA and protein structures and functions is also a firmly established biological event. Work is in progress to promote radical acetylations of other amino acids (especially L-lysine as it is the main target of acetylases), peptides and standard proteins (e.g., serum albumin, ribonuclease, and lysozyme), as well as other DNA bases and isolated DNA, to extend our hypothesis to these biopolymers and eventually validate it for real biological systems, particularly those where nitrate and carbonyl stress are recognized to operate concomitantly. Our results pave the way for identifying nonacetylase-catalyzed reactions of biomolecules that lead to possible cell injury and for unveiling new biomarkers of cell damage.

Acknowledgment. This work was supported by the Brazilian institutions Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and the

Milênio Redoxoma. We are indebted to Dr. Brian Bandy (College of Pharmacy and Nutrition, University of Saskatchewan, CA) for a critical reading of this manuscript.

References

- (1) Pacher, P., Beckman, J. S., and Liaudet, L. (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* 87, 315–424.
- (2) Augusto, O., Bonini, M. G., Amanso, A. M., Linares, E., Santos, C. C., and Menezes, S. L. (2002) Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. *Free Radical Biol. Med.* 32, 841–859.
- (3) Alvarez, B., Ferrer-Sueta, G., Freeman, B. A., and Radi, R. (1999) Kinetics of peroxynitrite reaction with amino acids and human serum albumin. *J. Biol. Chem.* 274, 842–848.
- (4) Goldstein, S., Lind, J., and Merényi, G. (2005) Chemistry of peroxynitrites as compared to peroxynitrates. *Chem. Rev.* 105, 2457–2470.
- (5) Lobachev, V. L., and Rudakov, E. S. (2006) The chemistry of peroxynitrite. Reaction mechanisms and kinetics. *Russ. Chem. Rev.* 75, 375–396.
- (6) Kalapos, M. P. (1999) Methylglyoxal in living organisms: Chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. *Toxicol. Lett.* 110, 145–175.
- (7) Sayre, L. M., Lin, D., Yuan, Q., Zhu, X., and Tang, X. (2006) Protein adducts generated from products of lipid oxidation: Focus on HNE and ONE. *Drug Metab. Rev.* 38, 651–675.
- (8) Stadtman, E. R. (2001) Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 928, 22–38.
- (9) Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R., and Milzani, A. (2003) Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol. Med.* 9, 169–176.
- (10) Awada, M., and Dedon, P. C. (2001) Formation of the N^2 -glyoxal adduct of deoxyguanosine by phosphoglycolaldehyde, a product of 3'-deoxyribose oxidation in DNA. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 1247–1253.
- (11) Beal, M. F. (2002) Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radical Biol. Med.* 32, 797–803.
- (12) Thornalley, P. J. (2002) Glycation in diabetic neuropathy: Characteristics, consequences, causes and therapeutic options. *Int. Rev. Neurobiol.* 50, 37–57.
- (13) Miyata, T., Ishikawa, N., and van Ypersele de Strihou, C. (2003) Carbonyl stress and diabetic complications. *Clin. Chem. Lab. Med.* 41, 1150–1158.
- (14) Picklo, M. J. P., Sr., Montine, T. J., Amarnath, V., and Neely, M. D. (2002) Carbonyl toxicology and Alzheimer's disease. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 184, 187–197.
- (15) Oppermann, U. (2007) Carbonyl reductases: The complex relationships of mammalian carbonyl- and quinone-reducing enzymes and their role in physiology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 293–322.
- (16) Lyons, T. J. (2002) Glycation, carbonyl stress, EAGLEs, and the vascular complications of diabetes. *Semin. Vasc. Med.* 2, 175–189.
- (17) Bonini, M. G., Radi, R., Ferrer-Sueta, G., Ferreira, A. M. C., and Augusto, O. (1999) Direct EPR detection of the carbonate radical anion produced from peroxynitrite and carbon dioxide. *J. Biol. Chem.* 274, 10802–10806.
- (18) Denicola, A., Freeman, B. A., Trujillo, M., and Radi, R. (1996) Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: Kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations. *Arch. Biochem. Biophys.* 333, 49–58.

- (19) Jain, S. K., McVie, R., and Bocchini, J. A., Jr. (2006) Hyperketonemia (ketosis), oxidative stress and type 1 diabetes. *Pathophysiology* 13, 163–170.
- (20) Cansever, M. S., and Erim, F. B. (2005) Determination of urinary succinylacetone by capillary electrophoresis for the diagnosis of tyrosinemia type I. *J. Chromatogr. B* 818, 309–311.
- (21) Lo, T. W., Selwood, T., and Thornalley, P. J. (1994) The reaction of methylglyoxal with aminoguanidine under physiological conditions and prevention of methylglyoxal binding to plasma proteins. *Biochem. Pharmacol.* 48, 1865–1870.
- (22) Randell, E. W., Vasdev, S., and Gill, V. (2005) Measurement of methylglyoxal in rat tissues by electrospray ionization mass spectrometry and liquid chromatography. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 51, 153–157.
- (23) McLellan, A. C., Phillips, S. A., and Thornalley, P. J. (1992) The assay of methylglyoxal in biological systems by derivatization with 1,2-diamino-4,5-dimethoxy-benzene. *Anal. Biochem.* 206, 17–23.
- (24) Uppu, R. M., Winston, G. W., and Pryor, W. A. (1997) Reactions of peroxynitrite with aldehydes as probes for reactive intermediates responsible for biological nitration. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 1331–1337.
- (25) Nakao, L. S., Ouchi, D., and Augusto, O. (1997) Oxidation of acetaldehyde by peroxynitrite hydrogen peroxide-iron(II). Production of acetate and methyl radicals. *Chem. Res. Toxicol.* 12, 1010–1018.
- (26) Yang, D., Tang, T., Chen, J., Wang, X., Bartberger, M. D., Houk, K. N., and Olson, L. (1999) Ketone-catalyzed decomposition of peroxynitrite via dioxirane intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 11976–11983.
- (27) Kovacic, P., and Cooksy, A. L. (2005) Role of diacetyl metabolite in alcohol toxicity and addiction via electron transfer and oxidative stress. *Arch. Toxicol.* 79, 123–128.
- (28) Fujioka, K., and Shibamoto, T. (2006) Determination of toxic carbonyl compounds in cigarette smoke. *Environ. Toxicol.* 21, 47–54.
- (29) Bartowsky, E. J., and Henschke, P. A. (2004) The buttery attribute of wine diacetyl desirability, spoilage and beyond. *Int. J. Food Microbiol.* 96, 235–252.
- (30) Harber, P., Saechao, K., and Boomus, C. (2006) Diacetyl-induced lung disease. *Toxicol. Rev.* 25, 261–272.
- (31) Hiraku, Y., and Kawanishi, S. (1999) Involvement of oxidative DNA damage and apoptosis in antitumor actions of aminosugars. *Free Radical Res.* 31, 389–403.
- (32) Bechara, E. J., Dutra, F., Cardoso, V. E., Sartori, A., Olympio, K. P., Penatti, C. A., Adhikari, A., and Assunção, N. A. (2006) The dual face of endogenous alpha-aminoketones: pro-oxidizing metabolic weapons. *Comp. Biochem. Physiol., Part C* 146, 88–110.
- (33) Miller, A. G., Meade, S. J., and Gerrard, J. A. (2003) New insights into protein crosslinking via the Maillard reaction: Structural requirements, the effect of enzyme function, and predicted efficacy of crosslinking inhibitors as anti-ageing therapeutics. *Bioorg. Med. Chem.* 11, 843–852.
- (34) Otsuka, M., Harada, N., Itabashi, T., and Ohmori, S. (1999) Blood and urinary levels of ethanol, acetaldehyde, and C4 compounds such as diacetyl, acetoin, and 2,3-butanediol in normal male students after ethanol ingestion. *Alcohol* 17, 119–124.
- (35) Otsuka, M., Mine, T., Ohuchi, K., and Ohmori, S. (1996) A detoxification route for acetaldehyde: Metabolism of diacetyl, acetoin, and 2,3-butanediol in liver homogenate and perfused liver of rats. *J. Biochem.* 119, 246–251.
- (36) Otsuka, M., and Ohmori, S. (1992) Simple and sensitive determination of diacetyl and acetoin in biological samples and alcoholic drinks by gas chromatography with electron-capture detection. *J. Chromatogr.* 577, 215–220.
- (37) Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., and Freeman, B. A. (1990) Apparent hydroxyl radical production of peroxynitrite. Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 1620–1624.
- (38) Lymar, S. V., and Hurst, J. K. (1995) Rapid reaction between peroxynitrite ion and carbon dioxide: Implications for biological activity. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 8867–8868.
- (39) Alvarez, B., Denicola, A., and Radi, R. (1995) Reaction between peroxynitrite and hydrogen peroxide: Formation of oxygen and slowing of peroxynitrite decomposition. *Chem. Res. Toxicol.* 8, 859–864.
- (40) Kyne, S. H., Schiesser, C. H., and Matsubara, H. (2008) Multiorbital interactions during acyl radical addition reactions involving imines and electron-rich olefins. *J. Org. Chem.* 73, 427–434.
- (41) Vásquez-Vivar, J., Denicola, A., Radi, R., and Augusto, O. (1997) Peroxynitrite-mediated decarboxylation of pyruvate to both carbon dioxide and carbon dioxide radical anion. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 786–794.
- (42) Stadler, K., Jenei, V., Somogyi, A., and Jakus, J. (2005) Beneficial effects of aminoguanidine on the cardiovascular system of diabetic rats. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 21, 189–196.
- (43) Orozco-Ibarra, M., Medina-Campos, O., Sanchez-Gonzalez, D. J., Martinez-Marionez, C. M., Floriano-Sanchez, E., Santamaria, A., Ramirez, V., Bobadilla, N. A., and Pedraza-Chaverri, J. (2007) Evaluation of oxidative stress in D-serine-induced nephrotoxicity. *Toxicology* 229, 123–135.
- (44) Kessova, I. G., Ho, Y.-S., Thung, S., and Cederbaum, A. (2003) Alcohol-induced liver injury in mice lacking Cu,Zn-superoxide dismutase. *Hepatology* 38, 1136–1145.
- (45) Nukaya, H., Iwami, T., Ishida, H., Tsuji, K., Suwa, Y., Wakabayashi, K., Nagao, M., Sugimura, T., and Kosuge, T. (1990) N-2 Acetylation of 2'-deoxyguanosine by coffee mutagens, methylglyoxal and hydrogen peroxide. *Mutat. Res.* 245, 251–257.
- (46) Kouzarides, T. (2000) Acetylation: A regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J.* 19, 1176–1179.
- (47) Backs, J., and Olson, E. N. (2006) Control of cardiac growth by histone acetylation/deacetylation. *Circ. Res.* 98, 15–24.
- (48) Ito, T. (2007) Role of histone modification in chromatin dynamics. *J. Biochem.* 141, 609–614.

TX7002799

ANEXO B

Co-autoria no Artigo:

1762

Chem. Res. Toxicol. **2010**, *23*, 1762–1770

Acetyl Radical Production by the Methylglyoxal–Peroxynitrite System: A Possible Route for L-Lysine Acetylation

Júlio Massari,^{†,‡} Rita Tokikawa,[†] Luiz Zanolli,[‡] Marina Franco Maggi Tavares,[‡]
Nilson Antônio Assunção,[§] and Etelvino José Henriques Bechara^{*,†,§}

Departamento de Bioquímica and Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil, and Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, SP, Brazil

Received July 1, 2010

Acetyl Radical Production by the Methylglyoxal–Peroxynitrite System: A Possible Route for L-Lysine Acetylation

Júlio Massari,^{†,‡} Rita Tokikawa,[†] Luiz Zanolli,[‡] Marina Franco Maggi Tavares,[‡]
Nilson Antônio Assunção,[§] and Etelvino José Henriques Bechara^{*,†,§}

Departamento de Bioquímica and Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil, and Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, SP, Brazil

Received July 1, 2010

Methylglyoxal is an α -oxoaldehyde putatively produced in excess from triose phosphates, aminoacetone, and acetone in some disorders, particularly in diabetes. Here, we investigate the nucleophilic addition of ONOO^- , known as a potent oxidant and nucleophile, to methylglyoxal, yielding an acetyl radical intermediate and ultimately formate and acetate ions. The rate of ONOO^- decay in the presence of methylglyoxal [$k_{2,\text{app}} = (1.0 \pm 0.1) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $k_2 \approx 1.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$] at pH 7.2 and 25 °C was found to be faster than that reported with monocarbonyl substrates ($k_2 < 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), diacetyl ($k_2 = 1.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), or CO_2 ($k_2 = 3\text{--}6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). The pH profile of the methylglyoxal–peroxynitrite reaction describes an ascendant curve with an inflection around pH 7.2, which roughly coincides with the pK_a values of both ONOOH and H_2PO_4^- ion. Electron paramagnetic resonance spin trapping experiments with 2-methyl-2-nitrosopropane revealed concentration-dependent formation of an adduct that can be attributed to 2-methyl-2-nitrosopropane- CH_3CO^* ($a_N = 0.83 \text{ mT}$). Spin trapping with 3,5-dibromo-4-nitrosobenzene sulfonate gave a signal that could be assigned to a methyl radical adduct [$a_N = 1.41 \text{ mT}$; $a_H = 1.35 \text{ mT}$; $a_{H(m)} = 0.08 \text{ mT}$]. The 2-methyl-2-nitrosopropane- CH_3CO^* adduct could also be observed by replacement of ONOO^- with H_2O_2 , although at much lower yields. Acetyl radicals could be also trapped by added L-lysine as indicated by the presence of ^6N -acetyl-L-lysine in the spent reaction mixture. This raises the hypothesis that $\text{ONOO}^-/\text{H}_2\text{O}_2$ in the presence of methylglyoxal is endowed with the potential to acetylate proteins in post-translational processes.

Introduction

Methylglyoxal (MG) is a highly reactive α -oxoaldehyde putatively produced in vivo by three distinct enzymatic routes [(i) formation from triose phosphates, (ii) cytochrome P450 IIE1-catalyzed acetone oxidation, and (iii) amine oxidase(s)-driven amino acid breakdown] as well as by nonenzymatic pathways from glucose, triose phosphates, acetoacetate, succinylacetone, and aminoacetone (1–9). Exogenous sources of MG include many food products, beverages, fog and rainwater, urban atmosphere, and cigarette smoke (10). Although MG is normally consumed by glyoxalases, aldehyde oxidases, and other enzymes, MG undergoes biologically adverse nucleophilic additions and promotes protein aggregations that are purportedly involved in diabetes, Alzheimer's disease, and other age-related diseases (3, 4). Nanomolar to micromolar concentrations of free MG have been reported in normal human plasma (4), the variability being probably related to conjugation of MG with proteins and to different methods used in sample preparation and analysis (4, 11). According to Beisswenger et al. (12), the concentration of MG in blood plasma of normal human subjects

is $123 \pm 37 \text{ nM}$ and in type 2 diabetics $189.3 \pm 38.7 \text{ nM}$, while cellular concentrations of MG were in the range of 1–5 μM (4).

The high reactivity of MG and other dicarbonyl metabolites (e.g., diacetyl, 4,5-dioxovaleric acid, and osazones) to biological nucleophiles (e.g., basic amino acids, DNA bases, and thiols) lies in the electron withdrawing effect of a vicinal carbonyl group, which increases the electrophilicity of the adjacent carbonyl moiety, thereby facilitating nucleophilic attack. Accordingly, MG has been found in aqueous solutions as a mixture of hydrated derivatives in dynamic equilibrium, where MG monohydrate (56–62%) and dihydrate (38–44%) forms prevail and only traces of the free form are observed (13). Experiments conducted by Thornalley and co-workers with MG in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) at 37 °C revealed the approximate ratio of these forms of 28:71:1 (MG monohydrate:MG dihydrate:free MG) (14).

The higher reactivity of α -dicarbonyls, particularly MG, compared to that of monocarbonyls, explains the recently reported k_2 value for the addition of peroxynitrite anion to diacetyl ($\approx 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (15, 16) that is 1 order of magnitude higher than that of monocarbonyls ($< 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (16–18). In addition to being a powerful nucleophile, peroxynitrite can directly or indirectly drive one- and two-electron oxidations, nitrosations, and nitrations of biomolecules, of which a number of final products have been detected and adopted as biomarkers of disorders. The detection of these products in biological samples allows them to be linked with the clinical manifestations of various maladies such as Alzheimer's disease, rheumatoid

* To whom correspondence should be addressed: Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 748, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil. Phone: 55-11-30913869. Fax: 55-11-38155579. E-mail: ebechara@iq.usp.br.

[†] Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

[‡] Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

[§] Universidade Federal de São Paulo.

Scheme 1. Hypothetical Mechanism Pathways for the Peroxynitrite-Initiated Aerobic Oxidation of MG in an Aqueous Medium to Formate and Acetate Ions, Mediated by Acetyl Radical^a

^a The data obtained from kinetic, product, and spectroscopic analyses favor route 1, predicted by the long-known higher reactivity of aldehydes with nucleophiles compared to that of ketones.

arthritis, atherosclerosis, lung injury, amyotrophic lateral sclerosis, diabetes, cancer, and drug-dependent toxicity (19–28).

Recently, when revisiting the nucleophilic addition of peroxynitrite to diacetyl, first studied by Yang et al. (16), we demonstrated large amounts of acetyl radical intermediate in the reaction mixture allowing coupled acetylation of added L-histidine or 2'-deoxyguanosine (dGuo) (15). On the basis of previous work by Pryor's group (17) and Augusto's group (18), the mechanism underlying acetyl radical production was envisaged as being initiated by nucleophilic attack of peroxynitrite on diacetyl yielding a hypothetical nitrosoperoxydiacetyl intermediate, whose homolysis yields nitrogen dioxide and an oxyl radical. The latter then undergoes β -cleavage producing two fragments, acetate anion and acetyl radical, whose fate can be direct oxidation by dissolved dioxygen, ultimately yielding acetate anion, or addition to L-His or dGuo, forming the corresponding acetylated compounds (Scheme 1). In vivo, more than 99% of produced MG may be consumed by proteins via Schiff additions to arginine and lysine residues (29, 30). Knowing that enzymatic post-translational acetylations and deacetylations of proteins regulate key cellular events (31), the authors raised the hypothesis that diacetyl- or MG-triggered radical acetylation in vivo might contribute to these epigenetic processes.

We show here that MG reacts with peroxynitrite 10-fold faster than does diacetyl and may eventually compete with HCO_3^- /

CO_2 as an electrophilic target in the peroxynitrite reaction, although one should keep in mind the fact that the concentration of bicarbonate in tissues is 4 orders of magnitude higher than that of MG (4, 21). Acetyl radical, produced by MG-oxyl radical homolysis, and methyl radical, probably formed from decarbonylation of acetyl radical, were captured by electron spin paramagnetic resonance (EPR) using appropriate spin traps. Acetate and formate are expectedly the main reaction products. Finally, previous addition of L-lysine to the reaction mixture yielded the corresponding *N*-acetylated amino acid.

Materials and Methods

Chemicals and Reagents. HPLC grade acetonitrile, ammonium formate, cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), Chelex-100, 3,5-dinitrobenzoic acid (DNB), 2,4-dinitrophenylhydrazine, HPLC grade methanol, 2-methyl-2-nitrosopropane dimer (MNP), a 40% aqueous methylglyoxal (MG) solution, H_3PO_4 , and NaNO_2 were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Acetic acid, HCl, H_2O_2 , MnO_2 , NaOH, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, and $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). L-Lysine-HCl was acquired from Fluka (Buchs, Switzerland). The spin trap 3,5-dibromo-4-nitrosobenzenesulfonic acid (DBNBS) was synthesized as previously described (32). Peroxynitrite was synthesized from NaNO_2 (0.60 M) and H_2O_2 (0.70 M), in HCl (0.60 M) and NaOH (1.50 M) in a quench-flow reactor (33). Excess H_2O_2 in the alkali peroxynitrite solution was eliminated with MnO_2 . Concentrations of H_2O_2 and peroxynitrite were determined spectrophotometrically at 240 ($\epsilon = 42 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (34) and 302 nm ($\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (33, 35), respectively. The peroxynitrite concentrations obtained by this method ranged from 300 to 450 mM. Stock solutions of peroxynitrite were kept on ice in the dark. All the solutions were prepared in Millipore Milli-Q purified water, and the buffers were pretreated with Chelex-100 to remove metal contaminants. Methylglyoxal stock solutions were determined by previous derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine in MeOH-HCl for 40 min at 42 °C, which yields an adduct measured at 432 nm ($\epsilon = 39300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (36).

Stopped-Flow Kinetics. The rate of peroxynitrite decay was monitored with a stopped-flow spectrophotometer (Applied Photophysics model SX-18 V) at 302 nm. The temperature was kept constant at 25.0 ± 0.2 °C, and the pH values of the reaction mixtures were determined by a simulated experiment in Eppendorf tubes under the same conditions. The initial concentration of peroxynitrite was kept at 200 μM . Pseudo-first-order rates, k_{obs} (s^{-1}), were determined by linear fit from $\ln A$ versus time (0–30 ms). The results of 9–12 measurements were averaged to yield each rate constant. The apparent second-order rate constant ($k_{2,\text{app}}$) was calculated from slopes of the plots of k_{obs} versus MG concentration. The rate of peroxynitrite decay in the buffer solution, k_0 , was subtracted from k_{obs} before the data were plotted versus pH or phosphate buffer concentration. All the data were fit using Origin 7 (Microcal Software, Inc.).

EPR Spin Trapping Experiments. EPR spin trapping spectra with MNP were recorded at room temperature using a Bruker EMX spectrometer. All of the spectra were recorded after incubation of the reagents for 4 min, except when the spin trap was DBNBS (2 min), in 250 mM phosphate buffer (pH 7.2). At the end of the experiment, the pH was measured to detect possible changes caused by the addition of alkaline stock solutions of peroxynitrite to the buffered reaction mixtures. The instrumental conditions were as follows: microwave power, 20.17 mW; modulation amplitude, 0.1 mT; time constant, 163.840 ms; and receiver gain, 2.52×10^4 for experiments conducted with MG, peroxynitrite, MNP, and bicarbonate and 2.52×10^5 for experiments with DBNBS as the spin trap or MG, H_2O_2 , and MNP.

Oxygen Consumption. Oxygen uptake was monitored in a Hansatech oxygraph equipped with a Clark type electrode. All the experiments were conducted in air-equilibrated 200 mM phosphate buffer (pH 7.2) at 25 °C.

Capillary Electrophoretic Analysis. The electropherogram traces for carboxylic acids were obtained with a system (model P/ACE 551) from Beckman Instruments (Fullerton, CA) equipped with a filter-carrousel UV detector set at 254 nm for indirect detection, with the temperature control device maintained at 25 °C. The background electrolyte was 10 mM DNB, with 0.10 mM CTAB, and the final pH was 3.6. Fused-silica capillaries (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ) with dimensions of 50.0 cm (total length) (40 cm effective length), 50 μ m (inside diameter), and 375 μ m (outside diameter) were used. Separation was performed at a constant voltage (−20 kV). Samples were injected hydrodynamically with 1 psi for 3 s. Aliquots of peroxyxynitrite and phosphoric acid (2.5–11.0 mM), sufficient to obtain a final pH ranging from 7.1 to 7.5, were added to the millimolar MG-containing solution, which was stirred vigorously in a Vortex system before capillary electrophoresis (CE) measurements were taken. Oxalic acid was used as an internal standard, and the reaction mixture was analyzed immediately.

CE-MS/MS Analysis. All analyses were performed with a P/ACE MDQ system from Beckman Instruments, coupled to a Thermo Finnigan mass spectrometer (MS), a model LCQ Ion Max Advanced with an electron spray ion source, and an ion trap analyzer from Thermo Electron Corp. (Waltham, MA). The sheath liquid (50:49.5:0.5 methanol/water/acetic acid mixture) was pumped (5 μ L/min) into the interface with a syringe from Hamilton (Reno, NV) installed in the MS. An uncoated fused-silica capillary from

Polymicro Technologies (Phoenix, AZ) was used (total length of 90 cm and inside diameter of 50 μ m). Separation was performed at a constant voltage (25 kV). The separation buffer was 50 mM ammonium acetate (pH 3.5). The CE capillary was preconditioned with 1.00 M NH_4OH , deionized water, and finally separation buffer for 5 min in each step at a pressure of 50 psi. Samples were injected hydrodynamically (injection time of 10 s at 2 psi). Experimental MS and MS/MS conditions were as follows: number of microscans, 3; microscan time, 200 ms; capillary temperature, 275 °C; spray voltage, 27 V; and tube lens offset, −8 V. MS/MS experiments were conducted in the positive ion mode at an ion spray voltage of 4.5 kV. Mass spectrometry tuning was performed with Xcalibur 1.4 SR1 (Thermo Electron Corp.) using a direct infusion of 20 μ M L-lysine at a pressure of 10 psi. Data acquisition was performed by MS/MS scans at the most intense peaks with the normalized collision energy for MS/MS set to 35% and an isolation width of m/z 1.0. A minimal signal intensity threshold of 1×10^3 was set for the acquisition of the MS/MS data. Nitrogen was used as a nebulization and sweep gas at flow rates of 15 and 5 arbitrary units, respectively, and helium was used for the fragmentation process.

Results

Peroxyxynitrite Decay. Time courses of the consumption of peroxyxynitrite (200 μ M) by MG (0–20 mM), monitored at 302 nm, are shown in Figure 1A. The pseudo-first-order rate

Figure 1. Stopped-flow kinetics of peroxyxynitrite decay in the presence of MG. (A) Kinetic traces of peroxyxynitrite (200 μ M) decay at different MG concentrations (0–20 mM) in air-equilibrated 250 mM phosphate buffer (pH 7.2) at 25 °C. (B) Pseudo-first-order rate constants (k_{obs}) for the decay of peroxyxynitrite in the presence of MG under the same experimental conditions. Each k_{obs} value represents the mean of nine measurements. (C) pH profile of the reaction of MG (3.0 mM) with peroxyxynitrite (200 μ M) in air-equilibrated 250 mM phosphate buffer at 25 °C. (D) Catalytic effect of phosphate anion on the observed rate of peroxyxynitrite (200 μ M) treated with MG (4.0 mM) at pH 7.2 and 25 °C. The ionic strength of the phosphate buffer was kept constant via the addition of sodium chloride. The data represent the means of nine independent measurements.

Figure 2. Time courses of uptake of oxygen by MG treated with peroxynitrite, in 200 mM phosphate buffer (pH 7.2) at 25 °C. (A) MG (1.0 mM) in the absence of peroxynitrite (a) and 0.05 (b), 0.10 (c), 0.25 (d), 0.50 (e), 1.00 (f), 1.50 (g), and 2.50 mM MG (h) treated with 1.0 mM peroxynitrite. (B) MG (1.0 mM) in the absence (a) and presence of 0.25 (b), 0.50 (c), 0.75 (d), 1.00 (e), 1.50 (f), and 2.00 mM peroxynitrite (g).

constants (k_{obs}) were found to increase linearly with the initial concentration of MG, revealing an apparent second-order rate constant ($k_{2,\text{app}}$) equal to $(1.0 \pm 0.1) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (mean value of three independent $k_{2,\text{app}}$ determinations) in 250 mM phosphate buffer (pH 7.2) at 25 °C (Figure 1B). Because (i) <1% of dissolved MG is present in the free ketoaldehyde form due to extensive MG hydration (13, 14) and (ii) the phosphate-catalyzed MG diol dehydration is a very slow process ($k_d = 7.7 \times 10^{-2}$ and $5.7 \times 10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for general acid and general base phosphate catalysis, respectively, at 25 °C, $\mu = 0.2 \text{ M}$) (37), the actual value of k_2 must be corrected by the expression $k_2 = k_{2,\text{app}}(1 + \text{unreactive forms/keto aldehyde form})$ (16), which gives a k_2 value of $\approx 1.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ assuming free MG as 1% of the nominal MG concentration. This value is 2 orders of magnitude higher than that observed for monocarbonyls (17, 18), 10-fold higher than that with diacetyl (15, 16), and 2–3 times higher than the rate constant reported for $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ at pH 7.2–7.4 and 25–37 °C ($3\text{--}6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (21, 38–40). The pH profile of the MG–peroxynitrite reaction, monitored in the pH range of 6.2–8.2, obeys a third-degree equation, displaying a shoulder at pH 7.2 (Figure 1C). Going from pH 6.2 to 7.2, the ascendant curve may be attributed to an increasing concentration of the nucleophile (peroxynitrite), and the concomitant decrease of the H_2PO_4^- anion concentration, which catalyzes the nucleophilic addition to MG (14). The sharper increase in the curve above pH 7.2 may be due to dehydration of MG diol to its free, reactive carbonyl form, catalyzed by the monophosphate anion, as suggested by Thornalley et al. (14) in their study of addition of aminoguanidine to MG, a much slower reaction ($k_2 = 178 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ at pH 7.4 and 37 °C) (14). The occurrence of general base catalysis by phosphate anion in the reaction of MG with peroxynitrite is supported by the linear dependence of k_{obs} on phosphate buffer concentration (0.05–0.50 M; pH 7.2) (Figure 1D).

Oxygen Uptake and Product Analysis. Addition of peroxynitrite to MG is expected to be followed by rearrangement of a peroxonitroso adduct to re-formed MG and nitrate ion, in parallel with adduct homolysis to a MG-derived oxyl radical that ultimately produces formate and acetyl radical by β -cleavage (15–18). Annihilation of acetyl radical by dissolved dioxygen would lead to acetate ion as a side product. Accordingly, uptake of oxygen by the MG (0.05–2.5 mM)–peroxynitrite (0.25–2.0 mM) system was found to occur in a reagent concentration-dependent fashion (Figure 2). Control experiments

Figure 3. CE of the reaction products of MG treated with peroxynitrite. Electropherograms of a standard mixture (a) and the final reaction mixture of 1.00 mM MG, treated with 1.00 mM peroxynitrite and 2.75 mM phosphoric acid, with the final pH ranging from 7.2 to 7.5 (b). Peak identification: (1) system peak, (2) nitrite, (3) nitrate, (4) phosphate, (5) glyoxalate, (6) formate, (7) oxalate (internal standard), and (8) acetate. Experimental conditions: 10 mM DNB with 0.10 mM CTAB (pH 3.6), fused-silica capillaries with 50.0 cm L_{tot} , 40 cm L_{eff} and 50 μm inside diameter and 375 μm outside diameter, separation at -20 kV , indirect detection at 254 nm, and samples injected hydrodynamically under 1 psi for 3 s. Control experiments with MG alone did not show the presence of formate or acetate.

with peroxynitrite alone showed the expected liberation of molecular oxygen, which was subtracted from the oxygen uptake curves obtained with the complete system. The total consumption of oxygen ($70 \pm 10 \mu\text{M}$; $n = 4$) by the reaction mixture containing 1.0 mM MG and 1.0 mM peroxynitrite in 200 mM phosphate buffer (pH 7.2) at 25 °C was not affected upon addition of nitrite (0.10–5.0 mM), a known contaminant of peroxynitrite stock solutions (33), and a product of peroxynitrate decomposition (41, 42). Formate and acetate ions were detected by CE as the main products in the final reaction mixtures maintained under continuous aeration for 30 min (Figure 3 and Table 1). The equipment was calibrated with a mixture of nitrite, nitrate, phosphate, glyoxalate, formate, and acetate (products predicted by the proposed schemes) at known concentrations, and oxalate was used as an internal standard. The absence of glyoxalate in the electropherogram strongly supports the notion that the MG carbonyl group most prone to nucleophilic attack is indeed the aldehydic (C1), not the MG ketonic group (C2). Both MG and peroxynitrite (each at 1 mM) produced 0.59 mM acetate and 0.48 mM formate, i.e., approximately 50% chemical yield of MG fragmentation to acetate and formate in a 1:1 ratio. Initial concentrations of 2.5 mM MG and 3.0 mM peroxynitrite

Table 1. Product Analysis of the Reaction of MG with Peroxynitrite^a

[MG] (mM)	1.00 mM ONOO ⁻	1.50 mM ONOO ⁻	3.00 mM ONOO ⁻	4.50 mM ONOO ⁻
1.00	0.59* 0.48#	0.59* 0.56#	0.79* 0.68#	0.78* 0.63#
2.50	0.70* 0.74#	0.79* 0.86#	0.89* 0.93#	1.06* 0.89#
10.0	0.71* 0.39#	0.85* 0.62#	1.04* 0.67#	1.44* 0.82#

^a CE was used to separate and quantify formate (*) and acetate (#) present in the reaction mixture (see the electropherograms in Figure 3).

yielded both products at ~0.90 mM (~30%). Upon addition of nitrite (0.25 and 0.50 mM; $n = 4$) to a mixture containing 1.0 mM MG and peroxynitrite, the yields of formate and acetate did not change significantly.

Important to note is the fact that the reaction samples for measuring the chemical yield of products were prepared as previously reported in a similar study with diacetyl (15), where care was taken via adjustment of the pH with phosphoric acid to keep the final pH between 7.1 and 7.5, and the oxygen concentration was not limiting because of the vigorous stirring of the reaction mixture.

EPR Spin Trapping Studies. EPR spin trapping studies with 20 mM MNP or 10 mM DBNBS were conducted in normally aerated MG-containing phosphate buffer upon treatment with peroxynitrite to possibly detect and identify carbon-centered radical intermediates.

In the presence of MNP, MG and peroxynitrite gave a triplet signal with an a_N of 0.83 mT that could be assigned to the MNP–acetyl radical adduct (for lit. NIEHS, $a_N = 0.78$ –0.83

Figure 4. EPR spin trapping studies with MNP (20 mM) and DBNBS (10 mM) of the MG–peroxynitrite or hydrogen peroxide system in 250 mM phosphate buffer (pH 7.2) after incubation for 4 min at room temperature. (A) Spectra of a MNP–acetyl radical adduct obtained from peroxynitrite (1.5 mM) without (a) and with 5.0 (b), 10 (c), and 20 mM MG (d). (B) Spectra of MG (10 mM) without (a) and with 0.5 (b), 1.5 (c), and 2.5 mM peroxynitrite (d). For the MNP–acetyl adduct, a_N (observed) = 0.83 mT (for lit. NIEHS, $a_N = 0.78$ –0.83). (C) Effect of carbonate on the amplitude of the EPR signal of the MNP–acetyl adduct obtained from MG (20 mM) and peroxynitrite (2.5 mM) without (a) and with 2.5 (b), 5.0 (c), 7.5 (d), 10.0 (e), and 12.5 mM sodium bicarbonate (f). (D) Incubation of MG with hydrogen peroxide: (a) MNP signal control and (b) reaction mixture containing 20 mM MG and 20 mM hydrogen peroxide. The signal marked O ($a_N = 1.72$ mT) is assigned to the di-*tert*-butylnitroxide signal (MNP contaminant) (43, 44) and the signal marked X ($a_N = 0.83$ mT) to the MNP–acetyl radical adduct. Minor undetermined carbon-centered radical signals are also detected, as reported by Nakayama et al. (45) in EPR studies with DBNBS, MG, and H_2O_2 . (E) EPR spectra of a methyl radical adduct obtained with DBNBS after incubation of MG with peroxynitrite: (a) 20 mM MG (control), (b) 1.5 mM peroxynitrite (control), and (c) complete system. The signal marked X can be assigned to the oxidation product of DBNBS by peroxynitrite in the presence of sulfite that originated from DBNBS itself (48), whereas the other signal [$a_N = 1.42$ mT; $a_H = 1.34$ mT; $a_{H(m)} = 0.07$ mT] can be attributed to a methyl–DBNBS adduct (46, 47), which is expected to be the origin of three splittings from the three hydrogen atoms of the methyl group.

mT) (Figure 4A,B). The formyl radical adduct with MNP (for lit. NIEHS, $a_N = 0.7\text{--}0.77$ mT and $a_H = 0.14\text{--}0.25$ mT) was not detected in the EPR spectrum. The EPR signal was intensified with an increase in the concentrations of both MG (5–20 mM) and peroxynitrite (0.50–2.5 mM). That MG competes significantly with carbon dioxide for the peroxynitrite anion was indicated by the concentration-dependent quenching effect of added bicarbonate (2.5–12.5 mM) on the amplitude of the MNP triplet adduct signal obtained with 20 mM MG and 2.5 mM peroxynitrite (Figure 4C). The EPR signal was totally suppressed upon addition of bicarbonate at concentrations of >10 mM. Important to note is the fact that millimolar peroxynitrite can be replaced with H_2O_2 (20 mM) to generate the hypothetical MNP–acetyl radical adduct ($a_N = 0.83$ mT) (Figure 4D). Another signal could be assigned to di-*tert*-butylnitroxide ($a_N = 1.72$ mT), a contaminant frequently found in solutions of MNP (43, 44), and minor nonidentified signals appeared as well (Figure 4D). In this regard, it is important to note that Nakayama et al. (45) reported the occurrence of a DBNBS–methyl radical adduct, among minor nonidentified adducts, when treating MG with H_2O_2 .

In turn, using DBNBS in the reaction of MG with peroxynitrite, the characteristic EPR signal corresponding to its methyl radical adduct appears: $a_N = 1.41$ mT; $a_H = 1.34$ mT; $a_{H(m)} = 0.07$ mT (Figure 4E) (46, 47). Methyl radical is predicted to be formed from the decarbonylation of acetyl radical and, less probably, from the fragmentation of a peroxonitroso adduct generated by the attack of peroxynitrite on C(2) of MG. If this were so, the counterfragment of MG oxidation, glyoxalate, should have appeared as a peak in the electropherogram of the spent reaction mixture. The signal present in the control experiment without MG ($a_N = 1.25$ mT; $a_H = 0.06$ mT) can be attributed to a DBNBS– $\text{SO}_3^{\cdot-}$ adduct (48) (Figure 4E).

CE-MS/MS Analysis of Acetylated L-Lysine. Panels A and B of Figure 5 depict the electropherograms of the final reaction mixture of 5.0 mM L-lysine, 10 mM MG, and 2.5 mM peroxynitrite monitored by the MS peak at m/z 147 (L-lysine) and m/z 189 (acetyl-L-lysine), respectively. The insets show the MS spectra of the corresponding electrophoretic peaks. The MS/MS fragmentation pattern of the ion at m/z 189.04 is shown in Figure 5C. The assignment of the MS/MS spectrum to an ϵ -N-acetyl-L-lysine adduct is supported by the following data. The $[\text{acetyllysine} + \text{H}]^+$ species (m/z 189.04) is expected to undergo dehydration to form the ion at m/z 171 and subsequent decarbonylation to the ion at m/z 143, yielding an immonium fragment whose deamination renders the ion at m/z 126. Deacetylation of the immonium ion ($-\text{CH}_2\text{CO}$) then produces the fragment at m/z 84. The high abundance of the immonium fragments at m/z 143 and 126, according to Trelle and Jensen (49), is evidence of L-lysine acetylation in the ϵ -amino group, which is mechanistically unfavorable in the case of the α -isomer. Accordingly, had an α -N-acetyl-L-lysine adduct been produced, its protonated form would have lost a H_2CO_2 group and subsequently a CH_2CO group to yield an m/z 101 fragment. This fragment is, in fact, reported by the Spectral Database for Organic Compounds (MS-NW-7638 SDBS no. 22048) for α -N-acetyl-L-lysine, but it was not found in our samples. In addition, unidentified fragments at m/z 157 and 129 are present in the spectrum of the final reaction mixture, but not in the standard spectrum of α -N-acetyl-L-lysine.

Discussion

Nucleophilic addition of peroxynitrite to diacetyl in air-equilibrated phosphate has been shown to yield acetyl radical

(15, 16) and to acetylate L-histidine and dGuo added to the reaction mixture (15). This reaction raised the hypothesis that peroxynitrite and α -oxocarbonyls overproduced in metabolic situations such as inflammation in cellular sites might drive protein and DNA acetylation, thereby triggering adverse responses. We now studied MG, a metabolite putatively implicated in diabetes and other ketogenic disorders, as the electrophilic target for peroxynitrite, relying on the long-known higher reactivity of aldehydes compared to that of ketones. Nakayama et al. (45) recently reported that MG does, in fact, react with H_2O_2 , yielding $\text{HO}^\cdot$ and carbon-centered radicals, which was demonstrated by the use of EPR spin trapping with 5,5-dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide (DMPO) and DBNBS. This reaction was shown to emit light in the presence of luminol, probably initiated by $\text{HO}^\cdot$ radical (indirect chemiluminescence); however, the mechanism underlying the MG– H_2O_2 reaction was not clearly determined. Here, we have extended our studies on the MG–peroxynitrite system to the MG– H_2O_2 system, because an MG– H_2O_2 adduct could also undergo homolysis to an oxyl radical, although at a slower rate, and ultimately yield acetyl radical, which was not detected by Nakayama et al. (45). By analogy, Augusto et al. (50) have demonstrated that pyruvate reacts with both peroxynitrite and H_2O_2 , yielding acetate and $\text{CO}_2^{\cdot-}$ radical.

The second-order rate constant for addition of peroxynitrite anion to MG is estimated here by stopped-flow kinetics to be approximately $1.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ in 250 mM phosphate buffer (pH 7.2) at 25 °C (Figure 1). This value is higher than the values reported for diacetyl ($k_2 = 1.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (15) and $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ ($k_2 = 3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), under similar experimental conditions (38, 39). The rate constants were calculated here from the experimental values, taking into consideration the actual concentrations of the free forms of MG in aqueous medium. Diacetyl and MG exist under dynamic equilibrium in aqueous medium with their mono- and dihydrate forms, where the dicarbonyl species are present at concentrations of only 23 and 1%, respectively (14, 16). The rate constant for phosphate-catalyzed dehydration of MG diol is several orders of magnitude lower than that of addition of peroxynitrite to MG (37). The hydration equilibrium constants are affected by the solvent's polarity, with the ratio of MG free to hydrate forms probably favoring the free, reacting species in hydrophobic, cell membrane environments.

Our experiments were performed at apparently nonphysiological concentrations. As the steady-state concentration of $\text{NO}^\cdot$ in physiological systems falls in the nanomolar range, that of peroxynitrite formed by the diffusion-controlled reaction of $\text{NO}^\cdot$ with superoxide anion radical is on the same order of magnitude. Indeed, estimates of the steady-state concentration of physiological CO_2 -limited peroxynitrite by Ferrer-Sueta and Radi (22) are in the range 2–3 nM and often 2 orders of magnitude lower. Therefore, the pseudo-first-order rate constant for the reaction of MG with peroxynitrite ($k_2 \approx 1.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) is expected to be in the range of $10^{-4}\text{--}10^{-6} \text{ s}^{-1}$. Considering that the MG reaction with plasma proteins displays rate values of $\sim 5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (2), reaction of MG with proteins may overwhelm that with peroxynitrite. In addition, although the k_2 value for the reaction of peroxynitrite with MG is 2–3 times higher than that with CO_2 , one cannot disregard the presence of CO_2 in the physiological medium (1.3 mM) at much higher concentrations than MG (21). Nevertheless, it is tempting to propose that radical acetylation of biomolecules may take place chronically in vivo in specific microenvironments of tissues under adverse oxidative, nitrosative, and carbonyl stress. The pH profile of the

Figure 5. CE-MS/MS product analysis of L-lysine treated with the MG-peroxynitrite system. The reaction mixture consisted of 5.0 mM L-lysine, 10 mM MG, and 2.5 mM peroxynitrite in 200 mM phosphate buffer (pH 7.2). (A) Electropherogram traced at MS m/z 147 and (B) electropherogram traced at MS m/z 189. Insets show the MS spectra of corresponding electrophoretic peaks. (C) MS/MS of molecular ion at m/z 189, which can be attributed to ϵ -N-acetyl-L-lysine formed by addition of the reaction-generated acetyl radical to the amino acid. Acetylated lysine was not detected in control experiments that included L-lysine alone, L-lysine with peroxynitrite, or L-lysine with MG.

MG-peroxynitrite reaction displays an ascending curve from lower pH toward neutrality, and then a long inflection resembling a plateau at pH $\sim$ 7.2, which is followed by a sharp increase at alkaline pH values (Figure 1C). The ascendant portion of the curve may be attributed to increasing concentrations of the attacking peroxynitrite anion ($pK_a = 6.8$, tending to slightly higher values with increasing ionic strengths) (20) and to general acid catalysis of the nucleophilic addition to MG by the $H_2PO_4^-$ anion ($pK_a = 7.2$), but not by the conjugated

base HPO_4^{2-} . In agreement with a catalytic effect of phosphate anion on the MG-peroxynitrite reaction, the observed rate constants increase with an increase in buffer concentration (Figure 1D).

The MG reaction with peroxynitrite is accompanied by concentration-dependent oxygen uptake (Figure 2), ultimately forming acetate and formate ions (Figure 3 and Table 1), derived from oxidative fragmentation of the MG C(1)–C(2) bond. Pyruvate and glyoxalate ions were not detected in the electro-

Scheme 2. Mechanism of Acetylation of L-Lysine by the MG–Peroxynitrite System in Aqueous Medium

perograms obtained from the spent reaction mixtures, thereby ruling out reactions involving direct oxidation of MG to pyruvate or attack of peroxynitrite on C(2) of MG leading to glyoxalate and formate ions. On the basis of previously reported works about the mechanism of addition of peroxynitrite to carbonyls such as ethanal and propanal (17), pyruvate and acetaldehyde (50, 18), and diacetyl-derived compounds (16) (diacetyl) (15, 16), we envisage the reaction as proceeding through the steps depicted by Scheme 1, probably route 1 as follows.

Following attack of the phosphate-catalyzed peroxyxynitrite anion on C(1) of MG, the nascent hypothetical nitrosoperoxy adduct undergoes O—O bond cleavage to form NO₂ and a MG-derived oxyl radical, whose β -scission yields acetyl radical and formate ion. Subsequent acetyl radical oxidation by molecular oxygen yields in acetate ion (Scheme 1). From classical photochemistry of carbonyl compounds, it is known that decarbonylation of acetyl radical to methyl radical (Norrish type 1 photoreactions) is expected to occur. On the other hand, had the addition of peroxyxynitrite to MG unexpectedly occurred at the less reactive C(2) atom (route 2b of Scheme 1), glyoxalate anion should have been detected as one of the main products, which was not the case. Moreover, all attempts to detect formyl radical by spin trapping with MNP have failed. The fact that acetyl and methyl radicals can indeed be generated by the MG—peroxyxynitrite reaction is strongly suggested by EPR spin trapping experiments with MNP and DBNBS, respectively (Figure 4). Therein, EPR signals that can be attributed to the MNP—acetyl radical adduct ($a_N = 0.83$ mT) and to the DBNBS—methyl radical adduct [$a_N = 1.41$ mT; $a_H = 1.34$ mT; $a_{H(m)} = 0.07$ mT] were obtained. Methyl radical could also yield formate anion by dioxygen insertion followed by a Russell reaction (51). Significant competition between MG and CO₂ in the peroxyxynitrite reaction is indicated by quenching of the MNP—acetyl adduct signal upon addition of carbonate at relatively high concentrations (Figure 4C). This finding strengthens the hypothesis of the biological relevance of this reaction. Moreover, although much less reactive, H₂O₂ can replace peroxyxynitrite in the acetyl radical-generating reaction of MG (Figure 4D). Noteworthy in this respect is the fact that Nakayama et al. (45) previously reported that the MG—H₂O₂ system yields methyl radical and an unidentified carbon-centered radical that supposedly spark the chemiluminescence observed by the authors upon addition of luminol to the reaction mixture. Furthermore, our work may explain the mechanism underlying the formation of acetaldehyde and formate from D-lactate, an end product of the MG bypass, hyperproduced in rats fed dimethylaminoazobenzene-rich diets (52).

Altogether, the data reported here support a mechanism of MG oxidation by peroxynitrite and molecular oxygen to acetate and formate via an acetyl radical intermediate, which is initiated by nucleophilic addition of peroxynitrite to C(1) of MG (Scheme 1). Also, the acetylation activity of the MG–peroxynitrite system, previously reported using diacetyl/peroxynitrite and

L-histidine and dGuo as targets (15), was tested here on L-lysine (Scheme 2). The assignment of the MNP spin adduct to acetyl radical (Figures 4AB) was confirmed by the isolation and identification of 6N -acetyl-L-lysine in the final reaction mixture by CE-MS. The hypothesis of post-translational acetylation of proteins by a radical mechanism, during normal or pathological events that lead to the accumulation of both MG and peroxynitrite, might be evoked as an additional pathway to acetyltransferase-catalyzed reactions. Further experiments are warranted to demonstrate this hypothesis. Epigenetic protein acetylations, especially in lysine residues of histones, have important consequences in cell signaling and regulation of the cell cycle (31).

Acknowledgment. This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) Redoxoma. We thank Luiz H. Catalani and Wilhelm Baader (University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil) and Brian Bandy (University of Saskatchewan, Saskatoon, SK) for a critical reading of the manuscript.

References

- (1) Kalapos, M. P. (1999) Methylglyoxal in living organisms: Chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. *Toxicol. Lett.* 110, 145–175.
- (2) Thornalley, P. J. (2005) Dicarbonyl Intermediates in the Maillard Reaction. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1043, 111–117.
- (3) Kalapos, M. P. (2008) The tandem of free radicals and methylglyoxal. *Chem.-Biol. Interact.* 171, 251–271.
- (4) Thornalley, P. J. (2008) Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems: Role in ageing and disease. *Drug Metab. Drug Interact.* 25, 125–150.
- (5) Royer, L. O., Knudsen, F. S., de Oliveira, M. A., Tavares, M. F. M., and Bechara, E. J. H. (2004) Succinylacetone oxidation by oxygen/tyrosynitrite: A possible source of reactive intermediates in hereditary tyrosinemia type I. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 598–604.
- (6) Dutra, F., Ciriolo, M. R., Calabrese, L., and Bechara, E. J. H. (2005) Aminoacetone induces oxidative modification to human plasma ceruloplasmin. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 755–760.
- (7) Deng, Y., Boomsma, F., and Yum, P. H. (1998) Deamination of methylamine and aminoacetone increases aldehydes and oxidative stress in rats. *Life Sci.* 63, 2049–2058.
- (8) House, J. D., Hall, B. N., and Brosnan, J. T. (2001) Threonine metabolism in isolated rat hepatocytes. *Am. J. Physiol.* 281, 1300–1307.
- (9) Thornalley, P. J. (1988) Modification of the glyoxalase system in human red blood cells by glucose *in vitro*. *Biochem. J.* 254, 751–755.
- (10) Nemet, I., Varga-Defterdarovic, L., and Turk, Z. (2006) Methylglyoxal in food and organisms. *Mol. Nutr. Food Res.* 50, 1105–1117.
- (11) Dhar, A., Desai, K., Liu, J., and Wu, L. (2009) Methylglyoxal, protein binding and biological samples: Are we getting the true measure? *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 877, 1093–1100.
- (12) Beisswenger, P. J., Howel, S. K., Touchette, A. D., Lal, S., and Szwergold, B. S. (1999) Metformin reduces systemic methylglyoxal levels in type 2 diabetes. *Diabetes* 48, 198–202.
- (13) Nemet, I., Vijić-Topić, D., and Varga-Defterdarović, L. (2004) Spectroscopic studies of methylglyoxal in water and dimethylsulfoxide. *Bioorg. Chem.* 32, 560–570.

- (14) Thornalley, P., Yurek-George, A., and Argirov, O. K. (2000) Kinetics and mechanism of the reaction of aminoguanidine with the α -oxoaldehydes glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone under physiological conditions. *Biochem. Pharmacol.* 60, 55–65.
- (15) Massari, J., Fujiy, D. E., Dutra, F., Vaz, S. M., Costa, A. C. O., Micke, G. A., Tavares, M. F. M., Tokikawa, R., Assunção, N. A., and Bechara, E. J. H. (2008) Radical acetylation of 2'-deoxyguanosine and L-histidine coupled to the reaction of diacetyl with peroxynitrite in aerated medium. *Chem. Res. Toxicol.* 21, 879–887.
- (16) Yang, D., Tang, T., Chen, J., Wang, X., Bartberger, M. D., Houk, K. N., and Olson, L. (1999) Ketone-catalyzed decomposition of peroxynitrite via dioxirane intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 11976–11983.
- (17) Uppu, R. M., Winston, G. W., and Pryor, W. A. (1997) Reactions of peroxynitrite with aldehydes as probes for reactive intermediates responsible for biological nitration. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 1331–1337.
- (18) Nakao, L. S., Ouchi, D., and Augusto, O. (1999) Oxidation of acetaldehyde by peroxynitrite hydrogen peroxide-iron(II). Production of acetate and methyl radicals. *Chem. Res. Toxicol.* 12, 1010–1018.
- (19) Augusto, O., Bonini, M. G., Amanso, A. M., Linares, E., Santos, C. C., and Menezes, S. L. (2002) Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: Two emerging radicals in biology. *Free Radical Biol. Med.* 32, 841–859.
- (20) Lobachev, V. L., and Rudakov, E. S. (2006) The chemistry of peroxynitrite: Reaction mechanisms and kinetics. *Russ. Chem. Rev.* 75, 375–396.
- (21) Medinas, D. B., Cerchiaro, G., Trindade, D. F., and Augusto, O. (2007) The carbonate radical and related oxidants derived from bicarbonate buffer. *IUBMB Life* 59, 255–262.
- (22) Ferrer-Sueta, G., and Radi, R. (2009) Chemical biology of peroxynitrite: Kinetics, diffusion, and radicals. *ACS Chem. Biol.* 4, 161–177.
- (23) Pacher, P., Beckman, J. S., and Liaudet, L. (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* 87, 315–424.
- (24) Szabó, C., Ischiropoulos, H., and Radi, R. (2007) Peroxynitrite: Biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discovery* 6, 662–680.
- (25) Radi, R. (2004) Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 4003–4008.
- (26) Ferrer-Sueta, G., Vitturi, D., Batinic-Haberle, I., Fridovich, I., Goldstein, S., Czapski, G., and Radi, R. (2003) Reactions of manganese porphyrins with peroxynitrite and carbonate radical anion. *J. Biol. Chem.* 278, 27432–27438.
- (27) Goldstein, S., and Merényi, G. (2008) The chemistry of peroxynitrite: Implications for biological activity. *Methods Enzymol.* 436, 49–61.
- (28) Rebrin, I., Bregere, C., Gallaher, T. K., and Sohal, R. S. (2008) Detection and characterization of peroxynitrite-induced modifications of tyrosine, tryptophan, and methionine residues by tandem mass spectrometry. *Methods Enzymol.* 441, 283–294.
- (29) Ahmed, N., Babaei-Jadidi, R., Howell, S. K., Beisswenger, P. J., and Thornalley, P. J. (2005) Degradation products of proteins damaged by glycation, oxidation and nitration in clinical type 1 diabetes. *Diabetologia* 48, 1590–1603.
- (30) Ahmed, N., Dobler, D., Dean, M., and Thornalley, P. J. (2005) Peptide mapping identifies hotspot site of modification in human serum albumin by methylglyoxal involved in ligand binding and esterase activity. *J. Biol. Chem.* 280, 5724–5732.
- (31) Kouzarides, T. (2000) Acetylation: A regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J.* 19, 1176–1179.
- (32) Kaur, H., Leung, K. H. W., and Perkins, M. J. (1981) A water-soluble, nitroso-aromatic spin-trap. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 3, 142–143.
- (33) Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., and Freeman, B. A. (1990) Apparent hydroxyl radical production of peroxynitrite. Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 1620–1624.
- (34) Beers, R. F., and Sizer, W. I. (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 195, 133–140.
- (35) Hughes, M. N., and Nicklin, H. G. (1968) Chemistry of pernitrites. I. Kinetics of decomposition of pernitrous acid. *J. Chem. Soc. A*, 450–452.
- (36) Gilbert, R. P., and Brandt, R. B. (1975) Spectrophotometric determination of methyl glyoxal with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Anal. Chem.* 47, 2418–2422.
- (37) Betterton, E. A., and Hoffman, M. R. (1987) Kinetics, mechanism, and thermodynamics of the reversible-reaction of methylglyoxal (CH₃COCHO) with S(IV). *J. Phys. Chem.* 91, 3011–3020.
- (38) Lyman, S. V., and Hurst, J. K. (1995) Rapid reaction between peroxynitrite ion and carbon dioxide: Implications for biological activity. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 8867–8868.
- (39) Uppu, R. M., Squadrito, G. L., and Pryor, W. A. (1996) Acceleration of peroxynitrite oxidations by carbon dioxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 327, 335–343.
- (40) Denicola, A., Freeman, B. A., Trujillo, M., and Radi, R. (1996) Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: Kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations. *Arch. Biochem. Biophys.* 333, 49–58.
- (41) Gupta, D., Harish, B., Kissner, R., and Koppenol, W. H. (2009) Peroxynitrate is formed rapidly during decomposition of peroxynitrite at neutral pH. *Dalton Trans.*, 5730–5736.
- (42) Miyamoto, S., Ronsein, G. E., Corrêa, T. C., Martinez, G. R., Medeiros, M. H. G., and Di Mascio, P. (2009) Direct evidence of singlet molecular oxygen generation from peroxynitrate, a decomposition product of peroxynitrite. *Dalton Trans.*, 5720–5729.
- (43) Gunther, M. R., Peters, J. A., and Sivaneri, M. K. (2002) Histidiny radical formation in the self-peroxidation reaction of bovine copper-zinc superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 277, 9160–9166.
- (44) Makino, K., Suzuki, N., Moriya, F., Rokushika, S., and Hatano, H. (1981) A fundamental study on aqueous-solutions of 2-methyl-2-nitrosopropane as a spin trap. *Radiat. Res.* 86, 294–310.
- (45) Nakayama, M., Saito, K., Sato, E., Nakayama, K., Terawaki, H., Ito, S., and Kohno, M. (2007) Radical generation by the non-enzymatic reaction of methylglyoxal and hydrogen peroxide. *Redox Rep.* 12, 125–133.
- (46) Gatti, R. M., Alvarez, B., Vasquez-Vivar, J., Radi, R., and Augusto, O. (1998) Formation of spin trap adducts during the decomposition of peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* 349, 36–46.
- (47) Royer, L. O., Knudsen, F. S., de Oliveira, M. A., Tavares, M. F. M., and Bechara, E. J. H. (2004) Peroxynitrite-initiated oxidation of acetoacetate and 2-methylacetoacetate esters by oxygen: Potential sources of reactive intermediates in keto acidoses. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 1725–1732.
- (48) Guo, R., Davies, C. A., Nielsen, B. R., Hamilton, L., Symons, M. C. R., and Winyard, P. G. (2002) Reaction of the spin trap 3,5-dibromo-4-nitrosobenzene sulfonate with human biofluids. *Biochim. Biophys. Acta* 1572, 133–142.
- (49) Trelle, M. B., and Jensen, O. N. (2008) Utility of immonium ions for assignment of ϵ -N-acetylysine-containing peptides by tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 80, 3422–3430.
- (50) Vásquez-Vivar, J., Denicola, A., Radi, R., and Augusto, O. (1997) Peroxynitrite-mediated decarboxylation of pyruvate to both carbon dioxide and carbon dioxide radical anion. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 786–794.
- (51) Miyamoto, S., Ronsein, G. E., Prado, F. M., Uemi, M., Corrêa, T. C., Toma, I. N., Bertolucci, A., Oliveira, M. C., Motta, F. D., Medeiros, M. H. G., and Di Mascio, P. (2007) Biological hydroperoxides and singlet molecular oxygen generation. *IUBMB Life* 59, 322–331.
- (52) Kitamura, Y., Kawase, M., and Ohmori, S. (2008) Formate excretion in urine of rats fed dimethylaminoazobenzene-rich diets: The possibility of formate formation from D-lactate. *Acta Med. Okayama* 62, 193–203.

TX1002244

ANEXO C

Co-autoria no Artigo:

Article

pubs.acs.org/JACS

Generation of Singlet Oxygen by the Glyoxal–Peroxynitrite System^{||}

Júlio Massari,[†] Rita Tokikawa,[‡] Danilo B. Medinas,[‡] José P. F. Angeli,[‡] Paolo Di Mascio,[‡]
Nilson A. Assunção,[§] and Etelvino J. H. Bechara^{*,‡,§}

[†]Departamento de Química Fundamental and [‡]Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

[§]Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, SP, Brazil

Generation of Singlet Oxygen by the Glyoxal–Peroxynitrite System¹¹

Júlio Massari,[†] Rita Tokikawa,[‡] Danilo B. Medinas,[‡] José P. F. Angeli,[‡] Paolo Di Mascio,[‡]
Nilson A. Assunção,[§] and Etelvino J. H. Bechara^{*,†,§}

[†]Departamento de Química Fundamental and [‡]Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

[§]Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, SP, Brazil

ABSTRACT: Diacetyl, methylglyoxal, and glyoxal are α -dicarbonyl catabolites prone to nucleophilic additions of amino groups of proteins and nucleobases, thereby triggering adverse biological responses. Because of their electrophilicity, in aqueous medium, they exist in a phosphate-catalyzed dynamic equilibrium with their hydrate forms. Diacetyl and methylglyoxal can be attacked by peroxynitrite ($k_2 \approx 1.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and $k_2 \approx 1.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectively), a potent biological nucleophile and oxidant, yielding the acetyl radical from the homolysis of peroxynitrosocarbonyl adducts, and acetate or formate ions, respectively. We report here that glyoxal is at least 1 order of magnitude greater than does methylglyoxal. A formyl radical was detected by direct flow experiments. In the ESR spectrum displays the di-*tert*-butyl nitroxide signal, another signal ($a_N = a_H = 1.44 \text{ mT}$), probably formed from formyl radical dimer radical adduct of the spin trap ($a_N = 0.71 \text{ mT}$ and $a_H = 0.14 \text{ mT}$). The monomer light emission at 1270 nm during the reaction, probably a Russell reaction of nascent formylperoxyl radicals. According to the peroxynitrite concentration in D_2O buffer and is suppressed. Unequivocal evidence of O_2 ($^1\Delta_g$) generation was also obtained using divinylsulfonate, using HPLC/MS/MS for detection of the corresponding products. The molecular events underlying nitrosative, oxidative, and other malady.

also reacts with peroxynitrite, yielding formate ion at rates at least 10⁴ times faster than the reaction of peroxynitrite with the free radical adduct of the spin trap 2-methyl-2-nitrosopropane, the EPR signal assignable to the spin trapping adduct with hydrogen radical (1:2:1; $a_{\text{H}} = 0.78$ mT) attributable to hydrated nitrite. In the presence of the spin trap 2-methyl-2-nitrosopropane, the EPR signal assignable to the spin trapping adduct with hydrogen radical (1:2:1; $a_{\text{H}} = 0.78$ mT) is significantly reduced, and a third EPR signal assignable to the formyl radical (1:1:1; $a_{\text{H}} = 0.78$ mT) is observed. The novelty here is the detection of singlet oxygen ($^1\Delta_{\text{g}}$) formed by subsequent dioxygen addition to formyl radical and singlet oxygen, the near-infrared emission increases upon raising the concentration of peroxynitrite. Upon addition of O₂ ($^1\Delta_{\text{g}}$) quenchers (NaN₃, L-His, H₂O), the singlet oxygen is quenched. Singlet oxygen is also quenched by chemical trapping of $^{18}\text{O}_2$ ($^1\Delta_{\text{g}}$) with anthracene-9,10-diol to form a 9,10-endoperoxide derivative. Our studies add insights into the role of peroxynitrite in carbonyl stress in inflammatory processes and aging-associated oxidative stress.

Here, we report that nucleophilic addition of peroxyxynitrite to glyoxal in normally aerated phosphate buffer produces molecular oxygen in the singlet excited state ($^1\Delta_g$). Generation of singlet oxygen, O_2 ($^1\Delta_g$), was assessed through the direct spectroscopic detection of its monomol light emission at 1270 nm, as well as by the observation of D_2O enhancement of O_2 ($^1\Delta_g$) production and the quenching effect of sodium azide. In addition, the reaction mechanism was investigated by chemically trapping the O_2 ($^1\Delta_g$) produced in the reaction using the anthracene-9,10-divinylsulfonate anion (AVS). The chemical trapping method was coupled to the detection of the corresponding endoperoxide AVSO₂ by HPLC coupled to UV and mass spectrometry in tandem. In light of previous work by Uppu et al.¹⁷ and Nakao et al.¹⁸ on the reaction of

■ INTRODUCTION

Ethanedial (glyoxal) is a highly reactive dialdehyde present in food,^{1,2} beverages,^{3–5} cigarette smoke,⁶ and urban air.^{7–9} In biological samples, glyoxal has been found as an end product of the aerobic oxidation of carbohydrates, proteins, polyunsaturated fatty acids, and nucleic acids.^{10–13} Like other α -dicarbonyl metabolites (e.g., methylglyoxal, 2,3-butanedione, 4,5-dioxopentanoic acid, and deoxygluxosones), glyoxal is reportedly implicated in Maillard reactions which may lead to a metabolic condition usually named “carbonyl stress”.¹³

Methylglyoxal¹⁴ and butanedione (diacetyl)¹⁵ were recently shown to undergo nucleophilic attack by peroxynitrite at much faster rates ($k_2 \approx 1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and $k_2 \approx 1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectively, at pH 7.2, 25 °C)^{14–16} than do monocarbonyls ($<10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),^{17,18} ultimately yielding formate and acetate, or acetate ions, respectively. Importantly, the rate constant of the reaction of peroxynitrite with methylglyoxal is roughly 3-fold greater than with $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$,¹⁹ which is noted as the main intracellular target of peroxynitrite in cells. In addition to acting as a powerful nucleophile, peroxynitrite is able to directly and indirectly promote one- and two-electron oxidations, nitrosation, and nitration of biomolecules. A broad set of

Received: June 3, 2011

Published: November 18, 2011

peroxynitrite with carbonyls, the glyoxal reaction is envisaged as initial peroxynitrite addition to yield a hypothetical nitro-soperoxy adduct, whose homolysis yields $\bullet\text{NO}_2$ and a glyoxal-derived oxyl radical.

Subsequently, β -cleavage of the oxyl radical would generate formyl radical and formate ion, followed by reaction of formyl radical with molecular oxygen to yield a formylperoxyl radical.

Annihilation of alkylperoxyl radicals by the Russell reaction is long known to generate 3–14% $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ and, at 3–4 orders of magnitude lower yield, triplet carbonyls.²⁸ Bearing a geminal hydrogen atom, the formylperoxyl radical is endowed with the potential of producing $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ by the Russell reaction.^{29–33}

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Reagents. All reagents were purchased, with a high grade of purity, from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Merck (Darmstadt, Germany), and Fluka (Buchs, Switzerland). The $^{18}\text{O}_2$ gas cylinder (99% ^{18}O) was from Isotec-Sigma (St. Louis, MO). Peroxynitrite was synthesized from NaNO_2 (0.60 M) and H_2O_2 (0.70 M) in HCl (0.60 M) and NaOH (1.50 M) in a quench-flow reactor as described previously.^{14,34} Excess H_2O_2 in the alkali peroxynitrite solution was eliminated with MnO_2 ; however, nitrite and nitrate ions derived from peroxynitrite decomposition usually remain as contaminant ions. Concentrations of H_2O_2 and peroxynitrite were determined spectrophotometrically at 240 ($\epsilon = 42 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)³⁵ and 302 nm ($\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$),^{34,36} respectively. The peroxynitrite concentrations obtained by this method ranged from 300 to 450 mM. Stock solutions of peroxynitrite were kept on ice in the dark. Sodium anthracene-9,10-divinylsulfonate, a $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ chemical trap, was prepared and purified according to procedures described elsewhere.^{37,38} All the solutions were prepared in Millipore Milli-Q purified water, and the buffers were pretreated with Chelex-100 to remove metal contaminants.

Stopped-Flow Kinetics. The rate of peroxynitrite decay was monitored with a stopped-flow spectrophotometer (Applied Photo-physics model SX-18V) at 302 nm. The temperature was kept constant at $25.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$, and the pH values of the reaction mixtures were determined by an experiment in Eppendorf tubes under the same conditions. The initial concentration of peroxynitrite was at 200 μM . Pseudo-first-order rates, k_{obs} (s^{-1}), were determined by linear fit from $\ln A$ vs time (0–30 ms), and the first linear fit observed was assumed as the k_{obs} (s^{-1}). The results of 9–12 measurements were averaged to obtain each rate constant. The apparent second-order rate constant ($k_{2,\text{app}}$) was calculated from slopes of the plots of k_{obs} vs the glyoxal concentration. The rate of peroxynitrite decay in the buffer solution, k_0 , was subtracted from k_{obs} before plotting data against pH or phosphate buffer concentration. All the data were fitted using Origin 7 (Microcal Software, Inc.).

Continuous-Flow EPR Studies. The experiments were conducted at room temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) in a Bruker EMX spectrometer equipped with a Bruker ER 4117 D-MTV dielectric mixing resonator with 9 mm of distance between the mixing cell and the resonator center. Briefly, the reactants were loaded in 20 mL

plastic syringes mounted on a pump (Harvard Apparatus pump 22) and driven into the resonator at constant flow. Experimental conditions and equipment settings are described in the captions to the figures. The magnetic field was calibrated with the nitroxide 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-*N*-oxyl (TEMPOL), whose g value is 2.0056. Computer simulations of spectra were performed by using the program WINSIM written by Duling.³⁹

Singlet Oxygen Detection. Monomolecular photoemission of $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ at 1270 nm was monitored by a photocounting equipment as described previously.^{40,41} For this purpose, reaction mixtures of glyoxal (0–10 mM) and peroxynitrite (2.5 mM) were analyzed in the photon counter. The reaction was carried out in D_3PO_4 solution in D_2O , resulting in a pD between 7.1 and 7.5 by the addition of the alkali solution of peroxynitrite at 25°C in the dark. All reactions were conducted in a quartz cuvette under continuous stirring at room temperature. The apparatus consists of a photomultiplier tube cooled to -80°C with liquid nitrogen to reduce the dark current. The power was provided by a high voltage DC power supply, and the applied potential was set to -1.5 kV . The light emitted from the sample was processed with a diffraction grate capable of selecting wavelengths in the infrared region. The phototube output was connected to the computer and the signal acquired digitally.

Chemical Trapping of Singlet Oxygen. The generation of $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ during the reaction of glyoxal and peroxynitrite was monitored by chemical trapping with AVS. For this purpose, glyoxal (0–10 mM) and peroxynitrite (2.5 mM) in the presence of 2.5 mM AVS were analyzed by HPLC (Shimadzu, Tokyo, Japan) coupled to a UV detector ($\lambda = 215 \text{ nm}$). An amount of 25 μL of the spent reaction of 5.0 mM glyoxal with 2.5 mM peroxynitrite in the presence of 2.5 mM AVS was injected into the HPLC equipment supplied with a Phenomenex Gemini C-18 column (250 mm $\times$ 4.6 mm i.d., particle size 5 μm). A gradient of methanol/acetonitrile (7:3, v:v) (solvent B) and 25 mM ammonium formate (solvent A) was used at a flow rate of 0.80 mL/min. The compounds were eluted by maintaining solvent B at 18% for 30 min and increasing solvent B from 18% to 65% over 5 min.

Identification of the AVS 9,10-endoperoxide generated by glyoxal/peroxynitrite was carried out in an HPLC system (Shimadzu, Tokyo, Japan) coupled to a Quattro II mass spectrometer (Micromass, Altricham, U.K.). An amount of 20 μL of the spent reaction of 5.0 mM glyoxal with 2.5 mM peroxynitrite in the presence of 8.0 mM AVS was injected into the HPLC equipment supplied with a Phenomenex Luna C-18 column (250 mm $\times$ 4.6 mm i.d., particle size 5 μm). A gradient of methanol/acetonitrile (7:3, v:v) (solvent B) and 25 mM ammonium formate (solvent A) was used at a flow rate of 0.80 mL/min. The compounds were eluted by maintaining solvent B at 18% for 30 min, increasing solvent B from 18 to 80% over 10 min, and keeping solvent B at 80% for a further 5 min. Subsequently, solvent B was returned to the initial condition of 18% over 2 min and was kept at this concentration for 10 min. The negative multiple reactions monitoring (MRM) mode was used to monitor the specific mass transition of AVS $^{16}\text{O}_2$ (m/z 210–194) and AVS $^{18}\text{O}_2$ (m/z 212–194). The capillary voltage was set at 3.5 kV, collision energy at 10 eV, and the sample cone voltage and extractor cone voltage were at 10 and 4 V, respectively. The source and desolvation temperatures were maintained at 100 and 200°C , respectively. The HPLC separation column and experimental conditions were the same as described above. The flow directed to the mass spectrometer was set at 0.20 mL/min.

Dioxygen labeling of AVS by $^{18}\text{O}_2$ was carried out by removing dissolved $^{16}\text{O}_2$ by successively freezing and thawing a solution of 8.0 mM AVS and 10.0 mM glyoxal in 1.0 mM $\text{D}_3\text{PO}_4/\text{D}_2\text{O}$ under vacuum. This procedure was repeated at least three times to ensure complete removal of $^{16}\text{O}_2$. Thereafter, the whole system was connected to an $^{18}\text{O}_2$ gas cylinder at 0.5 atm and stirred for 5 min, followed by injection through a rubber seal of 100 μL of ice cold 45 mM peroxynitrite in D_2O prepared from the stock solution of peroxynitrite. Negative controls were run by replacing $^{18}\text{O}_2$ with pure $^{16}\text{O}_2$ or N_2 .

Product Analysis by CE/UV. Analyses of formate were conducted in a Beckman P/551 capillary electrophoresis apparatus

equipped with a filter-carousel UV detector set at 254 nm for indirect detection. The background electrolyte was 10 mM 3,5-dinitrobenzoic acid, with 0.10 mM cetyltrimethylammonium bromide and final pH equal to 3.2. Fused-silica capillaries with dimensions of 50 cm total length (40 cm effective) and 75 μm i.d. $\times$ 375 μm o.d. were used. Separation was performed at a constant voltage (−20 kV). Reaction mixture samples obtained from 1.0 to 10 mM glyoxal treated with 1.0–5.0 mM peroxyxynitrite were injected hydrodynamically at 1 psi for 3 s.

RESULTS AND DISCUSSION

Peroxyxynitrite Decay. Figure 1A shows time courses of peroxyxynitrite (200 μM) consumption by glyoxal (0–30 mM) monitored at 302 nm. The pseudo-first-order rate constants (k_{obs}) were found to increase linearly with the initial concentration of glyoxal, revealing an apparent second order rate constant ($k_{2,\text{app}}$) equal to $3.8 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Figure 1B). Because glyoxal dehydration in aqueous solution (pH 4–7) is a much slower process (about $10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)⁴² than the peroxyxynitrite carbonyl reaction and assuming that the glyoxal reactive carbonyl form is 0.005% of the nominal glyoxal concentration,⁴³ the k_2 value for the reaction can be estimated as $7.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. This value is 3 orders of magnitude higher than that observed for the reaction with monocarbonyls, 2 orders of magnitude higher than that with diacetyl, and 1 order of magnitude higher than those reported with methylglyoxal and $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ at pH 7.2–7.4 and 25–37 °C ($(3\text{--}6) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).^{19,44,45} The glyoxal/peroxyxynitrite reaction is catalyzed by phosphate (Figure 1C), and the pH profile (Figure 1D) exhibits an ascendant curve from 6.2 to 7.2 with a trend for saturation above 7.2. This shape may reflect contributing effects of the pK_a values near 7.2 of both H_2PO_4^- and peroxyxynitrous acid²¹ at the phosphate ionic strength. Above 7.2, increasing concentration of peroxyxynitrite favors the reaction, while concomitant decrease of H_2PO_4^- addition catalyst is counterbalanced by increased amounts of HPO_4^{2-} , which is expected to catalyze dehydration of glyoxal· H_2O to the carbonyl reactive form as reported by Thornalley et al.⁴³ for methylglyoxal.

Directed Flow EPR Studies. Classical spin-trapping studies with 2-methyl-2-nitrosopropane (MNP) aiming to intercept the MNP-formyl radical adduct failed, either because of a high instability of the radical itself or because of the radical adduct. Using continuous-flow EPR with direct detection, the peroxyxynitrite/glyoxal reaction was found to produce a triplet signal (1:2:1; $a_{\text{H}} = 0.78 \text{ mT}$) in a glyoxal and peroxyxynitrite concentration-dependent fashion (parts A and B of Figure 2). The simulated spectrum is shown in Figure 2C. On replacement of glyoxal with formaldehyde, methanol, or ethanol under the same experimental conditions and equipment parameters, no signal was observed. This excludes possible interference of a carbon-centered radical bearing a hydrogen atom eventually formed from glyoxal products or contaminants. It is tempting to assign the 0.78 mT signal to the hydrated formyl radical, $\cdot\text{CH}(\text{OH})_2$ (half-life in aqueous medium of $\sim 20 \mu\text{s}$ (reference), formed from β -cleavage of the oxyl radical, $\text{CH}(\text{OH})_2\text{--CH}(\text{OH})\text{--O}\cdot$, which results from homolysis of the hypothetical peroxyxynitroso adduct of glyoxal, $\text{CH}(\text{OH})_2\text{--CH}(\text{OH})\text{--OONO}$. Because the putative $\cdot\text{CH}(\text{OH})_2$ radical is probably a poorer electrophile than the formyl radical toward MNP, accumulation of the $\text{MNP--}\cdot\text{CH}(\text{OH})_2$ adduct in the reaction mixture did not suffice to allow its EPR detection.

Interestingly, continuous-flow EPR experiments performed with peroxyxynitrite (200 μM)/glyoxal (30 mM) in the presence

Figure 1. Stopped-flow kinetics of peroxyxynitrite decay in the presence of glyoxal. (A) Kinetic traces of peroxyxynitrite (200 μM) decay at different glyoxal concentrations (2.0–30 mM) in air equilibrated 250 mM phosphate buffer, pH 7.2, at 25 °C. (B) Pseudo-first-order rate constants (k_{obs}) for the decay of peroxyxynitrite in the presence of glyoxal under the same experimental conditions. Each k_{obs} value represents the mean of at least nine experiments. (C) Catalytic effect of phosphate anion on the observed rate of peroxyxynitrite (200 μM) treated with glyoxal (15 mM) at pH 7.2 and 25 °C. The ionic strength of the phosphate buffer was kept constant via the addition of NaCl. (D) pH profile of the reaction of glyoxal (15 mM) with peroxyxynitrite (200 μM) in air-equilibrated 350 mM phosphate buffer at 25 °C. The data represent the mean values of at least nine independent measurements.

of MNP (20 mM) display a 1:2:2:1 quartet signal with $a_{\text{N}} = a_{\text{H}} = 1.44 \text{ mT}$, attributable to the $\text{MNP--H}\cdot$ adduct^{46–48} (Figure 3A). The triplet signal with $a_{\text{N}} = 1.72 \text{ mT}$, also observed in the

Figure 2. Direct EPR detection studies of the glyoxal/peroxynitrite system in 400 mM phosphate buffer, pH 7.2, at room temperature and a constant flow of 20 mL/min. (A) Spectra obtained from peroxynitrite (20 mM) without (a) and with (b) 220 mM, (c) 400 mM, (d) 500 mM, (e) 1.00 M glyoxal. (B) Spectra of glyoxal (1.0 M) without (a) and with (b) 5.0 mM, (c) 10 mM, (d) 20 mM, (e) 45 mM peroxynitrite. (C) Simulated spectrum obtained with a triplet signal 1:2:1 $a_{(0.5)} = 0.78$ mT. Experimental conditions were as follows: observation time, 3.5 ms; microwave power, 10.13 mW; modulation amplitude, 0.1 mT; time constant, 163.84 ms; conversion time, 40.96 ms; gain, 1×10^6 ; two spectra accumulation.

control runs (200 μ M peroxynitrite or 30 mM glyoxal in the spin trapping medium buffer), is due to the di-*tert*-butyl nitroxide signal (MNP contaminant)^{49,50} (Figure 3A). Decarbonylation of the unstable formyl radical⁵¹ is indeed expected to release a hydrogen atom that can reduce MNP. Accordingly, photolysis and one-electron oxidation of formaldehyde by oxidants in the gas phase, including HO $\cdot$ radical, are long known to form CO and H $_2$ probably via a formyl radical intermediate.⁵² In aerated aqueous solutions, oxidation of formaldehyde by H $_2$ O $_2$ -generated HO $\cdot$ radical during laser photolysis experiments was found to yield formic acid and CO, which also implies the intermediacy of $\cdot$ CH(OH) $_2$ radical.⁵³ Furthermore, glyoxal photoexcited at 395–414 nm in the gas phase has recently been reported as a chemical source of formyl radical, which decomposes to CO and H $_2$.⁵⁴ In the current experiments, replacement of glyoxal with formaldehyde (30 mM) produced the same MNP spin adduct that was formed with glyoxal (quartet, $a_N = a_H = 1.44$ mT) (Figure 3A), supporting the hypothesis of MNP reduction by hydrogen atom.

The bottom spectrum in Figure 3A is the simulation of the mixture of radicals from glyoxal/peroxynitrite reaction and MNP contaminants. However, a reaction mixture containing 750 μ M peroxynitrite and 30 mM glyoxal in the presence of 20

Figure 3. EPR continuous flow studies of the glyoxal/peroxynitrite system in the presence of MNP. An amount of 20 mM MNP was mixed with the glyoxal–peroxynitrite system in 200 mM phosphate buffer, pH 7.2, at room temperature and a constant flow of 1.4 mL/min. (A) Spectra obtained from (a) peroxynitrite (200 μ M) plus glyoxal (30 mM), (b) peroxynitrite alone (200 μ M), (c) glyoxal alone (30 mM), (d) peroxynitrite (200 μ M) plus formaldehyde (30 mM), and (e) simulation composed from the signals $a_N = 1.72$ mT and $a_N = a_H = 1.44$ mT. (B) (a) EPR spectrum obtained from 750 μ M peroxynitrite and 30 mM glyoxal, (b) simulated spectrum for the signals $a_N = 1.72$ mT, $a_N = a_H = 1.44$ mT and $a_N = 0.71$ mT and $a_H = 0.14$ mT. Experimental conditions for part A, traces a–d: observation time, 500 ms; microwave power, 10.11 mW; modulation amplitude, 0.1 mT; time constant, 163.84 ms; conversion time, 40.96 ms; gain, 1×10^6 ; accumulations, 8. Experimental conditions for part B, trace a: observation time, 500 ms; microwave power, 20.21 mW; modulation amplitude, 0.05 mT; time constant, 81.92 ms; conversion time, 40.96 ms; gain, 2×10^6 ; accumulations, 4.

mM MNP (Figure 3B, trace a) exhibits an additional signal, which is attributable to the MNP–formyl radical adduct ($a_N = 0.71$ mT; $a_H = 0.14$ mT; lit. data $a_N = 0.69$ – 0.77 mT and $a_H = 0.14$ – 0.25 mT).^{46,55,56} The bottom trace in Figure 3B depicts the simulated spectrum obtained from the signals attributable to MNP contaminant ($a_N = 1.72$ mT), the MNP–H $\cdot$ radical adduct ($a_N = a_H = 1.44$ mT), and the MNP–formyl radical adduct ($a_N = 0.69$ – 0.77 mT; $a_H = 0.14$ – 0.25 mT).

Monomolecular Photoemission of Singlet Oxygen at 1270 nm. The well-known monomol emission of O $_2$ ($^1\Delta_g$) at 1270 nm⁵⁷ was observed from the peroxynitrite/glyoxal reaction conducted in normally aerated phosphate buffer in D $_2$ O. The chemiluminescence intensity increases upon raising the concentration of peroxynitrite (Figure 4A) and of glyoxal to 25 mM (Figure 4B). Upon addition of singlet oxygen quenchers such as L-histidine and NaN $_3$ or by replacement of D $_2$ O with H $_2$ O-buffered solution,^{58,59} the red emission intensity was not observed (Figure 4C). That a putative formylperoxyl radical intermediate is the source of O $_2$ ($^1\Delta_g$) is endorsed by the lack of enhanced infrared emission when

Figure 4. Monomol emission of singlet ($^1\Delta_g$) molecular oxygen observed from the glyoxal–peroxynitrite system. Normally aerated 250 mM phosphate buffer prepared in D_2O , pD 7.2, contained (A) 1.0 mM peroxynitrite without (a) and with 5.0 mM glyoxal (b), 2.5 mM peroxynitrite without (c) and with 5.0 mM glyoxal (d), 5.0 mM peroxynitrite without (e) and with 5.0 mM glyoxal (f). (B) Peroxynitrite without (a) and with 5.0 mM (b) or 25 mM (c) glyoxal. (C) 2.5 mM peroxynitrite and 5.0 mM glyoxal without (a) and in the presence of H_2O , pH 7.2 (b), 2.5 mM L-histidine (c), and 2.5 mM NaN_3 (d).

glyoxal is replaced by diacetyl or methylglyoxal under identical experimental conditions (not shown). Upon reaction with peroxynitrite these reagents yield acetyl radicals that do not display a geminal hydrogen necessary to ultimately undergo the Russell reaction.

Chemical Trapping of Singlet Oxygen and HPLC/UV and HPLC/MS Analysis. Another specific and sensitive approach commonly used to detect O_2 ($^1\Delta_g$) is chemical trapping coupled to HPLC/MS/MS. In this experiment, we used AVS, a chemical trap that is known to react with O_2 ($^1\Delta_g$), yielding the corresponding 9,10-endoperoxide (AVSO₂). The yield of AVSO₂, determined by HPLC/UV at 215 nm, was found to be dependent on glyoxal concentration (1.0–10 mM) (Figure 5A). Formation of O_2 ($^1\Delta_g$) in the reaction was also

Figure 5. Chemical trapping studies of singlet ($^1\Delta_g$) $^{16}O_2$ and $^{18}O_2$ with AVS. (A) HPLC/UV traces for chemical-trapping of O_2 ($^1\Delta_g$). Reaction mixture was 5.0 mM glyoxal, 2.5 mM peroxynitrite, and 2.5 mM AVS in normally aerated 500 mM D_2O buffer, pD 7.2. Inset: Concentration effect of glyoxal (1.0–10 mM) on the peak area attributed to the AVS reaction product with O_2 ($^1\Delta_g$). (B) HPLC/MS/MS evidence for the specific transition of AVS $^{16}O_2$ to AVS (m/z 210–194) in the MRM mode. Complete reaction mixture was 10.0 mM glyoxal, 2.0 mM peroxynitrite, and 8.0 mM AVS in 1.0 mM D_3PO_4/D_2O , final pD in the range 6.8–7.4. (a) glyoxal + AVS under $^{16}O_2$; (b) peroxynitrite + AVS under $^{16}O_2$; (c) peroxynitrite + glyoxal + AVS under $^{16}O_2$; (d) peroxynitrite + glyoxal + AVS under $^{18}O_2$; (e) peroxynitrite + glyoxal + AVS under N_2 . (C) Same as (B) by monitoring the specific transition of AVS $^{18}O_2$ to AVS (m/z 212–194) in the MRM mode.

evaluated by HPLC/MS/MS in the MRM mode, monitoring the specific conversion of AVSO₂ to AVS (m/z 210–194) (Figure 5B, trace c). The intense peak at 18 min was identified in the MRM chromatogram as AVSO₂, since it displays the same retention time and fragmentation pattern as an AVSO₂ standard generated by photooxidation (data not shown).³⁸ One can estimate that the reaction studied here generates ~2% of

molecular oxygen in the $^1\Delta_g$ state considering the nominal peroxynitrite concentration (from the observed consumption of AVS (8.0 mM), evaluated by the corresponding HPLC/UV peak area when in the presence of the glyoxal (10.0 mM)/peroxynitrite (2.0 mM) system) and considering that (i) one molecule of $O_2 (^1\Delta_g)$ requires two formylperoxyl radicals, (ii) the Russell reaction forms $\sim 10\%$ $O_2 (^1\Delta_g)$,²⁸ and (iii) the chemical yield of $O_2 (^1\Delta_g)$ trapping by AVS is about 50%. As expected from work published elsewhere,⁶⁰ peroxynitrite alone gives rise to $O_2 (^1\Delta_g)$ at lower yields, as shown in traces b and e of Figure 5B. That the oxygen atoms of AVSO₂ are not derived exclusively from peroxynitrite was confirmed by repeating the experiment under N₂ (Figure 5B, trace e) compared to normally aerated solution (Figure 5B, trace c).

Unequivocal evidence for glyoxal/peroxynitrite-generated $O_2 (^1\Delta_g)$ cycloaddition to AVS by a mechanism involving a Russell reaction of formylperoxyl radical intermediate was provided by oxygen labeling experiments with $^{18}O_2$. The MRM trace of the 212–194 transition depicted by Figure 5C, trace d, shows that in $^{18}O_2$ -purged solutions, treatment of glyoxal with peroxynitrite renders almost exclusively AVS $^{18}O_2$. Control experiments described in the caption to the figure show no AVS $^{18}O_2$ formation. Furthermore, generation of small amounts of AVS $^{16}O_2$ in the experiment performed with $^{18}O_2$ -purged solutions (Figure 5B, trace d) may be due to peroxynitrite⁶⁰ and/or a dioxirane intermediate¹⁶ acting as a minor source of $O_2 (^1\Delta_g)$.

Formate Analysis. Formate was the main product detected by CE-UV in the final reaction mixture from the glyoxal/peroxynitrite system (Figure 6). Consistent with the

known concentrations, and citrate was used as an internal standard. The insets in Figure 6 show the dependence of formate concentration in the final reaction mixture on reacting glyoxal (1.0–10 mM) and peroxynitrite (1.0–5.0 mM) under continuous vortex aeration. Using 1.5 mM peroxynitrite and 4.5 mM glyoxal (inset B), 2.0 mM formate was found from curve deflection. Assuming peroxynitrite reacts stoichiometrically with glyoxal and each glyoxal molecule can generate maximally two formate ions, the chemical yield of formate is roughly 66%.

The absence of glyoxalate and oxalate in the final reaction mixtures indicates that partial oxidation of glyoxal by peroxynitrite does not occur. These results attest that the reaction proceeds by an initial step of nucleophilic addition of peroxynitrite to glyoxal, followed by oxidative fragmentation to formate ion in the presence of molecular oxygen, as previously reported for other peroxynitrite-treated α -dicarbonyls.^{14,15}

Potential Biological Implications. Singlet oxygen is a strong electrophile known to react with various biomolecules, including nucleic acids, proteins, and lipids. It has been suggested to play beneficial and deleterious cellular roles including in cell signaling cascades associated with apoptosis and in genetically controlled death of plants. To date, singlet oxygen is reportedly formed in vivo (i) chemically, from ClO[−] anion and peroxides (e.g., H₂O₂, ONOO[−]) and from dismutation of ROO[•] radicals derived from polyunsaturated fatty acids, nucleobases, and amino acids, (ii) enzymatically from prostaglandin cyclooxygenase, hemoglobin or myoglobin/H₂O₂, and lactoperoxidase/H₂O₂, (iii) UVA radiation, or (iv) through photosensitization of molecular oxygen by endogenous (e.g., protoporphyrin IX) and xenobiotic dyes used in photodynamic therapy.^{57–64}

Although normally present at very low concentrations in tissues, glyoxal and peroxynitrite are accumulated in some human disorders and might spark adverse responses associated with the chemistry of singlet ($^1\Delta_g$) molecular oxygen. For example, glyoxal concentration is reportedly in the range 0.05–0.08 $\mu\text{g/mL}$ in serum⁶⁵ and $12.5 \pm 0.5 \mu\text{g/L}$ in plasma⁶⁶ of healthy individuals but reaches 0.19–0.33 $\mu\text{g/mL}$ in serum, $22.6 \pm 3 \mu\text{g/mL}$ in plasma,⁶⁶ and 0.18–0.40 $\mu\text{g/mL}$ in the urine of diabetes patients. On the other hand, very high fluxes ($>2 \mu\text{M/s}$) of NO[•]/O₂^{•−} were found to be required in vitro to yield peroxynitrite at concentrations able to ultimately accomplish tyrosine nitration and dimerization.⁶⁷ Nevertheless, the relevance of the glyoxal–peroxynitrite pair in biological systems must be considered in light of the complex spatiality and temporality of cellular events.⁶⁸ These are governed by cell compartmentalization, metabolism, and duration of toxicant exposure, in addition to concentration factors, intermediate lifetimes, and reaction rate constants. Thus, it is tempting to propose that the glyoxal–peroxynitrite reaction may take place chronically in tissue microenvironments under adverse oxidative, nitrosative, and carbonyl stress, as is the case of inflammation sites.

Noteworthy, on the basis of the short lifetime and lack of chemical selectivity of such highly oxidant species, a role of singlet ($^1\Delta_g$) molecular oxygen as well as of hydroxyl radical in cell signaling was recently questioned by Forman et al.⁶⁸ However, secondary products of singlet oxygen activity may influence cell signaling. For example, a cholesterol carboxaldehyde specifically formed from cholesterol oxidation by singlet oxygen or exogenous ozone,⁶⁹ and implicated in the pathophysiology of atherosclerosis and Alzheimer diseases, induces cytotoxicity in cardiomyocytes through an H₂O₂ and

Figure 6. CE-UV electropherogram obtained for the final reaction mixture of glyoxal (2.5 mM) treated with peroxynitrite (1.5 mM). Citrate (1 mM) was added as an internal standard. Inset: Dependence of formate ion yield on the concentrations of peroxynitrite and glyoxal. (A) Peroxynitrite (1.0–4.5 mM) in the presence of 5.0 mM glyoxal. (B) Peroxynitrite (3.0 mM) in the presence of glyoxal (1.0–10 mM).

hypothetical intermediacy of a nitrosoperoxy carbonyl adduct, whose homolysis yields $\cdot\text{NO}_2$,^{17,18} an increased nitrite/nitrate ratio is expected to be found in the spent reaction mixture.^{16,17} However, the concentration of these anions is normally high in peroxynitrite stock solutions, thereby offering low analytical accuracy and allowing detection of just a trend for relative increase of nitrite. The equipment was calibrated with a mixture of nitrite, nitrate, phosphate, glyoxalate, formate, and oxalate at

p38 mitogen activated protein kinase-mediated signaling process.⁷⁰

CONCLUSION

The reaction of glyoxal with peroxyntirite in aerated medium is envisaged here as being initiated by phosphate-catalyzed peroxyntirite addition to glyoxal to form a hypothetical nitrosoperoxy intermediate (Scheme 1). Subsequent homolysis

Scheme 1. Chemical Mechanism Proposed for the Generation of Singlet Oxygen from the Glyoxal–Peroxyntirite System in Aerated Phosphate Buffer, pH 7.2

of this intermediate yields $\cdot\text{NO}_2$ and a glyoxal-derived oxyl radical. β -Cleavage of the latter radical is expected to generate formate ion and formyl radical, followed by formyl radical annihilation by molecular oxygen to a formylperoxyl radical. By virtue of displaying a geminal hydrogen, the formylperoxyl radical is prone to dismutation (Russell reaction) yielding molecular oxygen in the singlet ($^1\Delta_g$) state, formic acid, and CO_2 . This mechanism is strongly supported by (i) the observed concentration-dependent phosphate-catalyzed peroxyntirite consumption by glyoxal (Figure 1), ultimately yielding formate as the only product (Figure 6), (ii) direct flow EPR experiments with glyoxal/peroxyntirite in the presence of MNP which reveal a radical adduct with hydrogen atom expectedly formed from formyl radical decarbonylation (Figures 2 and 3), and (iii) detection of the monomolecular emission of singlet oxygen ($^1\Delta_g$) at 1270 nm in buffered D_2O , which can be quenched by L-histidine and azide ion and trapped with AVS to form the corresponding 9,10-endoperoxide.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

ejhbechara@gmail.com

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr. B. Bandy (University of Saskatchewan, Canada) for kindly reading the manuscript and F. M. Prado for technical assistance. Funding sources for this work are the following: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) de Processos Redox em Biomedicina (Redoxoma).

DEDICATION

[†]Dedicated to Dr. Thérèse Wilson (Harvard University, MA).

REFERENCES

- (1) Gobert, J.; Glomb, M. A. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 8591.
- (2) Kuntz, S.; Rudloff, S.; Ehl, J.; Bretzel, R. G.; Kunz, C. *Eur. J. Nutr.* **2009**, *48*, 499.
- (3) Darowska, A.; Borcz, A.; Nawrocki, J. *Food Addit. Contam.* **2003**, *20*, 1170.
- (4) da Silva Ferreira, A. C.; Reis, S.; Rodrigues, C.; Oliveira, C.; de Pinho, P. G. *J. Food Sci.* **2007**, *72*, S314.
- (5) Neng, N. R.; Cordeiro, C. A.; Freire, A. P.; Nogueira, J. M. *J. Chromatogr., A* **2007**, *1169*, 47.
- (6) Fujioka, K.; Shibamoto, T. *Environ. Toxicol.* **2006**, *21*, 47.
- (7) Liu, W.; Zhang, J.; Know, J.; Weisel, C.; Turping, B.; Zhang, L.; Korn, L.; Morandi, M.; Stock, T.; Colome, S. *J. Air Waste Manage. Assoc.* **2006**, *56*, 1196.
- (8) Salter, R. J.; Blitz, M. A.; Heard, D. E.; Pilling, M. J.; Seakins, P. W. *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 8278.
- (9) Ho, S. S.; Yu, J. Z.; Chu, K. W.; Yeung, L. L. *J. Air Waste Manage. Assoc.* **2006**, *56*, 1091.
- (10) Grillo, M. A.; Colombatto, S. *Amino Acids* **2008**, *35*, 29.
- (11) Murata-Kamiya, N.; Kamiya, H.; Iwamoto, N.; Kasai, H. *Carcinogenesis* **1995**, *16*, 2251.
- (12) Awada, M.; Dedon, P. C. *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14*, 1247.
- (13) Thornalley, P. J. *Drug Metab. Drug Interact.* **2008**, *23*, 125.
- (14) Massari, J.; Tokikawa, R.; Zanolli, L.; Tavares, M. F. M.; Assunção, N. A.; Bechara, E. J. H. *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23*, 1762.
- (15) Massari, J.; Fujii, D. E.; Dutra, F.; Vaz, S. M.; Costa, A. C. O.; Micke, G. A.; Tavares, M. F. M.; Tokikawa, R.; Assunção, N. A.; Bechara, E. J. H. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 879.
- (16) Yang, D.; Tang, T.; Chen, J.; Wang, X.; Bartberger, M. D.; Houk, K. N.; Olson, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11976.
- (17) Uppu, R. M.; Winston, G. W.; Pryor, W. A. *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10*, 1331.
- (18) Nakao, L. S.; Ouchi, D.; Augusto, O. *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *12*, 1010.
- (19) Medinas, D. B.; Cerchiaro, G.; Trindade, D. F.; Augusto, O. *IUBMB Life* **2007**, *59*, 255.
- (20) Augusto, O.; Bonini, M. G.; Amanso, A. M.; Linares, E.; Santos, C. C.; Menezes, S. L. *Free Radical Biol. Med.* **2002**, *32*, 841.
- (21) Lobachev, V. L.; Rudakov, E. S. *Russ. Chem. Rev.* **2006**, *75*, 375.
- (22) Ferrer-Sueta, G.; Radi, R. *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 161.
- (23) Pacher, P.; Beckman, J. S.; Liaudet, L. *Physiol. Rev.* **2007**, *87*, 315.
- (24) Szabó, C.; Ischiropoulos, H.; Radi, R. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, *6*, 662.
- (25) Radi, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 4003.
- (26) Goldstein, S.; Merényi, G. *Methods Enzymol.* **2008**, *436*, 49.
- (27) Rebrin, I.; Bregere, C.; Gallaher, T. K.; Sohal, R. S. *Methods Enzymol.* **2008**, *441*, 283.
- (28) Niu, Q.; Mendenhall, G. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 165.
- (29) Russell, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 3871.
- (30) Russell, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 4583.
- (31) Russell, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 1047.
- (32) Howard, J. A.; Ingold, K. U. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 1056.
- (33) Kanofsky, J. R.; Axelrod, B. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 1099.
- (34) Beckman, J. S.; Beckman, T. W.; Chen, J.; Marshall, P. A.; Freeman, B. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, *87*, 1620.
- (35) Beers, R. F.; Sizer, W. I. *J. Biol. Chem.* **1952**, *195*, 133.
- (36) Hughes, M. N.; Nicklin, H. G. *J. Chem. Soc. A* **1968**, 450.
- (37) Nardello, V.; Aubry, J. I. M.; Johnston, P.; Bulduk, I.; de Vries, A. H. M.; Alsters, P. L. *Synlett* **2005**, 2667.
- (38) Prado, F. M.; Oliveira, M. C. B.; Miyamoto, S.; Martinez, G. R.; Medeiros, M. H. G.; Ronsein, G. E.; Di Mascio, P. *Free Radical Biol. Med.* **2009**, *47*, 401.
- (39) Duling, D. R. *J. Magn. Reson.* **1994**, *104*, 105.
- (40) Miyamoto, S.; Martinez, G. R.; Medeiros, M. H. G.; Di Mascio, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6172.
- (41) Miyamoto, S.; Martinez, G. R.; Martins, A. P. B.; Medeiros, M. H. G.; Di Mascio, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4510.
- (42) Betterton, E. A.; Hoffmann, M. R. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 3011.
- (43) Thornalley, P. J.; Yurek-George, A.; Argirov, O. K. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *60*, 55.
- (44) Denicola, A.; Freeman, B. A.; Trujillo, M.; Radi, R. *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, *333*, 49.

- (45) Lymar, S. V.; Hurst, J. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8867.
- (46) Buettner, G. R. *Free Radical Biol. Med.* **1987**, *3*, 259.
- (47) Kennedy, C. H.; Pryor, W. A.; Winston, G. W.; Church, D. F. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1986**, *141*, 1123.
- (48) Chignell, C. F.; Kalyanaraman, B.; Mason, R. P.; Sik, R. H. *Photochem. Photobiol.* **1980**, *32*, 563.
- (49) Gunther, M. R.; Peters, J. A.; Silvaneri, M. K. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 9160.
- (50) Makino, K.; Suzuki, N.; Moriya, F.; Rokushika, S.; Hatano, H. *Radiat. Res.* **1981**, *86*, 294.
- (51) Troe, J. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 3868.
- (52) Carbajo, P. G.; Smith, S. C.; Holloway, A.-L.; Smith, C. A.; Pope, F. D.; Shallcross, D. E.; Orr-Ewing, A. J. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 12437.
- (53) McElroy, W. J.; Waygood, S. J. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1991**, *87*, 1513.
- (54) Salter, R. J.; Blitz, M. A.; Heard, D. E.; Pilling, M. J.; Seakins, P. *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 8278.
- (55) Janzen, E. G.; Lopp, I. G.; Morgan, T. V. *J. Phys. Chem.* **1973**, *77*, 139.
- (56) Heinzel, A.; Holze, R.; Hamann, C. H.; Blum, J. K. *Electrochim. Acta* **1989**, *34*, 657.
- (57) Khan, A. U.; Kasha, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 3293.
- (58) Lengfelder, E.; Cadenas, E.; Sies, H. *FEBS Lett.* **1983**, *164*, 366.
- (59) Krinsky, N. I. *Trends Biochem. Sci.* **1977**, *2*, 35.
- (60) Miyamoto, S.; Ronsein, G. E.; Corrêa, T. C.; Martinez, G. R.; Medeiros, M. H. G.; Di Mascio, P. *Dalton Trans.* **2009**, 5720.
- (61) Miyamoto, S.; Ronsein, G. E.; Prado, F. M.; Uemi, M.; Corrêa, T. C.; Toma, I. N.; Bertolucci, A.; Oliveira, M. C. B.; Motta, F. D.; Medeiros, M. H. G.; Di Mascio, P. *IUBMB Life* **2007**, *59*, 322.
- (62) Schweitzer, C.; Schmidt, R. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1685.
- (63) Cadet, J.; Douki, T.; Ravanat, J.-L.; Di Mascio, P. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8*, 903.
- (64) Alarcón, E.; Henríquez, C.; Aspée, A.; Lissi, E. A. *Photochem. Photobiol.* **2007**, *83*, 475.
- (65) Zardari, L. A.; Khuhawar, A. J.; Laghari, A. J. *Chromatographia* **2009**, *70*, 891.
- (66) Lapolla, A.; Flamini, R.; Lupo, A.; Aricò, N. C.; Rugiu, C.; Reitano, R.; Tubaro, M.; Regazzi, E.; Seraglia, R.; Traldi, P. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2005**, *1043*, 217.
- (67) Pfeiffer, S.; Schmidt, K.; Mayer, B. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 6346.
- (68) Forman, H. J.; Maiorino, M.; Ursini, F. *Biochemistry* **2010**, *49*, 835.
- (69) Uemi, M.; Ronsein, G. E.; Miyamoto, S.; Medeiros, M. H. G.; Di Mascio, P. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22*, 875.
- (70) Laynes, L.; Raghavamenon, A. C.; D'Auvergne, O.; Achuthan, V.; Uppu, R. M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *404*, 90.

Súmula Curricular

Dados Pessoais

Nome: Rita Tokikawa

Local e Data de Nascimento: São Paulo, 16 de Novembro de 1981.

Formação

- Ensino Médio – Externato São José, Atibaia, SP (2007-2009).
- Graduação em Química – Universidade de São Paulo-Instituto de Química (2002-2005).
- Graduação em Química – Licenciatura - Universidade de São Paulo-Instituto de Química (2003-2009).
- Doutorado em Bioquímica Universidade de São Paulo-Instituto de Química (2006-até presente momento).

Experiência Acadêmica

- Iniciação Científica (2002-2003)

Orientador: Prof. Dr. Francisco R.M. Laurindo, Biologia Vascular, INCOR-USP.

Título do Projeto: Expressão da quiescina sulfidril oxidase (QSOX) durante o desenvolvimento embrionário.

- Iniciação Científica (2004-2005)

Orientador: Prof. Dr. Etelvino J.H. Bechara, Instituto de Química-Dpto Bioquímica-USP.

Título do Projeto: Atividade antioxidante de resveratrol em modelo de biomembranas.

Agencia financiadora: CNPq

- Doutorado em Bioquímica (2006-2012)

Orientador: Prof. Dr. Etelvino J.H. Bechara, Instituto de Química-Dpto Bioquímica-USP.

Título do Projeto: Acetilação Radicalar de Amino Ácidos, Peptídeos e Nucleobases pelos Sistemas Biacetilo/Peroxinitrito e Metilglioxal/Peroxinitrito.

Agencia financiadora: CAPES e FAPESP

Formação Complementar

2010 - Estágio Supervisionado no Departamento de Radiobiologia da Faculdade de Medicina de Sherbrooke/Universidade de Sherbrooke (Quebec, Canadá) - duração 5 meses. Orientação: Prof. Dr. Richard J. Wagner. Agencia financiadora: FAPESP

2010 - Monitoria – Disciplina: QBQ0211 - Bioquímica: Estrutura de Biomoléculas e Metabolismo para o Curso de Medicina. Responsável: Dra. Profa. Dra. Alícia J. Kowaltowski.

2007 - V Meeting of SFRBM – South American Group – Free Radical School (Montevideu, Uruguai).

2007 - Monitoria – Disciplina: QBQ 101 – Bioquímica e Biologia Molecular para o Curso de Enfermagem. Responsável: Profa. Dra. Bianca Silvana Zingales.

2007- II Curso de verão em bioquímica e biologia molecular do Instituto de Química da USP – duração de 80 horas. Responsável: Prof. Dr. Bayardo B. Torres.

Prêmios

2004 - Menção Honrosa, 12 SIICUSP-Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP.

Pôster: Atividade Antioxidante do Resveratrol em Modelos de Biomembranas.

Participação em congressos

2009 – LACE – 15th Latin American Symposium on Biotechnology Biomedical, Biopharmaceutical and Industrial Application of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology. (Sevilha, Espanha)

Pôster: Radical acetylation of amino acids by diacetyl/peroxynitrite studies by capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry.

Assunção, N.A., Massari, J., Tokikawa, R. e Bechara, E.J.H.

2009 - XXXVIII Annual Meeting of the Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society – SBBq (Águas de Lindóia – SP- Brasil).

Pôster: Methylglyoxal reactions with peroxynitrite coupled to lysine acetylation. Massari, J., Tokikawa, R., Assunção, N.A., Zanolli, L., Tavares, M.F.M. e Bechara, E.J.H.

2008 - XXXVII Annual Meeting of the Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society – SBBq (Águas de Lindóia – SP- Brasil).

Pôster: Is Diacetyl/Peroxynitrite System Able to Acetylate Macrophage's Proteins?

Tokikawa, R., Santos, C.C.X., Fernandes, D.C., Laurindo, F.R.M. e Bechara, E.J.H.

2007 - XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society – SBBq (Salvador – BA – Brasil).

Pôster: Analytical studies of radical acetylation of amino acids by biacetyl/peroxynitrite using CE-MS.

Tokikawa, R., Massari, J., Assunção, N.A. e Bechara, E.J.H.

2007 - V Meeting of the SFRBM - South American Group and International Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species. (Montevideu – Uruguai).

Pôster: Acetylation of L-amino acids by biacetyl/peroxynitrite.

Tokikawa, R., Massari, J., Assunção, N.A. e Bechara, E.J.H.

2007 - V Meeting of the SFRBM - South American Group and International Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species. (Montevideu – Uruguai).

Apresentação: Triplet carbonyls: a neglected family of reactive oxygen species.

Bechara, E.J.H., Assunção, N.A., Tokikawa, R., Massari, J. e Royer, L.O.

2006 - 14º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, Universidade de São Paulo (São Paulo – SP)

Apresentação de Pôster: Geração de radicais acetila pelo sistema biacetilo/peroxinitrito.

Massari, J., Fujiy, D.E., Tokikawa, R., Vaz, S.M., Micke, G.A., Oliveira, A.C.O. e Bechara, E.J.H.

2005 - 57ª Reunião Anual da SBPC, UECE – Universidade Estadual do Ceará (Fortaleza – CE)

Pôster - Atividade Antioxidante do Resveratrol em Modelos de Biomembranas.

Tokikawa, R., Knudsen, F.S. e Bechara, E.J.H.

2004 - 12º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, Universidade de São Paulo (São Paulo – SP)

Apresentação de Pôster: Atividade Antioxidante do Resveratrol em Modelos de Biomembranas.

Tokikawa, R., Knudsen, F.S. e Bechara, E.J.H.

Artigos Publicados em Periódicos

- Massari, J; Tokikawa, R., Medina, D.B., Angeli, J.P.F., Di Mascio, P., Assunção, N.A. e Bechara E.J.H. (2011) Generation of singlet oxygen by the glyoxal-peroxynitrite sistem. J. Am. Chem. Soc. vol. 133, p. 20761-20168.
- Massari, J; Tokikawa, R., Zanolli, L., Tavares, M.F.M., Assunção, N.A. e Bechara, E.J.H. (2010) Acetyl radical production by the methylglyoxal-peroxynitrite system: A possible route for L-lysine acetylation. Chem. Res. Toxicol. vol. 23, p. 1762-1770.
- Massari, J; Fujij, DE; Dutra, F; Vaz, SM; Costa, ACO; Micke, G; Tavares, M; Tokikawa, R; Assunção, NA; Bechara, EJH. (2008) Radical Acetylation of 2'Deoxyguanosine and L-Histidine Coupled to the Reaction of Diacetyl with Peroxynitrite in Aerated Médium. Chem. Res. Toxicol. vol. 21, p. 879-887.

Resumos Publicados em Anais de Congressos

- Bechara, E.J.H., Massari, J., Tokikawa, R., Assunção, N.A., Zanolli, L., Tavares, M.F.M. Methylglyoxal Reacts At High Rates With Peroxynitrite Yielding Acetyl Radical. In: 15th Annual Meeting of the Society-for-Free-Radical-Biology-and-Medicine, 2008, Indianapolis, IN. SFRBM's 15th Annual Meeting: Program and Abstracts. NEW YORK, NY 10010-1710 USA : Elsevier Inc., 2008. v. 45. p. S62-S62.
- Bechara, E.J.H., Assunção, N.A., Tokikawa, R., Massari, J., Royer, L.O. Triplet Carbonyls: a Neglected Family of Reactive Oxygen Species. In: V Meeting of SFRBM-South American Group and the V International Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species, 2007, Montevideo. Free Radicals in Montevideo 2007 - Book of Abstracts. Montevideo : Imprensa Geha s.r.l., 2007. p. 14-14.

- TOKIKAWA, R., Massari, J., Assunção, N.A., Bechara, E.J.H. . Acetylation of L-amino acids by biacetyl/peroxynitrite. In: V Meeting of SFRBM-South American Group and the V International Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species, 2007, Montevideo. Free Radicals in Montevideo - Book of Abstracts. Montevideo : Imprensa Gega s.r.l., 2007. p. 70-70.
- Bechara, E.J.H., Massari, J., Fujiy, D.E., Micke, G.A., Tokikawa, R., Assunção, N.A. Radical Acetylation of Amino Acids and 2 -Deoxyguanosine Coupled to the Reaction of Diacetyl with Peroxynitrite in Aerated Medium. In: 14th Annual Meeting for the Society for Free Radical Biology and Medicine., 2007. SFRBM's 13th Annual Meeting: Program and Abstracts, SFRBM's 13th Annual Meeting, 2007. v. 43. p. S13-S13.

Organização de Eventos

2010 – II - Encontro dos Alunos de Pós-Graduação do IQ-USP, 11,12 e 13 de Agosto de 2010, com a orientação Profa.Dra. Alícia J. Kowaltowski e Prof. Dr. Josef W. Baader.

2009 – I - Encontro dos Alunos de Pós-Graduação do IQ-USP, 13-14 de Agosto de 2009, com a orientação Prof. Dr. Maurício da Silva Baptista e Prof. Dr. Josef W. Baader.

2007 - II Curso de Verão de Bioquímica e Biologia Molecular no IQ-USP para alunos de graduação, com a orientação do Prof. Dr. Bayardo B.Torres.

Informação complementar

2008 - 2010 – Representante Discente no Conselho de Pós-Graduação do IQ-USP.

2007 - 2010 – Representante Discente no Conselho do Departamento de Bioquímica do IQ-USP.