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

RAPHAEL FERREIRA QUEIROZ

**Estudos *in vitro* e *in vivo* dos mecanismos
pelos quais nitróxidos cíclicos inibem lesões
oxidativas**

Versão original da Tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

18/09/2012

RAPHAEL FERREIRA QUEIROZ

**Estudos *in vitro* e *in vivo* dos mecanismos
pelos quais nitróxidos cíclicos inibem lesões
oxidativas**

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Ohara Augusto

São Paulo

2012

A minha mãe, Jane, e avó, Jilda, pelo amor
e incentivo incondicionais.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente quero agradecer a Deus pelos inúmeros milagres concedidos.

A minha mãe Jane pelo exemplo de honestidade e simplicidade, por todo o amor, respeito e apoio dedicado em todos os momentos da minha vida, pela confiança, compreensão e privação de seus sonhos em prol dos meus desde a Faculdade. Eu te amo.

Ao meu pai Roberto e irmãos Letícia e Gabriel por compreenderem minha ausência. Eu amo vocês.

A minha família pelo apoio e votos de sucesso. Em especial, aos meus afilhados lindos, Raphaela, Samuel e Cauã pela pureza que me fortalece apenas com um sorriso. Vovó e vovô, eu estou voltando finalmente e, como Doutor, não aquele que toda família desejava, mas já serve, não é?

A minha eterna amiga e tia Genoveva, que não mais está entre nós, mas que apoiou todos os meus passos e foi exemplo de perseverança, ensinando-me a valorizar cada minuto vivido.

À Tia Graça pelo apoio desde meu ingresso no Ensino Médio. Serei eternamente grato à senhora.

À Profª Ohara Augusto pela competência, disponibilidade e confiança nesses quatro anos. Obrigado por ter me ouvido naquela manhã de sábado em março de 2008, em Alfenas, e ter me aceito em seu grupo para desenvolver este projeto. Certamente, o Raphael de agora é um profissional mais maduro e capaz de transpor os desafios futuros.

Aos companheiros de república e agregados pela convivência agradável de anos: “cumpade” Thiago Belchior, “cumade” Nájela, Ric e Marcelo.

Aos amigos e colegas do laboratório pela convivência e colaboração: Sandra, Danilo, Edlaine, Janaína, Regina, Fernando, Asif, Verônica, Daniel, Luciana e Natália.

À Berê por todo suporte no laboratório, pelas inúmeras “discussões” filosóficas, sociais e científicas durante nossos cafés e, claro, pela amizade que se perdurará para sempre.

Às amigas que não estão mais no IQ, Ana Paula e Márcia Santos, pela amizade verdadeira. Podem contar comigo para sempre. Obrigado, também, por ouvir minhas lamentações diárias, as quais não foram poucas.

Ao amigo Dr. José Pedro Angeli pela amizade e pelas calorosas discussões científicas no intuito de mudar o mundo.

Ao amigo Florêncio Freitas pela amizade, disponibilidade, infinita paciência e auxílio em experimentos e na formatação da tese.

À Mariana Duarte pelas palavras confortantes, incomparável amizade, preocupação e auxílio em experimentos.

À companheira Elis pela amizade e ajuda constante na minha inserção no mundo do 2D.

Aos amigos e colegas da USP por serem coniventes desse tempo tão nosso: Juliana, Gisele, Dr^a Denise, Alex, Thompson, Micheli, Adriana, Carlos, Dr^a Camila Carrião, Patricia Appolinário, Thiago Mattos, Priscila, Angélica, Júlio, Felipe Godoy, Thiago Lopes, Alê, Sílvia,

Alexsandra, Marcela Bach, Mariana Burrows, Raphael Dias, Eliziane e Orlando. Apesar de agrupados cada um tem seu valor e contribuição na minha formação pessoal e profissional.

Aos professores Alicia, Luís Eduardo, Laurindo, Nadja, Maria Júlia, Deborah, Sayuri, Maria Tereza, Paolo, Emerson, Vitor Ferreira, Toledo, Etelvino, Maísa Brigagão, Sandra Farsky e Toninha pelo empréstimo de equipamentos/reagentes, colaborações, discussões científicas e conselhos. Também, agradeço os respectivos integrantes de seus laboratórios pela atenção e disponibilidade, principalmente, Denise, Izaura, Leonora, Alessandro Jordão, Victor, Fernanda, Emerson, Camile, Osmar, Simone, Cristina, Alberto, Leandro, José Renato e Cléber.

À Profª Marisa pela disponibilidade, conselhos e amizade.

À Profª Flávia pelas discussões científicas e sobre a vida e, sobretudo, pela amizade.

Aos amigos de Vitória da Conquista, especialmente Davson por compreender minha ausência e torcer por mim, suportando muitas vezes minhas lamentações e mau-humor. Às amigas Lindiane, Jaqueline e Yldene pela amizade de anos. Todos vocês são muito especiais.

Aos amigos que mantenho desde a faculdade que me fazem ver um significado maior na vida (e que sabem nossos segredos irrelatáveis): Amanda, Karin, Simony, Aristides, Cátia, Ana, Fabian, Olimpia, André Luiz, Patrícia Mello e Diogo.

Aos amigos e colegas da Secretaria da Bioquímica e da Pós-Graduação pela infinita paciência e atenção: Simone, Laura, Fábio, Viviane, Cibele, Milton, Emiliano e Marcelo. Ao pessoal da central analítica. E claro, a todos outros funcionários que são essenciais para o bom funcionamento do Instituto.

Aos amigos e colegas que doaram sangue e que muitos já foram elencados acima.
Obrigado!

Aos animais usados nos experimentos que involuntariamente “doaram” suas vidas, mas desejo muito que não tenha sido em vão.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado direto. À Fapesp, CAPES e INCT-Redoxoma pelo apoio financeiro.

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

On The Road Again (Na estrada novamente) - Mary Maxam

*Já conhecemos centenas de maneiras
que não dão certo. Agora estamos
mais perto do sucesso.*

Thomas Edson

RESUMO

Queiroz, R.F. **Estudos *in vitro* e *in vivo* dos mecanismos pelos quais nitróxidos cíclicos inibem lesões oxidativas**. 2012. 149p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Tempol (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil piperidina-1-oxil) e outros nitróxidos cíclicos reduzem a injúria tecidual em modelos animais de inflamação por mecanismos que não são completamente entendidos. A mieloperoxidase (MPO) tem um papel fundamental na produção de oxidantes por neutrófilos e, portanto, é um importante alvo para anti-inflamatórios. Ao amplificar o potencial oxidativo do H_2O_2 , a MPO produz HOCl e radicais livres através de seus intermediários oxidantes MPO-I [MPO-porfirina•+-Fe(IV)=O] e MPO-II [MPO-porfirina-Fe(IV)=O]. Esses fatos nos levaram a sintetizar e avaliar a capacidade inibitória sobre a atividade clorinante da MPO *in vitro* e *in vivo* do tempol e de três derivados hidrofóbicos substituídos na posição 4 do anel piperidina [(4-azido, 4-benzenosulfonil e 4-(4-fenil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)]. *In vitro*, todos os nitróxidos inibiram a clorinação da taurina mediada pela MPO a pH 7,4 com valores similares de IC_{50} (1,5-1,8 μ M). As constantes cinéticas das reações do tempol com MPO-I ($k = 3,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e MPO-II, cuja cinética indicou um comportamento de saturação ($K = 2,0 \times 10^{-5} \text{ M}$; $k = 3,6 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$), foram determinadas. Modelagens cinéticas indicaram que, em presença de taurina, MPO não produz HOCl livre. Tomados conjuntamente, os resultados indicaram que o tempol age principalmente como um inibidor reversível da MPO por levar ao acúmulo de MPO-II e de complexo [MPO-II-tempol] que não participam do ciclo clorinante. Para examinar se nitróxidos inibem a atividade da MPO *in vivo* selecionamos como modelo a inflamação aguda induzida pela carragenina na pata de ratos. A atenuação da inflamação na pata mostrou correlação com a lipofilicidade do nitróxido em tempos iniciais, mas as diferenças nos efeitos foram pequenas (menor que 2 vezes) quando comparadas com as diferenças de lipofilicidade (maior que 200 vezes). Nenhuma inibição da atividade da MPO foi evidente *in vivo* porque os níveis de atividade nas patas dos ratos correlacionaram com os níveis de MPO. Do mesmo modo, em animais não-tratados ou tratados com nitróxidos, todos os parâmetros empregados para monitorar a inflamação (edema, níveis de proteínas oxidadas e nitradas e exsudação plasmática) correlacionaram com os níveis de MPO. Os efeitos dos nitróxidos *in vivo* foram também comparados com aqueles da hidrazida do ácido 4-aminobenzóico (ABAH) e da colchicina. Tomados conjuntamente, os estudos *in vivo* indicaram que os nitróxidos atenuam a inflamação induzida pela carragenina principalmente por inibirem a migração celular. De acordo com essa conclusão, estudos *in vitro*, mostraram que tempol diminuiu a migração de neutrófilos humanos e de cultura (HL-60 diferenciadas

em neutrófilos) ativados com PMA ou fMLP com IC_{50} 25 μ M. Nesse caso, a polimerização da actina é inibida apenas quando as células são pré-incubadas com tempol por 30 min. Nesse intervalo de tempo, o tratamento com tempol promove a formação de $O_2^{\bullet -}$ via flavoenzimas de maneira dependente da concentração. Subsequente ativação dos neutrófilos de cultura com PMA resulta também em produção intracelular de $O_2^{\bullet -}$ e H_2O_2 que é inibida pelo pré-tratamento com tempol (IC_{50} = 38 μ M). Esses estudos preliminares sugerem que o tempol interfere na migração celular de neutrófilos por atenuar a formação intracelular de ROS. A importância da atividade peroxidásica da superóxido dismutase (hSOD1) *in vivo* é certamente muito mais restrita do que a da MPO em processos inflamatórios no geral. Todavia, essa atividade peroxidásica da hSOD1 pode ter um papel na na patogenia da esclerose lateral amiotrófica (ELA). Por essa razão, os efeitos do tempol sobre as consequências da atividade peroxidásica da hSOD1 (oxidação, dimerização, desenovelamento e agregação da enzima) também foram examinadas. Foi demonstrado que o tempol não interfere no ciclo catalítico da hSOD1, porém, inibe a dimerização da enzima, protegendo-a de desenovelamento e agregação. O nitróxido foi consumido no processo reagindo com o radical triptofanila no peptídeo $^{31}VWGSIK^{36}$ como comprovado por MS. No conjunto, nossos estudos contribuem para esclarecer os múltiplos mecanismos pelos quais nitróxidos podem inibir processos oxidativos e inflamatórios.

Palavras-chave: Tempol, mieloperoxidase, inflamação, superóxido dismutase, edema de pata, quimiotaxia de neutrófilos.

ABSTRACT

Queiroz, R.F. ***In vitro and in vivo studies of the mechanisms by which cyclic nitroxides inhibit oxidative damage***. 2012. 149p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Tempol (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl piperidine-1-oxyl) and other cyclic nitroxides reduce tissue injury in animal models of inflammation by mechanisms that are not fully understood. Myeloperoxidase (MPO) plays a key role in the production of oxidants by neutrophils and therefore is an important target for anti-inflammatory drugs. By amplifying the oxidative potential of H_2O_2 , MPO produces HOCl and free radicals through its oxidizing intermediates MPO-I [MPO-porphyrin^{•+}-Fe (IV)=O] and MPO-II [MPO-porphyrin-Fe (IV)=O]. In this context, we synthesized tempol and three more hydrophobic derivatives substituted in position 4 of the piperidine ring [(4-azido-4 benzenesulfonyl and 4-(4-phenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)] and evaluated their ability to inhibit the chlorinating activity of MPO *in vitro* and *in vivo*. *In vitro*, all the nitroxides inhibited the chlorination of taurine mediated by MPO at pH 7.4 with similar IC_{50} values (1.5 to 1.8 μM). The kinetic constants of the reactions of tempol with MPO-I ($k = 3.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) and MPO-II, whose kinetic indicated a saturation behavior ($K = 2.0 \times 10^{-5} \text{ M}$; $k = 3.6 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$), were determined. Kinetic modeling indicated that in the presence of taurine, MPO does not produce free HOCl. Taken together, the results indicated that tempol acts primarily as a reversible inhibitor of MPO leading to accumulation of MPO-II and of the complex [MPO-II-tempol], which do not participate within chlorinating cycle. To examine whether nitroxides inhibit the activity of MPO *in vivo*, the acute inflammation induced by carrageenan in the rat paw was selected as model. The attenuation of inflammation in paws was correlated with the lipophilicity of the nitroxide in early times, but the differences in effects were small (less than 2-fold) when compared to the differences in lipophilicity (higher than 200 times). No inhibition of MPO activity was evident because the levels of activity in rat paws correlated with the levels of MPO. Similarly, in animals not treated or treated with nitroxides, all parameters used to monitor inflammation (swelling, levels of oxidized and nitrated proteins and plasma exudation) correlated with the levels of MPO. The effects of nitroxides *in vivo* were also compared with those of 4-aminobenzoic acid hydrazide (ABAH) and colchicine. Taken together, the *in vivo* studies indicated that nitroxides attenuate carrageenan-induced inflammation mainly by inhibiting cell migration. According to this conclusion, *in vitro* studies showed that tempol decreased migration of human and culture neutrophils (HL-60 differentiation to neutrophils) activated with PMA or fMLP with $\text{IC}_{50} = 25 \mu\text{M}$. In this case, actin polymerization is inhibited only when cells are preincubated with tempol for 30 min. During this time interval, treatment with tempol promotes the formation of

$O_2^{\bullet-}$ via flavoenzymes in a concentration-dependent manner. Subsequent activation of culture neutrophils with PMA also results in intracellular production of $O_2^{\bullet-}$ and H_2O_2 , which is inhibited by pretreatment with tempol ($IC_{50} = 38 \mu M$). These preliminary studies suggest that tempol interfere in neutrophil chemotaxis by attenuating the formation of intracellular ROS. The relevance of the peroxidase activity of superoxide dismutase (hSOD1) *in vivo* is certainly much narrower than that of MPO. Nevertheless, this peroxidase activity may have a role in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Therefore, the effects of tempol on the consequences of the hSOD1 peroxidase activity (oxidation, dimerization, unfolding and aggregation of the enzyme) were also examined. Tempol inhibited the dimerization of hSOD1, protecting it from unfolding and aggregation, but not interfered in its catalytic cycle. The nitroxide was consumed in the process by reacting with the tryptophanyl radical of the segment $^{31}VWGSIK^{36}$ as evidenced by MS. Overall, our studies contribute to clarify the multiple mechanisms by which nitroxides can inhibit oxidative and inflammatory processes.

Keywords: Tempol, myeloperoxidase, inflammation, superoxide dismutase, paw edema, neutrophil chemotaxis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABAH	Ácido 4-aminobenzóico hidrazida
Amplex red	10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina
BSA	Albumina de soro bovino
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
DFCH-DA	Diclorofluoresceína diacetato
DHE	Dihidroetídio
DHR	Dihidrorodamina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNP	Dinitrofenol
DPI	Difenileno iodônio
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
DTPA	Ácido dietilenotriaminopentacético
EDTA	Ácido etilenodiaminopentacético
CIE	Cromatografia dos íons extrados
EOH	2-hidroxietídio
EPR	Ressonância paramagnética eletrônica
ESI	Ionização por fonte <i>electrospray</i>
fMLP	Peptídeo formil metionil leucil fenilalanina
FTC	Fluoresceína tiosemicarbazida
HL-60	Linhagem de promielócito humano
HRP	Peroxidase de raiz forte
IgG	Imunoglobulina G
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
log P	Coeficiente de lipofilicidade
MPO	Mieloperoxidase
MPO-I	Composto I
MPO-II	Composto II
MS	Espectrometria de massas
Nrf2	Fator relacionado ao NFE2
NP40	Etilfenil-polietilenoglicol
PBS	Tampão fosfato salino
PEG-Catalase	Catalase ligada ao polietilenoglicol
PEG-SOD	SOD ligada ao polietilenoglicol

PMA	Acetato de miristato de forbol
PKC	Proteínas cinases C
Taurina	Ácido 2-aminoetanosulfônico
TNB	Ácido tionitrobenzóico
TPNO [•]	4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi; tempol
TPNO ⁺	Cátion oxamônio derivado do tempol
TPNOH	Hidroxilamina derivado do tempol
Rz	Reinheitzahl (índice de pureza)
RNS	Espécies reativas de oxigênio
ROS	Espécies reativas de nitrogênio
SOD1	Cu/Zn superóxido dismutase citoplasmática ¹
Tween	Polioxietileno-sorbitano monolaurato

¹As letras “h” e “b”, colocadas antes de SOD1, denotam proteína humana e bovina, respectivamente.

SUMÁRIO

1 Introdução	19
1.1. Mieloperoxidase	20
1.2. Superóxido dismutase	24
1.3. Tempol e seus derivados	25
2 Objetivos	29
3 Materiais e Métodos	30
3.1 Materiais	30
3.2 Métodos	33
3.2.1 Síntese dos nitróxidos derivados do tempol	33
3.2.2 Determinação dos valores de log P	34
3.2.3 Incubações contendo MPO	35
3.2.3.1 Misturas reacionais	35
3.2.3.2 Atividade clorinante <i>in vitro</i>	35
3.2.3.3 Experimentos de EPR	36
3.2.3.4 Experimentos de estado estacionário	36
3.2.3.5 Experimentos de cinética rápida	37
3.2.3.6 Simulações cinéticas	38
3.2.4 Experimentos com um modelo animal de inflamação	39
3.2.4.1 Edema em pata de rato induzido pela injeção da carragenina	39
3.2.4.2 Preparação dos extratos dos tecidos	39
3.2.4.3 Dosagem de proteínas	40
3.2.4.4 Análise de resíduos de metionina sulfóxido e 3-nitrotirosina em proteínas por dot-blot	40
3.2.4.5 Análise de 3-clorotirosina nos hidrolisados totais dos homogenatos dos tecidos por UPLC/ESI/MS	42
3.2.4.6 Análise de proteínas carboniladas	43
3.2.4.7 Análises de nitróxidos e seus derivados hidroxilamina por EPR	44
3.2.4.8 Atividade peroxidásica nos homogenatos das patas dos ratos	44
3.2.4.9 Atividade clorinante nos homogenatos das patas dos ratos	45
3.2.4.10 Imunodeteção de MPO nos homogenatos dos músculos das patas	45

3.2.4.11 Caracterização do principal alvo de carbonilação por eletroforese 2D e MALDI Q-ToF	46
3.2.5 Experimentos envolvendo neutrófilos	49
3.2.4.1 Isolamento de neutrófilos humanos	49
3.2.4.1 Cultura de células HL-60 e diferenciação em neutrófilos	50
3.2.5.3 Formação de $O_2^{\bullet -}$ pelos neutrófilos humanos	50
3.2.5.4 Formação de H_2O_2 pelos neutrófilos humanos	51
3.2.5.5 Consumo de oxigênio pelos neutrófilos humanos	51
3.2.5.6 Migração <i>in vitro</i> de neutrófilos humanos	51
3.2.5.7 Polimerização de actina em neutrófilos humanos e de cultura	52
3.2.5.8 Oxidação intracelular do DCFH em neutrófilos humanos	54
3.2.5.9 Oxidação intracelular do DHE em neutrófilos de cultura	54
3.2.5.10 Translocação nuclear de Nrf2 em neutrófilos de cultura	56
3.2.5.11 Consumo do tempol por EPR em neutrófilos humanos	57
3.2.5.12 Análise dos níveis intracelulares de glutatona em neutrófilos humanos	57
3.2.5.13 Atividade da aconitase	58
3.2.5.14 Determinação da viabilidade celular em neutrófilos de cultura	59
3.2.6 Experimentos contendo hSOD1	60
3.2.6.1 Expressão e purificação da hSOD1 recombinante em bactérias	60
3.2.6.2 Incubações contendo hSOD1	60
3.2.6.3 Atividade superóxido dismutase da hSOD1	60
3.2.6.4 Atividade peroxidásica da hSOD1	61
3.2.6.5 Consumo de H_2O_2	62
3.2.6.6 Experimentos com captadores de spin	62
3.2.6.7 Dimerização covalente da hSOD1	62
3.2.6.8 Análise do consumo do tempol por EPR	63
3.2.6.9 Análise do consumo do tempol por HPLC-UV/Vis	63
3.2.6.10 Digestão da hSOD1 com tripsina e análise dos peptídeos por MALDI-ToF/ToF	64
3.2.6.11 Detecção de hSOD1 desenovelada por ELISA	65
3.2.6.12 Experimento de espalhamento dinâmico de luz	66
3.3 Análises estatísticas	66

4 Resultados	67
4.1 Inibição da atividade clorinante da MPO por nitróxidos	67
4.1.1 Tempol e seus derivados hidrofóbicos inibem a cloração da taurina cloramina mediada pela MPO	67
4.1.2 Estudo da cinética das reações do tempol com MPO-I e MPO-II	71
4.1.3 Mecanismo de inibição	76
4.2 Efeito de nitróxidos sobre a inflamação aguda induzida pela carragenina em patas de ratos	80
4.2.1 Atenuação do edema na pata dos ratos induzido pela carragenina	80
4.2.2 Atenuação da oxidação e nitração de proteínas e níveis de MPO nas patas dos ratos	82
4.2.3 Redução da carbonilação de proteínas e exsudação nas patas de ratos induzida pela carragenina	87
4.2.4 A atividade catalítica da MPO tem um papel no desenvolvimento do edema	93
4.3 Tempol inibe a migração de neutrófilos <i>in vitro</i> ?	95
4.3.1 O tempol modula a quimiotaxia e a polimerização da actina em neutrófilos	95
4.3.2 Efeitos do tempol sobre a explosão oxidativa de neutrófilos humanos	98
4.3.3 Formação de ROS intracelular mediada por tempol	101
4.3.4 Caracterização das ROS formadas em neutrófilos tratados com tempol	104
4.3.5 Efeitos do tempol na formação de $O_2^{\bullet -}$ intracelular em neutrófilos ativados	106
4.4 Efeito do tempol em modificações da hSOD1 resultantes de sua atividade peroxidásica dependente do par bicarbonato/dióxido de carbono	109
4.4.1 Efeito do tempol na atividade catalítica da hSOD1	109
4.4.2 Efeito do tempol na dimerização covalente da hSOD1	112
4.4.3 Atenuação da perda de atividade dismutásica e do desenovelamento da hSOD1	113
4.4.4 Consumo do tempol por reações radiculares	114
5 Discussão	121
5.1 Inibição da atividade clorinante da MPO por nitróxidos	121
5.2 Efeito de nitróxidos sobre a inflamação aguda induzida pela carragenina em patas de ratos	124
5.3 Tempol inibe a migração de neutrófilos <i>in vitro</i> ?	127

5.4 Efeito do tempol sobre as modificações da hSOD1 resultantes de sua atividade peroxidásica dependente do par bicarbonato/dióxido de carbono.....	129
6 Conclusões	133
7 Referências	134
Súmula Curricular	150

1 Introdução

Os processos inflamatórios e infecciosos levam à ativação de leucócitos acionando enzimas responsáveis pela defesa do hospedeiro contra microorganismos, principalmente bactérias. Estas células, conhecidas também como fagócitos profissionais, compreendem os neutrófilos polimorfonucleares, monócitos, macrófagos e eosinófilos. Dentre esses tipos celulares, os neutrófilos são os mais abundantes e os primeiros a migrarem para o sítio inflamatório em processos agudos (Dale et al., 2008; Hurst, 2012).

Durante a ativação de neutrófilos ocorre um grande aumento no consumo de O_2 pelas células, fenômeno conhecido como explosão oxidativa. Um sistema multimérico montado na membrana celular, o sistema da NADPH oxidase, é responsável pela redução do O_2 ao $O_2^{\bullet-}$ em taxas elevadas (1 nmol de $O_2^{\bullet-}$ /min para cada 10^6 células). O $O_2^{\bullet-}$ se dismuta a H_2O_2 e O_2 de maneira espontânea ($k = 2 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$) ou catalisada pela SOD ($k = 2 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$) (Klebanoff, 2005; Halliwell e Gutteridge, 1998). Esses produtos iniciais levam à produção de outras espécies reativas derivadas do O_2 ($^{\bullet}OH$, intermediários ferrila, $^{\bullet}NO_2$, $ONOO^-$), genericamente chamadas de ROS e RNS. Além da ativação da NADPH oxidase, a produção dessas espécies reativas depende de outras proteínas como as sintases de óxido nítrico (NOS) e as peroxidases presentes em macrófagos e neutrófilos (Augusto, 2006; Halliwell e Gutteridge, 2007; Hurst, 2012) (Figura 1.1).

Figura 1.1. Representação esquemática das principais fontes de oxidantes derivados do oxigênio e nitrogênio que são importantes na injúria tecidual associada a condições inflamatórias agudas (adaptado de Augusto et al., 2008; Vaz et al., 2009).

1.1. Mieloperoxidase (MPO)

As peroxidases (EC 1.11.1.x) compreendem um grupo de enzimas oxirredutases que utilizam peróxidos como moléculasceptoras de elétrons. Pela presença do grupo heme no sítio ativo, algumas dessas enzimas são classificadas como hemoperoxidases, ou seja, utilizam íons de ferro em suas reações de peroxidação. Entre as hemoperoxidases relacionadas ao sistema imune destacam-se a MPO (liberada pelos neutrófilos) e a peroxidase eosinófila (liberadas pelos eosinófilos). As glutathionas peroxidases e peroxirredoxinas são peroxidases não hêmicas que possuem o selenol ou 1/2-cisteínas com atividade redox, respectivamente (Halliwell e Gutteridge, 2007; Davies, 2008; Dunford, 2010).

As reações mediadas pela MPO (EC 1.11.1.7) são particularmente importantes porque a enzima é expressa abundantemente em neutrófilos (6% da proteína total), e em menor quantidade, em monócitos (<1% da proteína total) e em alguns tipos de macrófagos (Bos et al., 1978; Malle et al., 2007). Além da sua

relação com a defesa contra patógenos em mamíferos, diversos estudos revelaram um papel importante dessa enzima em processos inflamatórios crônicos não relacionados à microorganismos, como doenças neurodegenerativas e aterosclerose (Podrez et al., 2000). Diversos dados epidemiológicos associaram deficiências e polimorfismos da MPO com risco de câncer e de doenças cardiovasculares (Lanza et al., 1987; Male et al., 2003). Além disso, pacientes com níveis séricos e plasmáticos de MPO aumentados mostraram maior risco de ataque cardíaco e outras doenças coronarianas (Brennan e Hazen, 2003).

A MPO é uma enzima rica em arginina, portanto, extremamente básica (pI 10). Ela corresponde a um tetrâmero de 146 kDa constituído de dois homodímeros (73 kDa) ligados por uma ponte dissulfeto [Cys153(319)], e cada subunidade é formada por uma cadeia pesada (58,5 kDa) e uma leve (14,5 kDa). Em cada subunidade, há um cálcio coordenado pentagono-bipiramidalmente no *loop* de oito resíduos altamente conservado (Leu¹⁶⁷-Thr¹⁶⁸-Ser¹⁶⁹-Phe¹⁷⁰-Val¹⁷¹-Asp⁹⁶-Ala¹⁷³-Ser¹⁷⁴) (Fiedler et al., 2000). O grupo heme prostético, ligado covalentemente aos resíduos Glu²⁴², Asp⁹⁴ e Met²⁴³ da cadeia pesada, é constituído pelo íon férrico e a protoporfirina IX (Dunford, 2010), o que confere independência na atividade catalítica de cada subunidade (Andrews et al., 1984; Zuurbier et al., 1992). Além disso, possui cinco resíduos de asparagina (157, 189, 225, 317, 563) susceptíveis a glicosilação, dos quais quatro já foram confirmados bioquimicamente (Furtmüller et al., 2006). A enzima está envolvida na defesa imune inata através da formação de oxidantes microbicidas, dentre os quais o HOCl foi o mais estudado por ser considerado produto específico da MPO (Marquez et al., 1994; Winterbourn et al., 2000). Evidências recentes indicam que a MPO gera outros oxidantes além do HOCl, como radicais tirosila, tiíla, $\cdot\text{NO}_2$ e oxigênio singlete, e todos podem contribuir para injúria

tecidual, iniciação e propagação de doenças inflamatórias agudas e crônicas (Augusto et al., 2006, 2008; Malle et al., 2007).

No espaço intrafagossomal de neutrófilos há diversos sistemas antimicrobianos presentes, mas, certamente, o predominante é constituído por MPO, H_2O_2 e o Cl^- (Hampton et al., 1998), que produzem o potente oxidante HOCl/OCl^- ($\text{pK}_a = 7,53$). Assim, a constante ativação de neutrófilos pode, em condições patológicas, lesionar tecidos do hospedeiro. O HOCl é capaz de iniciar reações oxidativas e reações de cloração, nitração e dimerização de resíduos de aminoácidos, modificando proteínas, lipídeos, DNA e (lipo)proteínas (Figura 1.1.1) (Malle et al., 2006). Por serem considerados marcadores específicos da atividade de MPO, produtos clorinados têm sido extensivamente explorados para caracterizar tecidos lesionados pela MPO *in vivo* (Podrez et al., 2000).

1.1.1. Produtos primários e secundários das reações da MPO. Adaptado de Malle et al. (2006).

Durante o ciclo catalítico da MPO, diversos intermediários podem ser identificados (Figura 1.1.2), dependendo da disponibilidade de espécies reduzidas de O_2 , como $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , e de outras espécies como nitrito, haletos, triptofano,

tirosina e ascorbato (Marquez et al., 1990; Kettle e Winterbourn, 1997; Abu-Soud e Hazen, 2000; Podrez et al., 2000; Furtmüller et al., 2000; Dunford, 1999). A velocidade das reações entre a MPO e os diversos substratos depende de seus potenciais redox e da acessibilidade ao sítio ativo. Portanto, substratos com potenciais de redução de 1,05 a 1,2 V são rapidamente oxidados pela MPO-I ($E^{\circ} = 1,35$ V), mas não tão eficientemente pela MPO-II ($E^{\circ} = 0,97$ V) (Jantschko et al., 2002). O sítio ativo da MPO é estreito e profundo e, portanto, somente substratos de baixo peso molecular poderiam acessá-lo (Zeng e Fenna, 1992; Tien, 1999). Contudo, estudos recentes em nosso laboratório (Vaz e Augusto, 2008) sugerem que a lisozima possa ser substrato da MPO em processo facilitado pelo desenovelamento da proteína em meio ácido ou pela participação de um isômero do composto I cujo radical é transferido da porfirina para a cadeia polipeptídica da MPO (Furtmüller et al., 2006). De fato, um radical de proteína já foi detectado na reação de MPO com H_2O_2 (Lardinois e Montellano, 2000).

Figura 1.1.2. Múltiplos intermediários da MPO. Além dos compostos I e II, também pode haver redução da enzima nativa a uma forma ferrosa $Fe(II)$ inativa ($MPO-Fe(II)-O_2$) que está em equilíbrio com o intermediário chamado de composto III ($MPO-Fe(III)-O_2^{\cdot-}$) (Kettle e Winterbourn, 1997). Estudos espectrais demonstraram que adição de H_2O_2 ao composto II forma o composto III. AH_2 representa um substrato genérico. A formação de ácidos de halogênio (HOX) compreende o ciclo clorinante da MPO, enquanto a formação de radicais livres ($\cdot AH$) ocorre no ciclo peroxidásico da enzima.

1.2. Superóxido dismutase

A esclerose lateral amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa que envolve a perda seletiva dos neurônios motores, levando à atrofia muscular, paralisia e morte. A doença pode se apresentar sob duas formas: a forma familiar, que resulta de mutações genéticas, sendo que, em 20% dos casos tais mutações ocorrem no gene que codifica a enzima Cu/Zn superóxido dismutase (SOD1); e a forma esporádica, responsável por cerca de 90% dos casos, de causa ainda desconhecida. A maior parte das mutações no gene da SOD1 refere-se a substituição de um aminoácido; outras constituem inserções e deleções de aminoácidos, bem como truncamentos do carbono terminal (Valentine et al., 2005).

A SOD1 é uma enzima abundante, predominantemente citossólica, mas encontrada, também, no espaço intermembrana das mitocôndrias e no núcleo. A SOD1 é uma das principais enzimas antioxidantes por catalisar com extrema eficiência a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 e O_2 (Equações (1.2.1-3)) (Halliwell e Gutteridge, 2007).

A SOD1 é um homodímero cujas subunidades têm aproximadamente 16 kDa. Cada subunidade possui uma ponte dissulfeto intramolecular entre duas cisteínas altamente conservadas, as Cys⁵⁷ e Cys¹⁴⁶. Além disso, a enzima coordena, em sua

forma totalmente metalada, um íon Cu^{2+} e um íon Zn^{2+} em cada subunidade. O cobre possui atividade catalítica enquanto o zinco possui importante papel estrutural, auxiliando na estabilidade dos diversos *loops* da enzima (Roberts et al., 2007).

Embora seja uma das principais defesas antioxidantes de mamíferos, a SOD1 apresenta atividades enzimáticas secundárias e pró-oxidantes, como peroxinitrito sintase, tiol-oxidase e atividade peroxidásica. Dentre estas, sua atividade peroxidásica pode ser a mais relevante fisiologicamente, porque é estimulada pelo tampão bicarbonato (Medinas et al., 2007). Em ausência de bicarbonato, a SOD1 consome H_2O_2 , oxidando seus próprios resíduos de histidina e, portanto, comprometendo seu sítio ativo. Em presença de bicarbonato, a SOD1 consome maiores quantidades de H_2O_2 , produzindo o difusível radical carbonato ($\text{CO}_3^{\bullet-}$), que oxida alvos distantes, inclusive o resíduo Trp³² no caso da enzima humana (Zhang et al., 2003). Os produtos deste processo podem levar à formação de dímeros e trímeros, e possivelmente a agregados insolúveis relacionados à ELA (Zhang et al., 2003, Bonini et al., 2004, Medinas et al., 2007, 2010).

1.3. Tempol e seus derivados

Tempol (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxil) e outros radicais nitróxidos estáveis têm se mostrado eficientes inibidores de injúrias teciduais associadas a diversos modelos animais de inflamação. Esses compostos são radicais livres estáveis devido à ligação de 3 elétrons entre o nitrogênio secundário e o oxigênio e à presença de substituintes na posição α (usualmente grupos metila), que dificultam a dismutação do radical (Figura 1.3.1). Devido à natureza paramagnética e à estabilidade, os nitróxidos cíclicos têm sido extensivamente empregados como sondas em estudos biofísicos (Schreier et al., 2012).

Os nitróxidos podem reagir com diversos oxidantes e redutores biológicos e, reciclados através do cátion oxamônio (TPNO⁺) e do derivado hidroxilamina (TPNOH), podem atuar cataliticamente (Figura 1.3.1). Os efeitos protetores dos nitróxidos têm sido atribuídos a sua atividade dismutásica mimética, provavelmente porque esta foi a primeira atividade a ser descrita. Entretanto, Goldstein et al. (2003) demonstraram que nitróxidos não são eficientes como miméticos da superóxido dismutase. Outros mecanismos antioxidantes investigados incluem inibição de reações de Fenton pela habilidade de oxidar íons de metais de transição reduzidos, terminação de reações radicalares em cadeia por recombinação com radicais propagadores e recebimento de elétrons da cadeia mitocondrial de transporte de elétrons (Soule et al., 2007; Kagan et al., 2007).

Figura 1.3.1. Principais reações redox do tempol. Além das reações redox reversíveis, o tempol é consumido por reações de recombinação com radicais alquila, alcoila, tirosila e tiila (X[•]).

Mais recentemente, estudos de nosso laboratório e de outros investigadores demonstraram que nitróxidos interagem com oxidantes derivados do óxido nítrico (revisão em Augusto et al., 2008). Em modelos animais, tempol apresentou efeitos que sugerem propriedades que vão além das propriedades antioxidantes, como a

modulação da expressão de iNOS (Linares et al., 2008) e a ativação de NFkB (Cuzzocrea et al., 2004).

Estudos anteriores indicam que, em ausência de pronunciado impedimento estérico, a estrutura e a delocalização eletrônica de nitróxidos cíclicos têm pouca influência em suas reações (Novak et al., 2004; Goldstein et al., 2006). Nesse sentido, alterar a estrutura do tempol para que se associe aos mediadores de processos inflamatórios (e também para evitar as patentes existentes) constitui uma estratégia interessante do ponto de vista científico e prático. O direcionamento do tempol a mitocôndrias e membranas mitocondriais para diminuir a geração de ROS já foi descrito com sucesso (Dhanarsekaran et al., 2005; Kagan et al., 2007). Com o intuito de nos habilitar para a síntese racional de nitróxidos patentáveis, o Prof. Vitor Ferreira (Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense) adicionou, na posição 4 do anel piperidínico do tempol, grupos farmacologicamente ativos (Figura 1.3.2) (Agalave et al., 2005; Boechat et al., 2011). Alguns desses nitróxidos foram testados neste trabalho.

Figura 1.3.2. Estrutura e lipofilicidade do tempol e de seus derivados hidrofóbicos sintetizados e testados neste estudo. As sínteses dos compostos e a determinação da lipofilicidade (log P) são descritos em Materiais e Métodos (itens 3.2.1 e 3.2.2).

2 Objetivos

A pouca toxicidade, a alta eficiência protetora de nitróxidos contra injúrias oxidativas e inflamatórias e ainda o limitado conhecimento dos seus mecanismos de ação nos motivou a desenvolver esse projeto. Nos propusemos a estudar a capacidade do tempol e de três derivados mais lipofílicos de inibirem tanto a atividade clorinante da MPO *in vitro*, quanto os processos oxidativos mediados pela MPO *in vivo*. Para os estudos *in vivo*, selecionamos a inflamação aguda induzida por carragenina em patas de ratos. Em paralelo, o interesse do grupo pelos mecanismos patogênicos da ELA nos levou a examinar os efeitos do tempol sobre a atividade peroxidásica da hSOD1 dependente de bicarbonato/dióxido de carbono e sobre as consequentes mudanças estruturais da proteína. Consideramos que esses estudos podem fornecer informações sobre os mecanismos pelos quais nitróxidos inibem injúria oxidativa e inflamatória e sobre a relação estrutura-atividade de nitróxidos. Eventualmente, nossos estudos podem também contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias antioxidantes e anti-inflamatórias.

3 Materiais e Métodos

3.1 Materiais

Meio de cultura Luria Broth (meio LB), meio de cultura RPMI 1640 sem glutamina, brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), endonuclease (Benzonase), citocromo c de coração bovino, brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT), ditionito de sódio, colchicina, penicilina G, estreptomicina, H₂O₂, peroxidase de raiz forte (HRP) tipo VI, glutathiona reduzida (GSH), glutaniona oxidada (GSSG), albumina sérica bovina (BSA), ácido aminobenzóico hidrazida (ABAH), anti-actina (A2103) e anti-lamina-B produzidos em coelho, λ -carragenina (tipo IV), 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), 3-cloro-tirosina, ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico, ferricianeto de potássio, dinitrofenol (DNP), resina quelante Chelex, taurina, anti-IgG de coelho produzido em ovelha, xantina oxidase, dimetilformamida (DMF), acetato de miristato de forbol (PMA), formil metionil leucil fenilalanina (fMLP), xantina, ácido ditio-5-nitrobenzóico (DTNB), 4-(2-piridilazo)resorcinol (PAR), rotenona, protoporfirina IX (PPIX), dinitrofenol (DNP), catalase peguizada (PEG-Catalase), SOD peguizada (PEG-SOD), histopaque 1077, dextran de *Leuconostoc Mesenteroides*, brometo de etídio, dihidroetídio (DHE), diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA), ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA), ditiotreitól (DTT), tris(hidroximetil)aminometano (Tris), ácido (N-[2-Hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico]) (HEPES), nitrobenzeno, benzamida, acetanilida, acetofenona, *para*-cloro-fenol, ácido iodoacético, bicarbonato de sódio, nitrito de sódio, 5,5'-dimetil-1-pirrolina N-óxido (DMPO), H₂O₂, 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-piperidiniloxil (Tempol), bis-acrilamida, fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF), iodoacetamida, azul de coomassie, azul de coomassie blue e resina Chelex-100

foram obtidos da Sigma. Acetona, ácido acético, ácido fosfórico, etanol, metanol, éter dietílico, formaldeído 37%, 2-propanol, ácido fórmico, ácido clorídrico 37%, dihidrogenofosfato de potássio, hidrogenofosfato de potássio, ácido perclórico, cloreto de sódio, cloreto de cobre, cloreto de zinco, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio, D-glicose, caseinato de sódio, sulfato de amônio, acetato de sódio, iodoacetato de sódio, tirosina, tiosulfato de sódio, carbonato de sódio, deoxicolato de sódio, orto-dianisidina, glicerol, ágar, azul de metileno, dimetilsulfóxido (DMSO) e ácido nitriloacético (NTA) foram obtidos da Merck. A 3-cloro($^{13}\text{C}_6$)tirosina e a ($^{13}\text{C}_2$, ^{15}N -glicina)-glutathione reduzida e oxidada foram obtidas de Cambridge Isotope Laboratories. A pronase de *Streptomyces griseus* e catalase de fígado bovino foi obtida da Boehringer Mannheim. Dihidrorodamina (DHR), 2',7'-diclorofluoresceína-diacetato (DFCH-DA), amplex red (AR), fluoresceína-5-tiosemicarbazida (FTC), faloidina Alexa Fluor 594, 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e iodoacetamida fluoresceína (IAF) foram obtidos da Molecular Probes. Glicina e guanidina foram obtidas da Invitrogen. O soro fetal bovino foi adquirido da Cultilab. Acrilamida e dodecilssulfato de sódio (SDS) foram obtidos da Gibco BRL. Azul de bromofenol e tetrametiletilenodiamina (TEMED) foram obtidos da Acros. O kit quimioluminescente para revelação de *Western Blot* e *Dot blot* foi obtido da Pierce. Reagente de Bradford foi obtido da Bio-Rad. Os marcadores de peso molecular foram adquiridos da Bio-Rad e Fermentas. Coquetel de inibidores sem EDTA foi obtido da Roche. Tripsina grau sequenciamento foi obtida da Promega. Lisozima de clara de ovo, Triton X-100, ampicilina e cloramfenicol foram obtidos da USB. Ácido bórico foi obtido da Reagen. Perssulfato de amônio e 3-[(3-colamidopropil)dimetilamônio]-1-propanosulfonato (CHAPS) foram obtidos da Pharmacia Biotech. Antisoro anti-MPO e anti-Nrf2, produzidos em coelho, foram obtidos da Abcam. Anti-metionina

sulfóxido, produzido em coelho, foi adquirido da Oxford Biochemical Research. Anti-nitrotirosina produzida em ovelha foi adquirida da Oxis. Anti-IgG de ovelha produzido em coelho foi adquirido da Calbiochem. Dispositivo de ultrafiltração com corte de peso molecular de 3 e 5 kDa, membrana de nitrato de celulose de 8 µm e filtros de 0,22 µm foram obtidos da Millipore. Colunas de cromatografia de troca aniônica Q-Sepharose e MonoQ, de interação hidrofóbica Phenyl-Sepharose, de afinidade por níquel HisTrap Crude, de dessanilização (PD-10), e membranas de nitrocelulose foram obtidas da Amersham Biosciences. Coluna de fase reversa C18 Luna, C18 Synergi Polar RP, C18 Gemini e ODS-Hypersil para HPLC foram obtidas da Phenomenex. MPO de neutrófilos humanos foi obtida da Planta Natural Products (índice de pureza $A_{430}/A_{280} = 0,84$) ou da Alexis Biochemicals (índice de pureza $A_{430}/A_{280} = 0,65$). A concentração da MPO foi determinada espectrofotometricamente ($\epsilon_{430} = 8,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ por heme) (Agner, 1958). A concentração de HRP foi determinada espectrofotometricamente ($\epsilon_{401} = 1,02 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Shanoon et al., 1966). HOCl foi destilado de uma solução comercial e mantido a -80°C até o uso. As soluções estoque de HOCl foram preparadas imediatamente antes do uso em NaOH (0,001 M) e as concentrações foram determinadas espectrofotometricamente ($\epsilon_{290} = 3,5 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Morris, 1966). As soluções de H_2O_2 foram preparadas antes do uso e as concentrações foram determinadas espectrofotometricamente pela reação com peroxidase de raiz forte (HRP) para produzir composto I ($\Delta\epsilon_{403} = 5,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Ogusucu et al., 2007; Toledo et al., 2011). A concentração de tempol foi determinada espectrofotometricamente ($\epsilon_{240} = 1,44 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Hoffman e Eames, 1969) e as concentrações dos outros nitróxidos foram determinadas por EPR por comparação com concentrações conhecidas de tempol. As concentrações de citocromo c e catalase foram determinadas espectrofotometricamente

($\epsilon_{550} = 2,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e $\epsilon_{404} = 3,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, respectivamente) (DeLange, 1976). A bSOD foi adquirida da Alexis Biochemicals. As concentrações de SOD humana e bovina foram determinadas por Bradford e espectrofotometricamente pelo conteúdo de cobre em 680 nm ($\epsilon = 3,0 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e cerca de 70% da proteína estava metalada (Symonyan and Nalbandyan, 1972). O DNBNS (3,5-dibromo-4-nitrosobenzeno sulfonato) foi sintetizado seguindo basicamente o procedimento de Kaur et al. (1981). O peroxinitrito foi sintetizado a partir de nitrito de sódio e H_2O_2 em um reator *quenched-flow*. A concentração de peroxinitrito foi determinada espectrofotometricamente ($\epsilon_{302} = 1,67 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) em pH>12 (Kissner et al., 1997). O tampão fosfato salino (PBS) consistia de tampão fosfato (10 mM), pH 7,4, contendo NaCl (0,14 mM). Para experimentos envolvendo neutrófilos, foram adicionados ao PBS, CaCl_2 (1 mM), MgCl_2 (1 mM) e glicose (5 mM) (PBS glicose).

A água utilizada em todos os experimentos foi deionizada num sistema de purificação Milli-Q da Millipore. Todos os tampões foram tratados *overnight* com Chelex para remover traços de íons metálicos contaminantes antes do uso, além de conterem DTPA (0,1 mM).

3.2 Métodos

3.2.1 Síntese dos nitróxidos derivados do tempol

Os nitróxidos N3tempo (4-azido-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxila, calculado e encontrado para $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{NO}$: C, 54,80; H, 8,69; N, 28,40; O, 8,11) e bztempo (4-benzenosulfonila-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxila, calculado e encontrado para $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}$: C, 57,17; H, 7,10; N, 20,49; S, 10,26) (Figura 1.3.2) foram sintetizados pelos métodos descritos por Bao-Han et al. (2006). O nitróxido tritempo (4-(4-fenil-

1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxila) foi obtido da reação entre 4-azido-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxila e fenilacetileno, usando CuBr como catalisador. Fenilacetileno (0,092 g, 0,9 mmol) foi adicionado a uma solução de 4-azido-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxila (0,150 g, 0,7 mmol) e CuBr (0,095 g, 0,7 mmol) em diclorometano (5 mL). A mistura reacional foi agitada por 12 h e o produto foi purificado por cromatografia em coluna, usando etilacetato/hexano (7:3) como eluente. Após secagem, o pó amarelo obtido (0,161 g, 71%) apresentou as seguintes características: ponto de fusão = 233-235°C e IR (KBr, cm⁻¹): 2923 (ν(C-H)), 765 (ν(C-H)_{ar}), calculado para C₁₇H₂₃N₄O: C, 68,20; H, 7,74; N, 18,71 e encontrado: C, 68,39; H, 7,73; N, 18,72.

3.2.2 Determinação dos valores de log P

Os valores de log P dos nitróxidos (Figura 1.3.2) foram determinados por cromatografia líquida de fase reversa acoplada a um detector UV (Shimadzu) (Amaral et al., 1997; Pires et al., 2001; OECD, 2006). A coluna empregada foi uma ODS-Hypersil (3,0 μm, 2,0 x 125 mm). A fase móvel consistia de 1-octanol saturada com água destilada e um fluxo de 1,0 mL/min foi utilizado nas análises. As medidas foram realizadas em triplicata à temperatura ambiente de (25±1)°C. Os valores de log P foram determinados a partir do logaritmo do tempo de retenção relativo do composto (log k') definido pela expressão $k' = (t_r - t_0)/t_0$, onde t_0 é o tempo morto da coluna medido pela injeção da tiouréia e t_r é o tempo de retenção da droga analisada. Benzamida (log P = 0,64), acetanilida (log P = 1,00), acetofenona (log P = 1,70), nitrobenzeno (log P = 1,85) e *para*-cloro-fenol (log P = 2,40) foram utilizados como padrões para a construção da curva de calibração (OECD, 2006).

3.2.3 Incubações contendo MPO

3.2.3.1 Misturas reacionais

As misturas reacionais continham MPO (15 ou 500 nM por heme), H_2O_2 (50 μM), cloreto de sódio (100 mM), taurina (15 mM), DTPA (0,1 mM) e nitróxidos (nas concentrações especificadas) em tampão fosfato (50 mM), pH 7,4. As reações foram incubadas a 30 ou 37°C.

3.2.3.2 Atividade clorinante *in vitro*

A atividade clorinante da MPO foi monitorada pelo consumo de H_2O_2 e formação de taurina cloramina. O consumo de H_2O_2 foi determinado amperometricamente com um eletrodo seletivo de H_2O_2 acoplado ao potenciostato Apollo 4000 (*World Precision Instruments*). As reações foram iniciadas pela adição de MPO. A formação de taurina cloramina foi quantificada espectrofotometricamente depois da reação com ácido 2-nitro-5-tiobenzóico ($\epsilon_{412} = 1,36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Winterbourn e Kettle, 1994), conforme as equações a seguir:

As reações foram iniciadas pela adição de H_2O_2 . Alíquotas (200 μL) foram retiradas em diversos intervalos de tempo, paradas pela adição de catalase (100 $\mu\text{g/mL}$) e diluídas cinco vezes em TNB (70 μM). A concentração de TNB residual foi obtida após 5 min.

3.2.3.3 Experimentos de EPR

Os espectros de EPR foram adquiridos em temperatura ambiente de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, em um instrumento Bruker EMX. Em tempos determinados, as reações contendo MPO foram transferidas para uma cela chata de quartzo e os espectros foram obtidos. A quantificação dos sinais foi feita pela dupla integração dos sinais simulados e cálculos baseados numa curva padrão de tempol. Demais condições experimentais estão descritas nas legendas das figuras. Para avaliar a reação entre tempol e HOCl, foi empregada a técnica de EPR de fluxo interrompido. A cavidade padrão do instrumento de EPR foi substituída por um ressonador com homogeneizador dielétrico (Bruker ER4117 D-MTV), que tinha 9 mm de distância entre a célula de mistura e o centro do ressonador (Bonini et al., 1999). As soluções de tempol (5 mM) e HOCl (5 mM) em tampão acetato (50 mM), pH 5,4, ou tampão fosfato (50 mM), pH 7,4, foram transferidas para seringas plásticas de 10 mL acopladas a uma bomba de infusão (Harvard *apparatus pump* 22) e misturadas com um fluxo de 0,6 mL/min até que o fluxo fosse parado. O campo magnético foi fixado sobre o máximo do pico central do tempol e seu decaimento foi acompanhado por 15 min. A abordagem cinética de velocidade inicial ($v_i = k[\text{tempol}][\text{HOCl}]$) foi utilizada para a determinação das constantes de velocidade de segunda ordem para a reação entre o tempol e o HOCl. Demais condições experimentais estão descritas nas legendas das figuras.

3.2.3.4 Experimentos de estado estacionário

As mudanças nos espectros UV-Vis da MPO (500 nM por heme) foram monitoradas em um espectrofotômetro Shimadzu UV-2550 a 30°C . As reações foram incubadas com tempol (50 μM) em um volume de final de 50 μL . Os espectros

foram obtidos antes e depois (nos tempos especificados) da adição de H_2O_2 . Em paralelo, a cinética de formação de intermediários da MPO que absorvem em 456 nm foi acompanhada durante 15 min.

3.2.3.5 Experimentos de cinética rápida

Os experimentos de cinética rápida foram realizados utilizando um espectrofotômetro de fluxo interrompido modelo SX-18MV com sistema de computação acoplado ao programa da *Applied Photophysics* (UK), a $(25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$, empregando o modo de mistura sequencial.

Para reação da MPO-I com o tempol, MPO ($0,6 \mu\text{M}$) foi pré-misturada com H_2O_2 ($12 \mu\text{M}$) em tampão fosfato (50 mM), pH 7,4. Após um tempo de espera de 20 ms, a MPO-I formada reagiu com concentrações crescentes do tempol, que estavam em excesso de pelo menos 10 vezes em relação à MPO-I para garantir cinética de pseudo-primeira ordem (Marquez et al., 1990, 1994; Marquez e Dunford, 1995). A formação de MPO-II foi monitorada a 456 nm, que é o ponto isosbético entre a MPO e a MPO-I. Para a reação de MPO-II com o tempol, MPO ($0,6 \mu\text{M}$) foi previamente misturada com H_2O_2 ($6 \mu\text{M}$) e ácido homovanílico ($0,55 \mu\text{M}$) em tampão fosfato (50 mM), pH 7,4 (Jantschko et al., 2005). Após um tempo de espera de 40 s, a MPO-II formada reagiu com concentrações variadas do tempol, que foi pelo menos 10 vezes em excesso à MPO-II. Alternativamente, MPO ($0,6 \mu\text{M}$) foi pré-misturada com H_2O_2 ($12 \mu\text{M}$) (Marquez et al., 1994). Após um tempo de espera de 5 s, a MPO-II formada reagiu com concentrações crescentes de tempol. O retorno da MPO-II para MPO foi monitorado a 456 nm. Em todos os casos, os valores de $k_{\text{obs}} \text{ (t}^{-1}\text{)}$ foram determinados a partir do ajuste das curvas obtidas com equações exponenciais de decaimento de

primeira ordem ($[tempol] = [tempol]_0 e^{-kt}$). Três a cinco determinações de k_{obs} foram realizadas para cada concentração de substrato. A constante de velocidade de segunda ordem para a reação do tempol com composto I foi determinada pelo ajuste linear dos dados de k_{obs} *versus* concentração de tempol utilizada.

Para a reação do tempol com MPO-II, a curva dos dados de k_{obs} *versus* concentração de tempol mostrou comportamento de saturação enzimática. Assim, os dados foram ajustados à equação hiperbólica retangular ($k_{obs} = (k_{4.1.7} \times [TPNO^\bullet]) / (K + [TPNO^\bullet])$) utilizando análise de regressão não-linear para calcular as constantes cinéticas (Marquez et al., 1990).

O desempenho do instrumento foi avaliado por medidas da constante de velocidade de reação da tirosina com HRP-I e HRP-II (Ralston e Dunford, 1980).

3.2.3.6 Simulações cinéticas

Foi empregado o programa de simulação GEPASI 3.3 (Mendes, 1997), que simula cinética de reações bioquímicas. O programa é de acesso livre pela internet (<http://gepasi.dbs.aber.ac.uk/softw/gepasi.html>), constituindo uma excelente ferramenta para analisar cinéticas bioquímicas. Em comparação com outros programas de modelagem cinética (Alves et al., 2006), o GEPASI se destaca pela facilidade no manuseio e funcionalidade.

Foram realizadas simulações cinéticas da atividade clorinante da MPO contendo ou não tempol, empregando os valores de constantes de velocidade disponíveis na literatura e os determinados em nosso trabalho (Tabela 4.1).

3.2.4 Experimentos com um modelo animal de inflamação

3.2.4.1 Edema em pata de rato induzido pela injeção da carragenina

Ratos Wistar machos (270-350 g, 7-8 semanas de idade, n = 4) foram obtidos do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Instituto de Química/USP e os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal do Instituto de Química. Nitróxidos (0,17 mmol/kg), indometacina (17 μ mol/kg, 10 mg/kg), colchicina (2 mg/kg), ABAH (n = 2, 60 mg/kg, 0,5 mmol/kg) ou veículo (DMSO, 200 μ L) foram administrados intraperitonealmente 15 min antes da injeção intraplantar de carragenina na pata posterior esquerda.

O edema na pata esquerda foi induzido pela injeção de 100 μ L de salina estéril contendo λ -carragenina (1%). A evolução do edema foi acompanhada pela medida do tamanho da pata do animal com paquímetro nos tempos 0 (antes da injeção da carragenina), 1,5, 3,0, 4,5 e 6,0 h após a indução. O edema da pata é expresso em milímetros (mm), como a diferença entre o tamanho da pata nos tempos final e inicial (Di Rosa et al., 1971; Morris, 2003). O animal recebeu água *ad libitum* e foi privado de alimento desde 2 h antes do início do experimento. Três ou 6 h após a administração de carragenina, os animais foram eutanaziados com dose letal de xilazina e cetamina. Os músculos das patas foram removidos, lavados duas vezes em salina e rapidamente congelados em nitrogênio líquido e mantidos a -80°C até processamento.

3.2.4.2 Preparação dos extratos dos tecidos

Para as análises de resíduos de proteína contendo 3-nitrotirosina, metionina sulfóxido, 3-clorotirosina e carbonilas e para a análise de distribuição tecidual de nitróxidos, os homogenatos foram preparados como anteriormente descrito, com

poucas modificações (Linares et al., 2008). Os tecidos congelados foram pulverizados em nitrogênio líquido usando pistilo e almofariz e homogeneizados em 5 volumes de tampão de lise gelado (tampão fosfato (50 mM), DTPA (5 mM), Triton X-100 (1%, v/v), coquetel de inibidores de protease livre de EDTA, metionina (50 mM), pH 7,4) com o homogeneizador de tecido (Ultra-Turrax T8) em banho de gelo. Os homogenatos foram centrifugados (1000g) por 10 min, a 4°C, e os sobrenadantes coletados e mantidos a -80°C até as análises posteriores.

Para as análises de migração de neutrófilos e das atividades peroxidásica e clorinante, os homogenatos foram preparados como descritos previamente, com poucas modificações (Bradley et al., 1982). Os tecidos pulverizados foram homogeneizados, como descrito acima, em 5 volumes de tampão fosfato (50 mM) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (0,5%), pH 7,4. Após centrifugação (12000g) por 30 min, a 4°C, os sobrenadantes foram coletados, aliquotados e mantidos a -80°C até as análises posteriores.

3.2.4.3 Dosagem de proteínas

A concentração de proteína total dos extratos, bem como de proteínas purificadas, foi determinada pelo ensaio colorimétrico de Bradford a 595 nm (Bradford, 1976). A curva de calibração foi feita empregando-se BSA, numa concentração de 0 a 5 µg/mL da proteína.

3.2.4.4 Análise de resíduos de metionina sulfóxido e 3-nitrotirosina em proteínas por dot-blot

O protocolo de *Dot blot* foi empregado para visualização de proteínas inespecificamente nitradas e oxidadas em resíduos de tirosina e metionina,

respectivamente. As amostras (5 µg de proteína) foram diluídas em tampão fosfato (50 mM), pH 7,4, e transferidas para a membrana de nitrocelulose com auxílio do sistema a vácuo Manifold. Em seguida, a membrana passou por 3 lavagens, de 10 min cada, com tampão TBS (*Tris Buffered Saline* – Tris HCl (50 mM), NaCl (150 mM), pH 7,5), e foi bloqueada, durante 2 h, com leite desnatado (5%) em tampão TBST (TBS acrescido de Tween[®] 20 (0,05% p/v)). Os anticorpos primários foram anti-3-nitrotirosina produzido em ovelha (diluição 1:5000) e anti-metionina sulfóxido (diluição 1:1000) produzido em coelho, e foram incubados com a membrana por 2 h ou *overnight*, respectivamente. Os anticorpos secundários anti-IgG de ovelha (diluição 1:5000) e anti-IgG de coelho (diluição 1:2500) foram produzidos em coelho e cabra, respectivamente, e incubados com a membrana por 1 h. A análise de densitometria foi realizada usando o programa ImageJ 1.44p (NIH, USA).

Os níveis de resíduos de 3-nitrotirosina foram estimados por comparação com aqueles de BSA (370 µM) nitrada com adição de peroxinitrito (1 mM), cuja extensão da nitração de resíduos de tirosina foi medida espectrofotometricamente em pH>12 ($\epsilon_{430\text{ nm}} = 4,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Sampson et al., 1998). Para confirmar a especificidade do anticorpo anti-3-nitrotirosina, homogenatos (100 µg) de ratos tratados com carragenina foram pré-tratados com ditionito de sódio (10 mM) por 10 min, a 25°C, para redução dos resíduos 3-nitrotirosina à 3-aminotirosina (Crow e Ischiropoulos, 2006). O conteúdo de metionina sulfóxido foi normalizado como porcentagem do animal controle (tratado com carragenina). O conteúdo de proteína total foi determinado por coloração com Ponceau S (Fernandes et al., 2005).

3.2.4.5 Análise de 3-clorotirosina nos hidrolisados totais dos homogenatos dos tecidos por UPLC/ESI/MS

As proteínas dos homogenatos (1,0 mg) foram precipitadas com ácido tricloroacético (10%) gelado, coletadas por centrifugação (16000g) a 4°C, lavadas com ácido tricloroacético (10%) e delipidadas duas vezes com água/metanol/éter etílico (1:3:7 vol/vol) (Hazen et al., 1997). Foi adicionado padrão de 3-clorotirosina isotopicamente marcado (100 pmol; 3-cloro[¹³C₆]tirosina) e as amostras foram submetidas à hidrólise total por pronase, seguindo o procedimento descrito por Herold et al. (2002). As proteínas secas foram desnaturadas com hidrocloreto de guanidina (6 M) em Tris-HCl (50 mM), pH 8,0, e reduzidas com ditiotrietol (30 mM) por 2 h, a 37°C, sob baixa tensão de O₂. Os tióis foram bloqueados com iodoacetato de sódio (150 mM) por 2 h, a 37°C, sob abrigo da luz. As amostras foram dessalinizadas em coluna de corte de 10 kDa (PD10) e secas em secador a vácuo. Após reconstituição em 200 µL de tampão bicarbonato de amônio (50 mM), pH 7,8, adicionou-se 1,2 mg de pronase e cloreto de cálcio (2 mM) e incubou-se a 40°C por 24 h. Após a digestão com pronase, a solução de aminoácidos foi seca em secador a vácuo, ressuspensa em água (100 µL) e filtrada em filtros de membrana de 0,22 µm.

Em seguida, a tirosina e a 3-clorotirosina foram quantificadas pela monitoração do íon selecionado, usando diluição isotópica no modo de ionização positiva no LC-MS (adaptado de Orhan et al., 2004; Chen et al., 2010). Foi utilizado um sistema de UPLC (Shimadzu) acoplado a um espectrômetro de massa com ionização por *electrospray* e detector quadrupolo por tempo de voo (Bruker UHR-ESI-qToF Maxis 3G). A cromatografia líquida foi realizada com uma coluna Gemini C18 (250 × 4,6 mm; tamanho da partícula: 5,0 µm). Os principais parâmetros da

cromatografia líquida foram: solvente A (água + 0,1% ácido fórmico) e B (acetonitrila + 0,1% ácido fórmico); fluxo de 0,6 mL/min; temperatura do forno: 30°C; temperatura do auto-injetor: 15°C; volume de injeção: 40 µL. Os aminoácidos foram eluídos usando um gradiente linear de B, como segue: até 30 min indo de 0-10%, de 30 a 40 min indo de 10-50%, de 40 a 50 min indo de 50-0%, de 50 a 60 min mantendo 0%. Para passagem do LC ao espectrômetro, foi acoplado um divisor de fluxo de 150 µL/min. Sob estas condições, o limite de detecção (sinal/ruído > 5) foi ≥ 100 fmol para todos os aminoácidos. A tirosina, a 3-clorotirosina e a 3-cloro[$^{13}\text{C}_6$]tirosina foram monitoradas pelos íons em m/z 182, 216 e 222, respectivamente. O padrão isotópico se manteve estável após todos os passos. As condições do espectrômetro foram: voltagem do cone, -500 V; temperatura de dessolvatação, 200°C; voltagem do capilar 4200 V; voltagem das lentes, RF 200 Vpp; fluxo de gás de secagem, 8,0 L/min; pressão do nebulizador, 1,6 Bar. Os dados foram analisados utilizando o programa *Compass Data Analysis* do *microTOF Control*.

3.2.4.6 Análise de proteínas carboniladas

O conteúdo de proteína carbonilada foi determinado como descrito anteriormente (Chaudhuri et al., 2006), com menores modificações. Os homogenatos (50 µg de proteína em 50 µL) foram incubados com fluoresceína-5-tiosemicarbazida (1 mM, FTC) em tampão fosfato (50 mM), pH 6,4, por 2 h, a 37°C, ao abrigo da luz. As proteínas foram precipitadas pela adição de 10 volumes de acetona gelada (-20°C) e mantidas *overnight* a -20°C. Após 10 min de centrifugação (16000g) a 4°C, os precipitados foram ressuspensos e lavados duas vezes com acetona gelada. Em seguida, os precipitados de proteína foram solubilizados em tampão de amostra (Tris-HCl (62 mM), pH 6,8, contendo glicerol (10%), SDS (2%),

β -mercaptoetanol (100 mM) e azul de bromofenol (0,01%)), fervidos por 5 min e submetidos à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (5% gel de empacotamento; 12% gel de resolução) a 150 V por 2 h. A imagem das proteínas fluorescentes no gel foi capturada no instrumento Typhoon Trio, com comprimento de onda de excitação de 488 nm e filtro de emissão de 520 nm. A análise de densitometria relativa das colunas foi realizada com o programa ImageJ 1.44p. O gel foi, então, fixado com metanol (50%) e ácido acético (10%) por 10 min, seguido de coloração com azul de coomassie *overnight*. Depois, foi descorado em ácido acético (10%) e foram realizadas as análises de densitometria de bandas. Os níveis de proteínas carboniladas foram expressos relativamente ao conteúdo total de proteína.

3.2.4.7 Análises de nitróxidos e seus derivados hidroxilamina por EPR

Os espectros de EPR foram obtidos em temperatura ambiente de $(25\pm 1)^{\circ}\text{C}$, em um instrumento Bruker EMX. Os homogenatos do músculo da pata contendo 500 μg de proteína em tampão fosfato (500 mM), pH 7,4, foram submetidos à análise de EPR para se determinar os níveis de nitróxidos. Antes de uma segunda leitura, foi adicionado ferricianeto de potássio (100 μM) e os homogenatos foram incubados por 5 min à temperatura ambiente (Nakao et al., 2000), para se determinar os níveis de nitróxidos e hidroxilamina. A quantificação dos sinais foi feita pela integração dupla dos sinais simulados e cálculos baseados numa curva padrão de tempol. Demais condições experimentais estão descritas nas legendas das figuras.

3.2.4.8 Atividade peroxidásica nos homogenatos das patas dos ratos

H_2O_2 (50 μM) foi adicionado às incubações contendo homogenatos de músculo da pata (10 μg , 200 μL), TMB (1,4 mM) e dimetilformamida (8%), em

tampão acetato (50 mM), pH 5,4. A oxidação de TMB foi acompanhada em 655 nm ($\epsilon_{655\text{nm}} = 3,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Bozeman et al., 1990). Os resultados foram expressos como atividade específica (U/mg proteína). Uma unidade de atividade peroxidásica foi definida como a quantidade de enzima que produz 1 μmol de TMB oxidado por min.

3.2.4.9 Atividade clorinante nos homogenatos das patas dos ratos

H_2O_2 (50 μM) foi adicionado às incubações contendo homogenatos de músculo da pata (50 μg , 200 μL), cloreto de sódio (100 mM) e taurina (15 mM), em tampão fosfato (50 mM), pH 7,4. Após 5, 15 e 30 min de incubação a 37°C, foi adicionada catalase (100 $\mu\text{g/mL}$) às alíquotas para cessar a reação. A formação de taurina cloramina foi quantificada pela reação com TNB, como descrito no item **3.2.3.2** (Kettle e Winterbourn, 1994). Os resultados foram expressos como atividade específica (U/mg proteína). Uma unidade de MPO foi definida como a quantidade de enzima que forma 1 μmol de taurina cloramina por min.

3.2.4.10 Imunodeteção de MPO nos homogenatos dos músculos das patas

Tipicamente, os homogenatos (100 μg de proteína) foram diluídos em tampão de amostra, fervidos por 5 min e submetidos à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (5% gel de empacotamento; 12% gel de resolução) a 150 V por 2 h. Em seguida, as proteínas foram transferidas (10 V, 50 min) para membrana de nitrocelulose, para marcação de *Western blotting*. A membrana foi bloqueada, *overnight*, com BSA (4%) em tampão TBST. O anticorpo primário foi o antisoro anti-MPO produzido em coelho (diluição 1:2000, *overnight*), também diluído em BSA

(4%). O anticorpo secundário anti-IgG de coelho (diluição 1:2500) foi produzido em cabra. A análise de densitometria foi realizada como descrito no item **3.2.4.4** e os níveis de MPO foram determinados por comparação das bandas de aproximadamente 60 kDa com aquela de quantidades conhecidas de MPO humana (Nauseef, 1986). O limite de detecção do antisoro anti-MPO foi cerca de 30 ng. Subsequentemente, as membranas foram submetidas à *stripping*, usando o tampão tris (50 mM) contendo SDS (2%) e β -mercaptoetanol (100 mM), pH 6,8. Após abundante lavagem em água destilada, a membrana foi lavada em TBST uma vez, re-bloqueada e procederam-se às mesmas etapas descritas no item **3.2.4.4**. Entretanto, o anticorpo primário foi anti-actina produzido em coelho (1:3000, 2 h) (Planas et al., 2002). A densitometria de cada coluna foi determinada como já descrito.

3.2.4.11 Caracterização do principal alvo de carbonilação por eletroforese 2D e MALDI Q-ToF

Os homogenatos de músculo da pata (100 μ g de proteína em 100 μ L) de ratos tratados ou não com carragenina por 3 h foram incubados com FTC como descrito no item **3.2.4.6**. As proteínas marcadas com o composto fluorescente foram, então, resolvidas com o uso de eletroforese bidimensional (Chang et al., 2003). A separação das proteínas por diferença em ponto isoelétrico foi feita em tiras de gel de poliacrilamida com gradiente de pH (3-10, 13 cm) imobilizado (GE *Healthcare*). Em resumo, os precipitados de proteínas marcadas com FTC foram diluídos em tampão constituído de anfólitos (0,5%, pH 3-10), acrescido de uréia (7 M), tiouréia (2 M), detergente CHAPS (4 %) e azul de bromofenol (0,002%). Em seguida, uma tira de gel de poliacrilamida desidratada foi colocada sobre a amostra (70 μ g de

proteína), que, por capilaridade, cobriu toda a superfície do gel. O gel de poliacrilamida foi então hidratado com a amostra por 12 a 20 h num recipiente selado para evitar ressecamento. A corrida de focalização foi feita no equipamento Ettan IPGphor 3 IEF, utilizando o programa padrão para o tipo de tira empregada (GE *Healthcare*). Após a corrida de focalização, as tiras foram guardadas a -80°C até a segunda dimensão da eletroforese. Antes da separação por peso molecular, as tiras foram descongeladas, reduzidas e alquiladas em tampão de equilíbrio (Tris-HCl (75 mM), uréia (6 M), SDS (2%), glicerol (29,3%, v/v), azul de bromofenol (0,002%), pH 8,8) contendo ditioneitol (10 mM) ou iodoacetamida (50 mM) por 10 min, respectivamente. Em seguida, o excesso de iodoacetamida foi retirado, por uma lavagem em tampão de equilíbrio por 10 min. As tiras foram colocadas sobre o gel de poliacrilamida (12% gel de resolução) e o sistema selado com gel de agarose. Por fim, a eletroforese na segunda dimensão foi feita em duas etapas. Na primeira etapa, foram aplicados 15 mA por tira para a amostra sair da tira de gel de focalização e entrar no gel de poliacrilamida da segunda dimensão e, na segunda, foram aplicados 45 mA por tira para a resolução das proteínas por peso molecular. A eletroforese foi realizada numa câmara fria, com temperatura de 6°C. Ao final da eletroforese, a fluorescência dos géis foi analisada conforme descrito no item **3.2.4.6**. O gel foi, então, fixado com metanol (50%) e ácido acético (10%) por 10 min, seguido de coloração com azul de coomassie coloidal *overnight*. Em seguida, o gel foi descorado em ácido acético (10%). A principal região do gel de poliacrilamida correspondente à carbonilação foi cortada e colocada em um tubo de plástico. O pedaço do gel foi então cortado em pedaços menores para aumentar a superfície de contato com as soluções. Primeiramente, os pedaços de géis foram lavados extensivamente com metanol (50%) e ácido acético (10%) para completa remoção

do corante. Após o desaparecimento da coloração azul, os géis foram lavados quatro vezes com água. Em seguida, foram submetidos a dois ciclos de incubação com bicarbonato de amônio (100 mM) e desidratação com acetonitrila e, depois, secos a vácuo. Os tubos foram colocados em gelo e foi feita adição de 50 µL de tampão de digestão (bicarbonato de amônio (50 mM), pH 8,0, contendo CaCl_2 (2 mM) e tripsina grau sequenciamento (12,5 ng/µl)), para reidratação dos pedaços de gel. Após 45 min de reidratação, adicionou-se mais tampão bicarbonato de amônio (50 mM), pH 8,0, para cobrir os géis, e incubou-se por 18 h, a 37°C, para a digestão enzimática. Os tubos foram centrifugados (16000g) por 1 min e o sobrenadante recolhido num novo tubo. Em seguida, foi feita a extração dos peptídeos da malha do gel de acrilamida em duas etapas que consistiram de uma extração polar e outra apolar: na primeira, foi usado ácido trifluoroacético (5%) em água; e na segunda, ácido trifluoroacético (5%) em acetonitrila (50%). Em ambas as etapas, as incubações foram por 30 min sob agitação. Após a centrifugação dos géis por 1 min, o sobrenadante foi recolhido e misturado ao sobrenadante prévio. Esta etapa de extração foi repetida mais uma vez para cada solvente e então a solução de peptídeos foi seca a vácuo. Os peptídeos extraídos foram analisados por MALDI-Q-ToF MS/MS em um espectrômetro da Waters (Micromass Q-ToF Premier) equipado com uma fonte MALDI (Waters Corporation), no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS, Campinas, SP). Os dados de MS/MS obtidos para os peptídeos tripticos foram convertidos para o formato de arquivo *.pkl e utilizados na identificação das proteínas presentes na amostra pela busca no banco de dados de estrutura primária de proteínas de mamíferos a partir da plataforma MASCOT (<http://www.matrixscience.com/>). A validade da identificação foi atestada por sua significância estatística ($p < 0,01$).

3.2.5 Experimentos envolvendo neutrófilos

3.2.5.1 Isolamento de neutrófilos humanos

Neutrófilos de sangue periférico foram obtidos a partir de doadores voluntários aparentemente saudáveis, não-fumantes, recrutados entre professores e alunos do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, seguindo protocolos aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Química. Os granulócitos foram isolados do sangue periférico de acordo com Boyum (1968), com modificações. O sangue foi colhido em tubos plásticos contendo citrato de sódio (25 mM) e posteriormente diluído na proporção 1:1 com salina (0,9%) estéril. A diluição foi colocada lentamente sobre 10 mL de Histopaque (densidade = 1077) num ângulo de 45°. O material foi centrifugado (500g) à temperatura ambiente, por 30 min, em centrífuga de rotor móvel. Ao infranadante foram adicionados 20 mL de dextran (4% em salina estéril) para sedimentação dos eritrócitos. O material foi mantido inclinado a 45°, à temperatura ambiente, por 45 min. O sobrenadante foi recolhido, o volume completado para 30 mL com salina estéril e novamente centrifugado (500g) à temperatura ambiente por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o infranadante submetido à hemólise hipotônica em 10 mL de água gelada (0°C, destilada e filtrada em membrana de 0,22 µm) sob agitação constante por 1 min. A isotonicidade foi restabelecida com 5 mL de NaCl estéril (2,7%) e 15 mL de salina estéril. O material foi centrifugado (500g) à temperatura ambiente por 5 min, o sobrenadante descartado e o infranadante ressuspensionado em 1 mL de PBS (sem cálcio e magnésio) ou RPMI 1640, caso as células fossem utilizadas para ensaios de quimiotaxia. A contagem de células totais foi realizada em câmara de Neubauer e a integridade da membrana celular estimada pelo método de exclusão do azul de tripan a 0,2% (Strober, 2001).

3.2.5.2 Cultura de células HL-60 e diferenciação em neutrófilos

O cultivo e a diferenciação das células leucêmicas promielocíticas humanas (HL-60) foram feitos de acordo com Jacob et al. (2002), por proliferação contínua em meio de cultura (RPMI 1640) suplementado com soro fetal bovino (20%), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL), a 37°C em atmosfera humidificada com CO₂ (5%). O tempo para duplicação da quantidade de células foi de 36 h. A cada dois dias, o meio de cultura foi trocado e as células foram divididas em outras garrafas para que a concentração final fosse de 5×10^5 células/mL. A HL-60 (1×10^6 /mL) foi diferenciada para neutrófilos pela adição de DMSO (1,3%) num meio de cultura RPMI contendo soro fetal bovino (10%), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). As células foram mantidas nesse meio por três dias até maturação completa para neutrófilos, chamados aqui de neutrófilos de cultura. Em seguida, as células foram centrifugadas (400g), a 4°C, por 10 min, e lavadas três vezes com PBS glicose. A contagem de células foi realizada em câmara de Neubauer e a integridade da membrana celular foi estimada conforme descrito acima (Strober, 2001).

3.2.5.3 Formação de O₂^{•-} pelos neutrófilos humanos

A formação de O₂^{•-} foi determinada espectrofotometricamente pela redução do citocromo c, especificamente inibida pela superóxido dismutase (100 µg/mL). Os nitróxidos (nas concentrações especificadas) foram pré-incubados com neutrófilos ($3,3 \times 10^6$ /mL) em PBS glicose por 5 ou 30 min, a 37°C, num volume final de 300 µL. Em seguida, foi adicionado citocromo c (40 µM) e as células foram ativadas ao serem incubadas com acetato de forbol miristato (PMA, 100 ng/mL), um ativador de

proteínas cinases C (PKC). A redução do citocromo c foi acompanhada a 550 nm durante 20 min ($\Delta\epsilon = 2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Pick e Mizel, 1981).

3.2.5.4 Formação de H_2O_2 pelos neutrófilos humanos

A formação de H_2O_2 também foi determinada espectrofotometricamente, acompanhando-se a oxidação do AR à resorufina durante a atividade peroxidásica da HRP. Os nitróxidos (nas concentrações especificadas) foram pré-incubados com neutrófilos ($3,3 \times 10^6/\text{mL}$) em PBS glicose por 5 ou 30 min, a 37°C , num volume final de 300 μL . Em seguida, AR (50 μM) e HRP (10 μM) foram adicionados. As células foram ativadas como descrito acima. A oxidação de AR dependente do H_2O_2 foi acompanhada a 550 nm por 20 min ($\Delta\epsilon = 5,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (adaptado de Zhou et al., 1997).

3.2.5.5 Consumo de O_2 pelos neutrófilos humanos

O consumo de O_2 foi monitorado constantemente com o uso do eletrodo seletivo de Clark com interface com o computador. O sistema possui câmara fechada e a temperatura foi ajustada em 37°C . Neutrófilos humanos ($3,3 \times 10^6/\text{mL}$) foram pré-incubados com tempol, nas concentrações indicadas, por 30 min em PBS glicose, sob agitação de 300 rotações por min (rpm), num volume final de 2 mL. Em seguida, as células foram ativadas com PMA (Horgan et al., 1986).

3.2.5.6 Migração *in vitro* de neutrófilos humanos

Para o estudo da locomoção dos neutrófilos em direção aos agentes quimiotáticos PMA ou fMLP, utilizou-se a técnica de Boyden (Boyden, 1962), com algumas modificações. Filtros de nitrato de celulose com poros de 8 μm de diâmetro

(Millipore) foram usados para separar os compartimentos superior e inferior das câmaras. Uma solução de PMA (100 ng/mL) ou fMLP (10 nM) (Kenaider et al., 2012) em RPMI 1640 contendo Hepes (20 mM) e BSA (0,1%) foi adicionada aos compartimentos inferiores da câmara de Boyden, enquanto os compartimentos superiores foram preenchidos com suspensão de neutrófilos humanos ($3,3 \times 10^6$ /mL) RPMI (BSA 0,1%). As células suspensas em RPMI foram pré-incubadas com tempol (nas concentrações indicadas) a 37°C, por 30 min, num volume de 300 µL. Em seguida, foram transferidas para a Câmara de Boyden e incubadas por 2 h a 37°C sob atmosfera de ar contendo CO₂ (5%). Depois, os filtros foram removidos para fixação das células e coloração com Hematoxilina de Harris. A migração de neutrófilos no filtro foi determinada por microscopia óptica pelo método *leading front*, medindo-se a distância percorrida da face superior do filtro até o plano mais distante que ainda continha duas células, com objetiva de 40x. Quatro campos foram contados com o objetivo de se obter a média para cada filtro. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.2.5.7 Polimerização de actina em neutrófilos humanos e de cultura

A polimerização da actina foi avaliada pela medida da fração insolúvel a Triton X-100 (Downey et al., 1992). Os neutrófilos ($3,3 \times 10^6$ /mL) foram pré-incubados com tempol nas concentrações especificadas, por 5 ou 30 min, em PBS glicose, a 37°C, num volume final de 300 µL. Em seguida, as células foram ativadas pela adição de fMLP (10 nM) ou PMA (100 ng/mL). Após 1 e 10 min, respectivamente, as células foram centrifugadas (500g) por 5 min a 4°C e ressuspensas em tampão Triton-PHEM (0,75% Triton X-100, 60 mM Pipes, 25 mM Hepes, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl₂) contendo PMSF (1 mM) e coquetel de inibidor de protease. Em seguida, o

homogenato foi submetido à centrifugação (16000g) por 10 min. A fração insolúvel a Triton X-100 foi ressuspendida em 100 µL de tampão de amostra e 25 µL foram submetidos à SDS-PAGE e *western blotting*, conforme descrito no item **3.2.4.10**. Em alguns experimentos, neutrófilos de cultura foram pré-incubados por 10 min com DPI (15 µM), PEG-Catalase (250 U/mL) e catalase (250 U/mL) antes de serem ativados pelo PMA (100 ng/mL). Após *stripping*, a membrana foi incubada com o anticorpo anti-lamina B (1:2000, 2 h) produzido em coelho, para corrigir a quantidade de proteína aplicada.

Alternativamente, foi realizada a marcação com faloidina Alexa Fluor 594, de acordo com as recomendações do fabricante, para avaliar a actina polimerizada. Após as incubações, a suspensão de células foi igualmente centrifugada e lavada em PBS pré-aquecido a 37°C. Em seguida, as células foram fixadas com formaldeído (37%) livre de metanol por 10 min à temperatura ambiente. As células foram lavadas três vezes com PBS e permeabilizadas com Triton X-100 (0,1%) por 5 min. Após dois ciclos de lavagem, as células foram incubadas por 20 min à temperatura ambiente com uma solução de faloidina Alexa Fluor 594 (165 nM) e DAPI (0,5 µg/mL) em PBS, para marcação da actina polimerizada e do núcleo, respectivamente. BSA (1%) foi adicionada à solução para evitar coloração inespecífica. Por fim, as células foram lavadas, ressuspendidas em PBS, montadas em lâminas e visualizadas por microscópio de fluorescência acoplado a uma câmara digital com aumento de 100x (em óleo de imersão). Foram obtidas imagens de quatro a cinco campos e o programa *Photoshop* foi utilizado para tratamento destas imagens.

3.2.5.8 Oxidação intracelular do DCFH em neutrófilos humanos

A DFCH-DA foi usada para medir o estado redox intracelular, por reagir inespecificamente com diversas espécies oxidantes (Wang and Joseph, 1999). Este composto é uma molécula não-fluorescente e permeável à membrana celular. Esterases intracelulares clivam os grupos acetila da molécula para produzir a DCFH não-fluorescente, que é carregada e fica retida dentro das células. Neutrófilos humanos ($3,3 \times 10^6/\text{mL}$) foram ressuspensos em PBS glicose e incubados com DCFH-DA ($10 \mu\text{M}$) por 10 min, a 37°C , sob o abrigo da luz. Em seguida, as células foram centrifugadas ($400g$) a 4°C , por 5 min, e lavadas uma vez com PBS glicose. Tempol, nas concentrações indicadas, foi adicionado às células e a oxidação da DCFH foi monitorada por fluorescência ($\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$) em um leitor de microplacas. Em alguns experimentos, antes da adição de tempol, as células foram pré-incubadas com PEG-Catalase (250 U/mL), PEG-SOD (250 U/mL), DPI ($15 \mu\text{M}$) ou DNP ($15 \mu\text{M}$) por 15 min, a 37°C . Alternativamente, as células pré-tratadas com DCFH-DA foram incubadas com 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinol (piperidina) ou 3-carbamoil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidini-1-oxil (3-CP) nas concentrações de $50 \mu\text{M}$, ao invés do tempol.

3.2.5.9 Oxidação intracelular do DHE em neutrófilos de cultura

Neutrófilos ($6,6 \times 10^6/\text{mL}$) em PBS glicose com adição de DTPA ($0,1 \text{ mM}$) e DHE ($50 \mu\text{M}$) foram incubados com tempol ou hidroxilamina derivada do tempol (nas concentrações especificadas) a 37°C , por 30 min, num volume final de $300 \mu\text{L}$. Em alguns experimentos as células já pré-incubadas com tempol foram adicionadas de DHE e ativadas pelo PMA (100 ng/mL) por mais 15 min. Após centrifugação ($400g$) por 10 min, o sobrenadante foi recolhido e armazenado a -80°C até análise. As

células foram então lavadas duas vezes com PBS contendo DTPA para retirar o DHE que não foi incorporada. Em seguida, as células foram submetidas à lise em 150 μ L de PBS/DTPA acrescido de Triton X-100 (0,1%), mantidos sob leve agitação por 15 min a 4°C. O lisado celular foi centrifugado (13000g) por 15 min e uma alíquota de 5 μ L do sobrenadante foi utilizada para dosagem de proteínas pelo método de Bradford. A uma alíquota de 100 μ L foram adicionados 100 μ L de uma solução de HClO_4 (0,2 M) em metanol e a amostra foi incubada por 1 h em gelo para precipitar proteínas. Após centrifugação (13000g) por 15 min, a 4°C, uma alíquota de 100 μ L do sobrenadante foi tratada com 100 μ L de uma solução de fosfato de potássio (1 M, pH 2,7) para precipitar o ânion ClO_4^- . Por fim, as amostras foram novamente centrifugadas e os sobrenadantes foram ensaiados por HPLC-UV/Vis. A separação cromatográfica foi realizada com coluna de fase reversa para compostos polares Synergi Polar RP (Phenomenex, 150x3,0 mm, 4 μ m, 80 Å) acoplada a uma pré-coluna C18 (Phenomenex, 4 x 3,0 mm). As fases móveis foram água/acetonitrila/TFA (A) (90:10:0,1) e acetonitrila/água/TFA (B) (60:40:0,1), sob a seguinte condição cromatográfica: 40% de B até 5 min; de 40 a 100% de B até 25 min; 100% de B até 30 min; de 100 a 40% de B até 40 min; 40% de B até 45 min. O fluxo foi 0,6 mL/min. DHE foi monitorada por absorção na região UV a 245 nm, enquanto os compostos fluorescentes EOH (2-hidroxietídio) e etídio foram monitorados por detecção por fluorescência (λ_{exc} = 480 nm, λ_{em} = 580 nm). A quantificação dos compostos foi realizada por comparação das integrais das áreas dos picos correspondentes com aquelas obtidas com padrões autênticos submetidos às mesmas condições cromatográficas (Fernandes *et al.*, 2007; Zielonka *et al.*, 2008). A concentração dos padrões foi quantificada pela absorvidade molar de cada composto (etídio ϵ_{480} = $5,74 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, DHE ϵ_{265} = $1,80 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e ϵ_{345}

= $9,75 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). O padrão de EOH foi preparado conforme descrito anteriormente (Zhao et al., 2003). Em resumo, DHE (50 μM) foi oxidada pelo sistema xantina/xantina oxidase (0,5 mM/0,05 U/mL) em PBS contendo DTPA (0,1 mM) a 37°C por 30 min. A mistura reacional foi separada no HPLC nas condições descritas acima e o EOH foi coletado e liofilizado. O resíduo cor-de-rosa obtido foi ressuspendido em DMSO e a concentração determinada em espectrofotômetro (EOH $\epsilon_{475} = 9,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Zielonka et al., 2005). Os níveis de DHE e de seus produtos oxidados presentes no sobrenadante foram expressos como concentração molar, enquanto que os presentes no compartimento intracelular foram expressos como nmol/mg de proteína. Todos os experimentos descritos acima foram realizados na ausência de luz.

3.2.5.10 Translocação nuclear de Nrf2 em neutrófilos de cultura

Neutrófilos ($6,6 \times 10^6/\text{mL}$) foram pré-incubados com o tempol, nas concentrações especificadas, em PBS glicose, por 5 ou 30 min, a 37°C. Após a incubação, as suspensões celulares foram submetidas à centrifugação (400g) a 4°C por 10 min e as células foram lavadas duas vezes com PBS. Em seguida, a fração nuclear de neutrófilos foi isolada como descrito por Flaherty et al. (2002). Em síntese, as células foram ressuspendidas em 400 μL de tampão de lise para isolamento da fração nuclear, que consistia de Hepes (10 mM), KCl (10 mM), MgCl_2 (2 mM), DTPA (0,1 mM), pH 7,4. As células foram incubadas no gelo por 15 min e então vigorosamente homogeneizadas após adição de 25 μL de NP-40 (10%). Após 1 min de centrifugação (16000g), a 4°C, a fração nuclear foi ressuspendida em 50 μL de tampão de extração (Hepes 50 mM, KCl 50 mM, NaCl 300 mM, DTPA 0,1 mM, glicerol 10%, DTT 1 mM, pH 7,8), homogeneizada e incubada no gelo por 20 min.

Após centrifugação, os extratos nucleares foram armazenados a -80°C até as análises. Alíquotas contendo 40 μg de proteínas foram submetidas à SDS-PAGE e *western blotting* conforme descrito no item **3.2.4.10**. Porém, neste caso, o anticorpo primário foi o anti-Nrf2 produzido em coelho (1:2000, *overnight*). Após *stripping*, a membrana foi incubada com o anticorpo anti-lamina B para controle da proteína total.

3.2.5.11 Consumo de tempol por EPR neutrófilos humanos

Neutrófilos ($3,3 \times 10^6/\text{mL}$) foram incubados com o tempol (nas concentrações especificadas) em PBS glicose, a 37°C , num volume final de 300 μL . Após os tempos determinados, a mistura reacional foi centrifugada (500g) por 5 min a 4°C , e o sobrenadante foi submetido à análise no EPR e espectros foram adquiridos como descrito no item **3.2.3.3**. Antes de uma segunda leitura, ferricianeto de potássio (100 μM) foi adicionado e a mistura foi incubada por mais 5 min (Nakao et al., 2000). Demais condições experimentais estão descritas nas legendas das figuras.

3.2.5.13 Análise dos níveis intracelulares de glutathione em neutrófilos humanos

Neutrófilos humanos ($3,3 \times 10^6/\text{mL}$) foram pré-incubados com o tempol, nas concentrações especificadas, em PBS glicose, por 30 min, a 37°C . Em seguida, as reações foram centrifugadas (400g) por 10 min, a 4°C . Ácido tricloroacético (20%, 100 μL) contendo os padrões internos ($^{13}\text{C}_2, ^{15}\text{N}$ -glicina)-glutathione reduzida e ($^{13}\text{C}_4, ^{15}\text{N}_2$ -glicina)-glutathione oxidada (100 pmol) foi adicionado às células e estas foram incubadas por 5 min, a 4°C . Após centrifugação (10000g) por 15 min, a 4°C , o sobrenadante foi recolhido e submetido (20 μL) à análise de GSH e GSSG

intracelulares por HPLC acoplado a espectrometria de massas. O sistema consistia de um HPLC-UV/Vis da Agilent constituído por um autoinjeter (Agilent 1200 *high performance*) resfriado a 4°C, uma bomba binária (Agilent 1200 *binary pump* SL) e forno de coluna a 18°C. A separação cromatográfica foi realizada numa coluna C18 de fase reversa (Phenomenex, Luna, 150 x 3.0 mm, 3 µm) acoplada a uma pré-coluna (Phenomenex, 4 x 3,0 mm). As amostras foram eluídas em gradiente de ácido fórmico (0,1%, A) e acetonitrila contendo ácido fórmico (0,1%, B), sob a seguinte condição cromatográfica: de 0 a 12% de B até 17 min; de 12 a 80% de B até 20 min; 80% de B até 25 min; de 80 a 0% de B em 2 min; 0% de B até 42 min. O fluxo foi de 0,2 mL/min. O detector foi um espectrômetro de massas Quattro II (Micromass, Manchester, Ukcom) com fonte *electrospray* em modo positivo (ESI+). A análise foi feita pelo monitoramento de reações selecionadas (SRM – *selected reaction monitoring*), conforme as transições descritas: GSH (308 → 179, 308 → 162); [¹³C₂, ¹⁵N-glicina]GSH (311 → 182, 311 → 165); GSSG (307 → 130, 613 → 484); [¹³C₄, ¹⁵N₂-glicina]GSSG (310 → 130, 619 → 484). As condições utilizadas para as análises foram: voltagem do capilar: 3500 V; temperatura de bloco: 100°C; temperatura de dessolvatação: 250°C; voltagem do cone: 25 ou 30 V para GSH e GSSG, respectivamente; energia de colisão: 15 V. Sob estas condições, o limite de detecção (sinal/ruído > 5) foi ≥ 3 pmol para todos os compostos. Glutathione reduzida, oxidada e seus respectivos padrões isotópicos foram estáveis durante todos os passos de preparação do homogenato.

3.2.5.13 Atividade da aconitase

A atividade da aconitase foi determinada de acordo com Gardner et al. (1994). Neutrófilos de cultura (3,3 x 10⁶/mL) foram incubados com tempol (nas

concentrações especificadas) por 30 min a 37°C em PBS glicose, num volume final de 300 µL. Em seguida, as células foram lisadas por quatro ciclos de resfriamento em nitrogênio líquido e aquecimento em banho-maria a 37°C. Após centrifugação (10000g) por 5 min a 4°C, os sobrenadantes foram recolhidos, mantidos no gelo e a concentração de proteína foi determinada como descrito no item **3.2.4.3**. No tampão Tris-HCl (50 mM), pH 7,4, contendo citrato de sódio (5 mM), MnCl_2 (0,6 mM), NADP^+ (0,2 mM), isocitrato desidrogenase (2 U/mL), foi adicionado 50 µg de proteína. A formação de NADPH foi acompanhada em 340 nm. Uma unidade de atividade de aconitase foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 nmol de NADPH por min.

3.2.5.14 Determinação da viabilidade celular em neutrófilos de cultura

Neutrófilos de cultura ($3,3 \times 10^6/\text{mL}$) foram incubados com o tempol (nas concentrações especificadas) por 30 min, a 37°C, em seguida foi adicionada PMA (100 ng/mL) e a mistura foi incubada por mais 15 min. A integridade da membrana celular e a viabilidade celular foram avaliadas antes e após a adição de PMA.

Para estimar a integridade da membrana celular, foi utilizada a contagem em câmara de Neubauer pelo método de exclusão do azul de tripan a 0,2% (Strober, 2001). Também foi avaliada a atividade da lactato desidrogenase no sobrenadante da reação (Facundo et al., 2005). A amostra foi diluída 10 vezes num tampão tris (0,2 M), pH 7,3, contendo piruvato de sódio (3 mM) e NADH (0,66 mM), a 37°C. O consumo de NADH foi acompanhando a 340 nm num leitor de placas. Uma unidade atividade de lactato desidrogenase foi definida como a quantidade de enzima capaz de consumir 1 µmol de NADH por min.

A viabilidade celular foi avaliada pela medida de fluorescência relativa de brometo de etídio (50 μ M), usando um leitor de placas com comprimento de onda de excitação e emissão de 365 e 580 nm, respectivamente (Karsten e Wollenberger, 1980; Facundo et al., 2005). Os dados são expressos como a porcentagem de células vivas. Para todos os ensaios, Triton X-100 (0,1%) foi usado como permeabilizante celular e controle positivo de morte celular.

3.2.6 Experimentos contendo hSOD1

3.2.6.1 Expressão e purificação da hSOD1 recombinante em bactérias

A expressão do plasmídio pET-3d que codifica a enzima hSOD1 nativa (gentilmente cedidos pelo Dr. J. S. Beckman, Oregon State University) foi feita em *Escherichia coli* da linhagem BL21(DE3)pLysS (Leinweber et al., 2004; Alvarez et al., 2004). A expressão, purificação e determinação do teor de metais da hSOD1 foram feitas de acordo com o protocolo descrito em Medinas et al. (2009). O conteúdo dos metais cobre e zinco na enzima foi de 0,7 por monômero (Medinas et al. (2009).

3.2.6.2 Incubações contendo hSOD1

A menos que especificado diferentemente, as misturas reacionais continham hSOD1 (30 μ M por monômero), H₂O₂ (1 mM), bicarbonato de sódio (25mM), tempol (nas concentrações especificadas) e DTPA (0,1 mM) em tampão fosfato (50 mM), pH7,4, e foram incubados a 37°C por 1 h.

3.2.6.3 Atividade superóxido dismutase da hSOD1

As reações foram paradas pela adição de catalase (100 μ g/mL) e a atividade superóxido dismutase foi mensurada pelo método do citocromo c (McCord &

Fridovich, 1969). A quantidade de xantina oxidase empregada foi aquela capaz de produzir uma velocidade de redução do citocromo c de 0,025 u.a./min a 550 nm. Uma unidade SOD é definida com base na quantidade de enzima necessária para causar a inibição de 50% da velocidade de redução do citocromo c num ensaio de 1 mL. Tipicamente, as preparações de enzima exibiram uma atividade específica de $4,3 \pm 0,2 \times 10^3$ U/mg (mg de proteína normalizado pelo conteúdo de cobre).

3.2.6.4 Atividade peroxidásica da hSOD1

A hSOD1 (2 μ M por monômero), H_2O_2 (1 mM), bicarbonato de sódio (25 mM), DHR (0,1 mM), tempol (nas concentrações especificadas) e DTPA (0,1 mM) em tampão fosfato (50 mM), pH 7,4 foram incubados a 37°C. A oxidação da dihidrorodamina (DHR) durante 5 min foi utilizada para acompanhar a formação do $CO_3^{\bullet-}$ pela hSOD1 na presença de bicarbonato. A rodamina foi monitorada num espectrofotômetro e quantificada pelo seu coeficiente de extinção molar a 500 nm ($\epsilon_{500} = 7,88 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Wrona et al., 2005). Uma unidade de peroxidase foi definida como a quantidade de enzima que forma 1 μ mol de rodamina por min. As preparações de enzima apresentaram uma atividade específica por monômero de $30,6 \pm 0,2$ mU/mg (mg de proteína normalizado por conteúdo de cobre). O ajuste linear dos dados da fração de inibição da oxidação de DHR ($F/1-F$) versus a concentração do tempol que promoveu a inibição fornece a constante de velocidade de segunda ordem para a reação do tempol (k_{tempol}), conforme estabelecido pela equação abaixo (Winterbourn, 1987).

$$\frac{F}{(1-F)} k_{\text{DHR}} [\text{DHR}] = k_{\text{tempol}} [\text{tempol}] \quad \text{Equação (3.2.3)}$$

3.2.6.5 Consumo de H_2O_2

O consumo de H_2O_2 pela atividade peroxidásica da hSOD1 foi determinado enzimaticamente pelo método da o-dianisidina (Liochev e Fridovich, 2002). Alíquotas das incubações foram retiradas em diferentes intervalos de tempo e diluídas 10 vezes em um tampão de amostragem consistindo de fosfato (50 mM), o-dianisidina (0,3 mM, pré-dissolvido em HCl 0,001 M) e HRP (40 μ g/ml), em pH 7,4. H_2O_2 remanescente na incubação foi determinado espectrofotometricamente a 460 nm. Soluções padrões de H_2O_2 (Ogusucu et al., 2007; Toledo et al., 2011) foram empregadas para calibração.

3.2.6.6 Experimentos com captadores de spin

O método de captação de spin utilizando DMPO ou DBNBS foi empregado para o estudo da atividade na presença de bicarbonato e da formação de radicais centrados em proteínas, respectivamente. As misturas reacionais típicas foram incubadas com DMPO (50 mM) ou DBNBS (20 mM) (Medinas et al., 2007; Zhang et al., 2004). Basicamente, alíquotas das incubações (50 μ L) foram transferidas para um tubo capilar e os espectros adquiridos ao longo do tempo. Os espectros de EPR foram obtidos à temperatura ambiente ($25\pm 2^\circ\text{C}$), em um espectrômetro Bruker EMX equipado com uma cavidade de alta sensibilidade (Nakao et al., 2000). A quantificação dos sinais foi realizada como descrito no item 3.2.3.3. Demais condições experimentais estão descritas nas legendas das figuras.

3.2.6.7 Dimerização covalente da hSOD1

Após a incubação, catalase (100 μ g/mL) foi adicionada às misturas reacionais e alíquotas contendo 5 μ g de proteína foram ressuspensas em tampão de amostra

e submetidas à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (5% gel de empacotamento; 15% gel de resolução) a 150 V por 2 h. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose, usando sistema de transferência semi-seca da BioRad. A membrana foi bloqueada com 5% de leite desnatado em TBST por 2 h. A imunodeteção foi realizada usando anticorpo anti-hSOD1 (1:5000, 2 h). O anticorpo secundário anti-IgG de ovelha (diluição 1:5000) foi produzido em coelho.

3.2.6.8 Análise do consumo do tempol por EPR

A hSOD1 ou bSOD (30 μ M por monômero), H_2O_2 (1 mM), bicarbonato (25 mM), tempol (nas concentrações especificadas) e DTPA (0,1 mM) em tampão fosfato (50mM), pH7,4 foram incubadas a 37°C. Nos tempos especificados, as reações foram submetidas à análise por EPR seguida pela adição de catalase (100 μ g/mL) antes de uma segunda medida. Os espectros de EPR foram obtidos em temperatura ambiente (25 $\pm$ 2°C), em um espectrômetro Bruker EMX equipado com uma cavidade de alta sensibilidade (Nakao et al., 2000). A quantificação dos sinais foi realizada como descrito no item **3.2.3.3**. Demais condições experimentais estão descritas nas legendas das figuras.

3.2.6.9 Análise do consumo do tempol por HPLC-UV/Vis

Após a incubação, foi adicionada catalase (100 μ g/mL) e as amostras foram submetidas à ultracentrifugação (Microcon; corte de 5 kD; Millipore), para excluir hSOD1 e catalase. Quinze por cento de tempol foram perdidos durante a ultracentrifugação, possivelmente devido a interações inespecíficas com a membrana de acetato de celulose. O tempol residual foi ensaiado por HPLC-UV/Vis

e a separação cromatográfica foi realizada com coluna de fase reversa C18 reverse-phase (Luna Phenomenex, 250x3,0 mm, 5 μ m). A fase móvel continha acetato de sódio (100 mM) e metanol (20%) e o fluxo foi de 0,5 mL/min. As amostras foram analisadas por espectroscopia UV-Vis, usando um detector de arranjo de diodos (SPD-M20A, Shimadzu) (Monti et al., 2001). A quantificação do tempol foi feita pela integração do espectro do HPLC e cálculos baseados numa curva padrão de tempol. Demais condições experimentais estão descritas nas legendas das figuras.

3.2.6.10 Digestão da hSOD1 com tripsina e análise dos peptídeos por MALDI-ToF/ToF

Após a incubação, as amostras (50 μ g, 100 μ L) foram secas a vácuo (Savant). Em seguida, a proteína foi submetida a um tratamento desnaturante e redutor em tampão Tris-HCl (50 mM), pH 8,0, contendo DTPA (10 mM) e DTT (30 mM) sob tensão reduzida de O₂ por 4h a 37°C. Então, adicionou-se 150 mM de iodoacetato de sódio e incubou-se por mais 3h, a 37°C, ao abrigo da luz, para a alquilação de sulfidrilas livres. Depois da etapa de alquilação, a proteína foi lavada e concentrada por ultrafiltração (Amicon Ultra, corte de 3 kDa, Millipore) em água e, então, seca à vácuo. A digestão da hSOD1 foi efetuada em tampão 50 mM bicarbonato de amônio, pH 7,8, contendo cloreto de cálcio (2 mM), por 20 h, a 40°C, num volume final de 50 μ L. A relação hSOD1/tripsina empregada foi de 100 μ g/ μ g para todas as amostras (Medinas et al., 2009).

Os produtos de digestão foram diluídos 5 vezes em 5% ácido fórmico e misturados em igual volume com solução matrix para MALDI (10 volumes de acetona saturada com ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico, 1 volume de acetona com 20 mg/mL de nitrocelulose, 4 volumes de acetona e 5 volumes de 2-propanol). As

amostras (1,5 µL) foram transferidas para a placa de amostragem para MALDI (Bruker Daltonics) e analisadas com o uso de um espectrômetro de massas Ultraflex MALDI ToF/ToF com resolução de aproximadamente 500 Da. Os espectros de massas foram adquiridos como a soma dos sinais dos íons gerados pela irradiação do alvo com 500 pulsos de laser e submetidos à calibração interna de um único ponto usando os peptídeos de auto-hidrólise da tripsina de massa relativa de 804,9 Da. Os peptídeos foram selecionados numa faixa de massas de 500-3000 Da (Wright e English, 2003).

3.2.6.11 Detecção de hSOD1 desenovelada por ELISA

As formas desenoveladas da hSOD1 foram detectadas com um anticorpo conformacional específico (USOD), que reconhece resíduos 42-48 da hSOD1 pertencentes a um motivo de beta barril desenovelado (Rakhit et al., 2007; Kerman et al., 2010). Este anticorpo nos foi gentilmente cedido pelos Drs. Avjit Chakrabarty e Aaron Kerman, da Universidade de Toronto, Canadá. O padrão de hSOD1 desenovelada foi preparado pela dissolução de hSOD1 (30 µM por monômero) em hidrocloreto de guanidina (6 M) contendo DTT (2 mM) e EDTA (1 mM) e incubando-os à temperatura ambiente por 2 h. Ao final das incubações, as reações foram cessadas pela adição de catalase (100 µg/mL). Em seguida, alíquotas contendo hSOD1 e a hSOD1 desenovelada (50 ng de proteína/poço, 100 µL) foram adicionadas a placas de 96 poços e incubadas por 16 h. Em seguida, foram lavadas com PBS e, após bloqueio com BSA (1% em PBS) por 2 h, as placas foram incubadas como 100 µL/poço de USOD (1 µg/mL) por 2 h. Em seguida, foram incubadas com o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho produzido em ovelha conjugado com HRP, Calbiochem, 100 µL/poço de uma diluição de 1:5000) por 2 h.

TMB (420 μ M) e H_2O_2 (2 mM) em tampão acetato (0,1 M), pH 5,5, foram usados como substratos para a peroxidase. A reação foi parada pela adição de 100 μ L de uma solução de ácido sulfúrico (1 M). A oxidação do TMB foi determinada espectrofotometricamente a 450 nm. Anti-hSOD1 (1:3000) foi usado como controle da proteína total.

3.2.6.12 Experimento de espalhamento dinâmico de luz

As misturas reacionais contendo hSOD1 (60 μ M por monômero), bicarbonato (25 mM), tempol (60 μ M) em tampão fosfato (50 mM), pH 7,4, foram filtradas em filtros de 0,45 μ M de diâmetro. H_2O_2 (1 mM) foi adicionado para iniciar a reação, que foi incubada por 1 h a 37°C. Em seguida, catalase (0,1 U/mL, 10 nM) foi adicionada nas reações, que foram transferidas para cubetas de poliestireno (ZEN0040) e fechadas com parafilme para minimizar a evaporação. As medidas de espalhamento de luz foram realizadas usando Zetasizer Nano ZS (Malvern) e as leituras foram realizadas após 6 dias de incubação em estufa a 37°C. Os valores de espalhamento de luz são a média de três medidas, cada uma consistindo 11-15 acúmulos de 30 s. Os resultados representam a média de dois experimentos independentes.

3.3 Análises estatísticas

Todos os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão amostral. A significância estatística foi calculada com o teste *t* de Student ou, no caso de comparações múltiplas, com ANOVA de uma via e Tukey como pós-teste, usando o programa GraphPad 4.00. Os valores de IC_{50} foram determinados pelo ajuste hiperbólico retangular das curvas de dose-resposta usando regressão não-linear.

4 Resultados

4.1 Inibição da atividade clorinante da MPO por nitróxidos

4.1.1 Tempol e seus derivados hidrofóbicos inibem a cloração da taurina mediada pela MPO

A atividade clorinante da MPO (15 nM) na presença de cloreto (100 mM), taurina (15 mM) e H_2O_2 (50 μM) foi monitorada pelo consumo de H_2O_2 (Figura 4.1.1A) e pela formação de taurina cloramina (Figuras 4.1.1B e C). O consumo de H_2O_2 produziu taurina cloramina conforme esperado, onde um H_2O_2 gera um HOCl livre ou ligado à enzima (Tabela 4.1, Equações 4.1.1 e 4.1.2), que por sua vez oxida uma molécula de taurina a taurina cloramina (Kettle e Winterbourn, 1994). O tempol inibiu o consumo de H_2O_2 e a formação de taurina cloramina de maneira dependente de concentração e tempo (Figura 4.1.1). Estes resultados sugerem que o nitróxido inibe o sistema enzimático ao invés de reagir com HOCl livre. Em paralelo, experimentos controle também mostraram que o tempol (50 μM) não foi capaz de inibir a cloração da taurina (15 mM) promovida pelo HOCl (50 μM) em pH 7,4, pois a taurina cloramina foi detectada na quantidade esperada após 5 min de incubação.

Anteriormente, foi demonstrado que o HOCl oxida nitróxidos em meio ácido a seus cátions oxâmonio correspondentes (Dragutan e Mehlhorn, 2007; Lardinois et al., 2009), mas a cinética da reação não foi investigada. Nós empregamos EPR de fluxo interrompido para acompanhar o decaimento do sinal do tempol (5 mM) misturado com HOCl (5 mM) (Figura 4.1.2A). O decréscimo do sinal de EPR do tempol foi lento a pH 5,4 e ainda menor a pH 7,4 (Figura 4.1.2A). As constantes de velocidade de segunda ordem foram calculadas pela abordagem de velocidade inicial como $0,29 \pm 0,01$ e $0,054 \pm 0,002 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 5,4 e 7,4, respectivamente (Figura

4.1.2A). Portanto, mesmo em pH ácido, o tempol reage com HOCl lentamente indicando que ele não poderia agir como varredor do oxidante.

Figura 4.1.1. Inibição pelo tempol da cloração da taurina mediada pela MPO. A atividade clorinante da MPO foi monitorada pelo consumo de H_2O_2 (A) e formação de taurina cloramina (B-D). Em (A), (C) e (D), as reações continham MPO (15 nM), H_2O_2 (50 μM), taurina (15 mM), cloreto de sódio (100 mM), DTPA (0,1 mM) e as concentrações especificadas de tempol em tampão fosfato, pH 7,4. Em (B), as reações continham MPO (15 nM), H_2O_2 (50 μM), taurina (15 mM), cloreto de sódio (100 mM) e DTPA (0,1 mM) em tampão fosfato, pH 7,4, na ausência de tempol (O), na presença de tempol (50 μM) (□), e na presença de tempol (50 μM) e tirosina (50 μM) (Δ). Em (C), a % de inibição da formação de taurina cloramina pelas concentrações especificadas do tempol comparadas com o controle (ausência de tempol) são plotadas após 15 min (barras pretas) e 30 min (barras vazias) de incubação. Em (D), os dados para a incubação de 30 min (C) foram re-plotados para calcular o valor de IC_{50} , que foi determinado pelo ajuste hiperbólico retangular da curva de dose-resposta usando regressão não linear. Todas as incubações foram realizadas a 37°C e a MPO empregada foi adquirida da Alexis. A formação da cloramina foi quantificada pela reação com TNB conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.2.3.2). Os valores mostrados são a média $\pm$ desvio padrão obtidos de três experimentos independentes; * $p < 0,001$ (B) (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas) e (C) (teste t de Student).

No caso da cloração da taurina mediada por MPO, o tempol agiu cataliticamente já que seu espectro de EPR praticamente se manteve inalterado durante o tempo de incubação (Figuras 4.1.2B). Como o efeito inibitório do tempol foi

dependente do tempo, o valor de concentração que inibe 50% da atividade clorinante (IC_{50}) da MPO também foi tempo-dependente. De fato, os valores de IC_{50} de 1,8 e 3,5 μM foram calculados dependendo da % de inibição da velocidade inicial do consumo de H_2O_2 ou da quantidade de taurina cloramina formada aos 15 e 30 min, respectivamente (Figura 4.1.1D).

Os derivados do tempol, N3tempo, bztempo e tritempo (Figura 1.3.2), também inibiram a cloração da taurina de uma maneira tempo e concentração-dependente (Figura 4.1.3). Os valores de IC_{50} determinados após 15 min de reação foram similares àqueles determinados para tempol (IC_{50} 1,8 $\pm$ 0,1 μM) (Figura 4.1.1) (Augusto et al., 2009; Rees et al., 2009), isto é, bztempo (IC_{50} 1,3 $\pm$ 0,1 μM), N3tempo (IC_{50} 1,4 $\pm$ 0,1 μM) e tritempo (IC_{50} 1,5 $\pm$ 0,1 μM) (Figura 4.1.3). Os nitróxidos testados devem ter potenciais de redução similares já que possuem o mesmo grupo nitróxido (E° tempol = 0,84 V (Israeli et al., 2005)). Entretanto, de acordo com suas estruturas químicas (Figura 1.3.2), espera-se que suas lipofilicidades sejam consideravelmente diferentes, e isto foi confirmado pela determinação dos valores de log P conforme descrito em Materiais e Métodos (item **3.2.2**). Apesar das diferenças na lipofilicidade, tempol (log P = 0,44 $\pm$ 0,01), N3tempo (log P = 1,81 $\pm$ 0,01), bztempo (log P = 2,45 $\pm$ 0,01) e tritempo (log P = 2,78 $\pm$ 0,02) (Figura 1.3.2), todos os nitróxidos testados inibiram a atividade clorinante da MPO com valores de IC_{50} similares (Figura 4.1.3). Estes resultados discordam da possível interação de nitróxidos hidrofóbicos com o sítio de ligação de substratos aromáticos na cavidade distal da MPO (Hori et al., 1994). Nossos dados sugerem que o mecanismo de inibição da atividade clorinante da MPO pelos derivados do tempol seja o mesmo que o do tempol.

Tabela 4.1. Reações e constantes de velocidades discutidas no texto e empregadas na simulação cinética^a.

Número	Reação	$k_{4.1.x}$	Referência
4.1.1	$\text{MPO} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightleftharpoons \text{MPO-I} + \text{H}_2\text{O}$	$k_1=2,3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ $k_{-1}=58 \text{ s}^{-1}$	Marquez et al., 1994
4.1.2	$\text{MPO-I} + \text{Cl}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{MPO} + \text{HOCl}$	$k_2=2,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	Furtmüller et al., 1998
4.1.2a	$\text{MPO-I} + \text{Cl}^- \rightleftharpoons [\text{MPO-I-Cl}]$	$k_{2a}=2,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ $k_{-2a}=1,9 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$	Furtmüller et al., 2000
4.1.2b	$[\text{MPO-I-Cl}] \rightarrow \text{MPO} + \text{HOCl}$	$k_{2b}=5,2 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$	Furtmüller et al., 1998
4.1.2c	$\text{HOCl} + \text{Tau} \rightarrow \text{Tau-Cl} + \text{H}_2\text{O}$	$k_{2c}=4,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	Folkes et al., 1995
4.1.2d	$[\text{MPO-I-Cl}] + \text{Tau} \rightarrow \text{MPO} + \text{Tau-Cl}^b$	$k_{2d}=1,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	Ramos et al., 2007
4.1.5	$\text{MPO-I} + \text{TPNO}^\bullet \rightarrow \text{MPO-II} + \text{TPNO}^+$	$k_5=3,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	Este trabalho
4.1.6	$\text{MPO-II} + \text{TPNO}^\bullet \rightleftharpoons [\text{MPO-II-TPNO}^\bullet]$	$k_6=1,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ $k_{-6}=2,0 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$	Este trabalho
4.1.7	$[\text{MPO-II-TPNO}^\bullet] \rightarrow \text{MPO} + \text{TPNO}^+$	$k_7=3,6 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$	Este trabalho
4.1.10	$\text{TPNO}^+ + \text{H}_2\text{O}_2 \rightleftharpoons \text{TPNO}^\bullet + \text{O}_2^{\bullet-}$	$k_{10}=5,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ $k_{-10}=1,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	Goldstein et al., 2006a ^c
4.1.11	$\text{TPNO}^+ + \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{TPNO}^\bullet + \text{O}_2$	$k_{11}=3,4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	Goldstein et al., 2006b ^c
4.1.12	$\text{MPO-I} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{MPO-II} + \text{O}_2^{\bullet-} + 2\text{H}^+$	$k_{12}=8,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	Marquez et al., 1994

^aAs reações destacadas foram empregadas para simular os dados experimentais com o programa Gepasi 3.30. ^bTau-Cl é a abreviação de taurina cloramina. ^cAs constantes de velocidade de segunda ordem foram determinadas para o cátion oxamônio do tempo.

A dependência do tempo no efeito inibitório do tempol (Figura 4.1.1) e dos seus derivados (Figura 4.1.3) sugeriu que nitróxidos agem como inibidores reversíveis que desviam a MPO do ciclo clorinante. Isto ocorre quando MPO é direcionada para MPO-II pelo inibidor ao reagir rapidamente com MPO-I, mas lentamente com MPO-II (Malle et al., 2006; Davies et al., 2007). A tirosina reverte este tipo de inibição porque ela reage rapidamente com MPO-II ($k = 1,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Marquez e Dunford, 1995) e restabelece o *turnover* da MPO no ciclo clorinante (Tabela 4.1, Equações (4.1.1) e (4.1.2)). A tirosina anulou o efeito inibitório do tempol (Figura 4.1.1C) e dos outros nitróxidos (dados não mostrados), o que corrobora a visão de que o tempol desvia a MPO do ciclo clorinante. Entretanto, esta conclusão

não era consistente com as constantes de velocidade de segunda ordem que foram previamente determinadas para a reação do tempol com MPO-II ($k = 2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Vaz e Augusto, 2008) que foi comparável àquela determinada para tirosina (Marquez e Dunford, 1995). Reconhecendo alguns problemas naquele trabalho anterior, tais como o uso de baixas concentrações de MPO ($0,2 \text{ } \mu\text{M}$) e tempol ($2\text{-}10 \text{ } \mu\text{M}$), e o uso de uma MPO comercial cujo índice de pureza não era o melhor disponível ($A_{430}/A_{280} = 0,65$), nós decidimos reavaliar as constantes de velocidade de segunda ordem das reações do tempol com MPO-I e MPO-II com uma MPO altamente purificada ($A_{430}/A_{280} = 0,84$) e maiores concentrações iniciais da enzima ($0,6 \text{ } \mu\text{M}$). Enquanto estes experimentos estavam sendo realizados, Rees et al. (2009) mostraram que nitróxidos inibem a formação de HOCl mediada pela MPO monitorada pela oxidação da metionina e propuseram que o acúmulo de MPO-II era responsável pelo mecanismo inibitório. Embora já tivéssemos obtido resultados similares (Augusto et al., 2009), revisitar as cinéticas seria relevante para refinar o mecanismo proposto.

4.1.2 Estudo da cinética das reações do tempol com MPO-I e MPO-II

Experimentos de cinética de estado transiente foram realizados em um espectrofotômetro de fluxo interrompido no modo de mistura sequencial conforme descrito em Materiais e Métodos (item **3.2.3.5**) (Marquez et al., 1990; 1994; Marquez e Dunford, 1995). A reação do tempol ($6\text{-}200 \text{ } \mu\text{M}$) com MPO-I, pré-formada pela incubação de MPO ($0,6 \text{ } \mu\text{M}$) com H_2O_2 ($12 \text{ } \mu\text{M}$) por 20 ms, foi acompanhada pela formação de MPO-II em 456 nm. A cinética típica de pseudo-primeira ordem foi observada para cada concentração do tempol (Figura 4.1.4, inserto). O gráfico dos

valores de k_{obs} obtidos *versus* a concentração do tempol forneceu uma linha reta, cuja inclinação corresponde à constante de velocidade de segunda ordem da reação do tempol com MPO-I ($k_{4.1.5} = (3,5 \pm 0,5) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, pH 7,4, 25°C) (Figura 4.1.4; Tabela 4.1, Equação (4.1.5)). Este valor confirmou que o tempol é um bom substrato para MPO-I (Vaz e Augusto, 2008).

Figura 4.1.2. O tempol reage lentamente com HOCl e é marginalmente consumido durante a cloração mediada pela MPO. (A) O decaimento do pico central do sinal de EPR do tempol com o tempo após a mistura das soluções de tempol (5 mM) e HOCl (5 mM) em tampão acetato, pH 5,4, ou fosfato, pH 7,4, a 25°C. Os espectros mostrados são representativos do espectro em pH 5,4 em 0 min (espectro da esquerda) e 15 min (espectro da direita). (B) O sinal de EPR de tempol em incubações de tempo diferentes numa mistura reacional contendo MPO (15 nM), H_2O_2 (50 μM), taurina (15 mM), cloreto de sódio (100 mM), DTPA (0,1 mM) e tempol (1 μM) em tampão fosfato, pH 7,4. A reação foi realizada a 37°C, e a MPO empregada foi adquirida da Alexis. Os espectros são representativos de três experimentos independentes. As condições instrumentais foram: potência de microondas, 20 mW; amplitude de modulação, 1 G; constante de tempo, 327 ms; velocidade de varredura, 0,29 G/s.

Figura 4.1.3. Inibição da cloração da taurina da MPO pelos nitroxídeos. As reações continham MPO (15 nM), H_2O_2 (50 μM), taurina (15 mM), cloreto de sódio (100 mM), DTPA (0,1 mM) e as concentrações especificadas de tritempo (A), bztempo (B) ou tritempo (C) em tampão fosfato, pH 7,4. A porcentagem de inibição da formação da taurina cloramina pela concentração especificada de nitroxido comparada com o controle (na ausência de nitroxido) é plotado após 5 min (barras vazias), 15 min (barras pretas) e 30 min (barras cinzas) de incubação. Todas as incubações foram realizadas a 37°C. Em (D), os dados obtidos para tritempo (C) após 15 min de incubação) foram re-plotados para calcular o valor de IC_{50} , que foi determinado pelo ajuste hiperbólico retangular da curva de dose-resposta usando regressão não linear. A MPO empregada foi adquirida da Alexis. Os valores mostrados são a média $\pm$ desvio padrão obtidos de três experimentos independentes; * $p < 0,01$ e ** $p < 0,05$, ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas.

Figura 4.1.4. Determinação da constante de velocidade de segunda ordem da reação do ttempol e MPO-I. As constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem (k_{obs}) foram determinadas após a pré-mistura da MPO (0,6 μM) com H_2O_2 (12 μM) em tampão fosfato 50 mM, pH 7,4, at 25°C. após um tempo de espera de 20 ms, a MPO-I formada foi permitida reagir com concentrações variadas de ttempol em tampão fosfato 50 mM, pH 7,4. O curso da reação foi monitorado ao longo do tempo em 456 nm, e o inserto mostra traços típicos obtidos na ausência e presença de ttempol (50 μM) (linhas pretas) e o ajuste da curva (linha cinza). A MPO empregada foi adquirida da Planta Natural Products. A constante de velocidade de segunda ordem foi calculada da inclinação usando análise de regressão linear dos mínimos quadrados. Os valores mostrados são a média $\pm$ desvio padrão obtidos de três experimentos independentes.

No caso da MPO-II, a reação com tempol não seguiu uma cinética simples de segunda-ordem (Figura 4.1.5A). Em cada concentração do tempol (6-200 μM), o decaimento da MPO-II em 456 nm mostrou uma típica cinética de pseudo-primeira ordem após uma fase inicial tardia (Figura 4.1.5A, inserto). A fase lenta é devida ao ciclo da enzima porque a formação de MPO-II requer excesso de H_2O_2 ou excesso de H_2O_2 mais ácido homovanílico (Jantschko et al., 2005). Todos os dados cinéticos mostrados na Figura 4.1.5 foram obtidos com MPO-II produzida da pré-incubação de MPO (0,6 μM) com H_2O_2 (6 μM) e ácido homovanílico (0,55 μM), mas essencialmente os mesmos resultados são obtidos quando MPO-II foi produzida somente pela pré-incubação de MPO com H_2O_2 (Materiais e Métodos, item 3.2.3.5). Em ambos os casos, o gráfico de k_{obs} versus tempol foi uma hipérbole retangular (Figura 4.1.5A). Este comportamento de saturação indica a formação de um complexo entre tempol e MPO-II que, por sua vez, decai para cátion oxamônio e MPO nativa. Este processo pode ser descrito pelas equações abaixo (Equações (4.1.6)-(4.1.7)), que permitem o cálculo das constantes de velocidades envolvidas (Marquez et al., 1990).

$$k_{\text{obs}} = (k_{4.1.7} \times [\text{TPNO}^\bullet]) / (K + [\text{TPNO}^\bullet]) \quad \text{Equação (4.1.8)}$$

$$K = ([\text{MPO-II}] \times [\text{TPNO}^\bullet]) / [\text{MPO-II-TPNO}^\bullet] = k_{4.1.6} / k_{4.1.7} \quad \text{Equação (4.1.9)}$$

Os valores de $k_{4.1.7}$ ($(3,6 \pm 0,2) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$) e K ($(2,04 \pm 0,1) \times 10^{-5} \text{ M}$) foram calculados diretamente da Equação 4.1.8 usando o ajuste dos dados por regressão não linear dos mínimos quadrados (Figura 4.5A). Em concentrações baixas do

tempol, o gráfico de k_{obs} *versus* concentração do tempol foi linear (Figura 4.5B), e uma constante de velocidade de segunda ordem aparente foi obtida da inclinação ($k_{4.1.6} = (1,00 \pm 0,03) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Pela substituição dos valores calculados de $k_{4.1.6}$ e K na Equação (4.1.9), o valor de $k_{-4.1.6}$ foi calculado como $(2,04 \pm 0,02) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Figura 4.1.5. Determinação das constantes cinéticas da reação do tempol com MPO-II. (A) As constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem (k_{obs}) foram determinadas após pré-mistura da MPO (0,6 μM) com H_2O_2 (6 μM) e ácido homovanílico (0,55 μM) em tampão fosfato 50 mM, pH 7,4, a 25°C. Após um tempo de espera de 40 s, a MPO-II formada foi permitida reagir com concentrações variadas do tempol em tampão fosfato 50 mM, pH 7,4. O curso da reação foi monitorado ao longo do tempo em 456 nm, e o inserto mostra traços típicos obtidos na ausência e presença do tempol (50 μM) (linhas pretas) e ajuste da curva (linha cinza). A MPO empregada foi adquirida da MPO da Planta Natural Products. A figura é o ajuste não linear dos mínimos quadrados dos dados. (B) Re-plotagem de (A) na região de concentração baixa de tempol permitiu o cálculo das constantes de velocidade de segunda ordem da inclinação da reta. Os valores mostrados são a média $\pm$ desvio padrão obtidos de três experimentos independentes.

No trabalho anterior do nosso grupo, as concentrações de tempol empregadas estavam na porção linear do plot de k_{obs} *versus* concentração do tempol

(Figura 4.1.5A), antecipando uma constante de velocidade de segunda-ordem em torno do valor determinado aqui ($\sim 1,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Entretanto, o valor previamente determinado foi cerca de dez vezes maior como o foi no caso da reação do tempol e MPO-I (Figura 4.1.4) (Vaz e Augusto, 2008). Algumas diferenças nestes valores devem ser atribuídas a erros associados com as condições experimentais empregadas, incluindo baixas concentrações de uma preparação de MPO menos pura. Outros artefatos poderiam também contribuir para as diferenças, mas nós não fomos capazes de identificá-los. Contudo, nós estamos seguros dos valores determinados aqui porque eles foram determinados várias vezes e são consistentes com os efeitos inibitórios do tempol sobre a atividade clorinante da MPO.

4.1.3 Mecanismo de inibição

Para determinar os detalhes mecanísticos da inibição pelo tempol da atividade clorinante da MPO, realizamos experimentos com maiores concentrações da MPO para monitorar os intermediários da MPO durante o ciclo catalítico da enzima (Figuras 4.1.6 e 4.1.7). Em reações contendo MPO ($0,5 \mu\text{M}$), H_2O_2 ($50 \mu\text{M}$), cloreto ($0,1 \text{ M}$) e taurina (15 mM), o H_2O_2 foi consumido em menos de 1 s na ausência do tempol e em cerca de 10 min na presença de $50 \mu\text{M}$ do tempol (Figura 4.1.7B). Praticamente nenhuma alteração no espectro visível da MPO foi detectada na ausência do tempol porque a reação é muito rápida para ser monitorada por espectrofotometria convencional (Figura 4.1.6A). Consequentemente, H_2O_2 foi rapidamente consumido para produzir uma quantidade equimolar de taurina cloramina (Figura 4.1.7C) e a MPO nativa foi recuperada (aproximadamente 98%) (Figura 4.1.6A).

Figura 4.1.6. Intermediários da MPO e produtos monitorados pela absorção em UV-Vis. A variação do espectro visível da MPO com o tempo em reações contendo (0,5 μM), H₂O₂ (50 μM), cloreto de sódio (100 mM), taurina (15 mM) e DTPA (0,1 mM) em tampão fosfato 50 mM, pH 7,4, na ausência (A) e na presença do tempol (50 μM) (B). (C) O mesmo que em (B) acompanhando em 430 nm para monitorar a recuperação da MPO após sucessivas adições de H₂O₂ (50 μM). (D) Espectro da MPO (0,5 μM) antes e após 5 min da adição do cátion oxamônio do tempo (TPNO⁺) (1 μM). As reações foram realizadas a 30°C, e a MPO empregada foi adquirida da Planta Natural Products.

Na presença do tempol, intermediários da MPO que têm espectros no visível praticamente indistinguíveis daqueles da MPO-II ($\text{Abs}_{625\text{nm}}/\text{Abs}_{456\text{nm}} = 0,17$) (Hoogland et al., 1987) acumularam durante o estado estacionário e rapidamente decaíram para MPO quando H₂O₂ foi consumido (Figuras 4.1.6B e 4.1.7A). A adição de hSOD1 (250 U/mL) não alterou o estabelecimento ou término do estado estacionário descartando o envolvimento da MPO-III (Hampton et al., 1998). MPO foi parcialmente recuperada após o ciclo catalítico (aproximadamente 85%) (Figura 4.1.6B), sugerindo que parte do cátion oxamônio formado reage com a enzima (Dragutan e Mehlhorn, 2007; Lardinois et al., 2009). Isto foi confirmado pelas adições

sucessivas de 50 μM do H_2O_2 nas misturas reacionais residuais porque a concentração de MPO diminuiu após cada ciclo, e a reação se tornou mais lenta (Figura 4.1.6C). Na ausência do tempol, MPO foi reciclada três vezes com o mínimo de perda de sua atividade (<5%). Confirmamos a existência desta reação paralela ao mostrar que a adição do cátion oxamônio de tempo (1 μM) pré-formado a MPO (0,5 μM) promoveu mudanças no espectro no UV e visível da enzima (Figura 4.1.6D). Este resultado está em acordo com estudos anteriores que mostraram que o cátion oxamônio do tempo reage com o grupo heme e resíduos de aminoácidos da mioglobina (Lardinois et al., 2009). Tempo é o análogo não hidroxilado do tempol, cujo cátion oxamônio é mais estável do que o derivado do tempol, portanto, mais recomendando para estes estudos (Goldstein et al., 2006). As reações do cátion oxamônio do tempol com MPO pode também explicar porque a tirosina não reverte completamente o efeito inibitório do tempol (Figura 4.1.1B). Entretanto, a reação com o cátion oxamônio é um processo marginal na inibição da atividade clorinante da MPO pelo tempol, tornando-se importante somente após diversos ciclos catalíticos (Figura 4.1.6C). Então, a inibição da MPO pelo tempol é praticamente um processo reversível que resulta da acumulação de intermediários da MPO que geralmente decaem de volta para MPO quando H_2O_2 é totalmente consumido (Figuras 4.1.6B, 4.1.6C e 4.1.7A). Em concordância, os dados experimentais (Figura 4.1.7, linhas pretas ou símbolos) foram modelados por simulação cinética com o programa Gepasi 3.30 (Figura 4.1.7, linhas cinzas) (Mendes, 1997) considerando as condições experimentais, as constantes de velocidade determinadas aqui para as reações do tempol com MPO-I e MPO-II, e as reações e constantes de velocidades pertinentes disponíveis na literatura (Tabela 4.1, reações destacadas) (Marquez et al., 1994;

Folkes et al., 1995; Furtmüller et al., 1998, 2000; Goldstein et al., 2006; Ramos et al., 2007).

Figura 4.1.7. Modelagem cinética da inibição pelo tempol da cloração da taurina mediada pela MPO. Formação tempo-dependente dos intermediários da MPO em 456 nm (A), consumo de H_2O_2 (B), formação da taurina cloramina (C) e consumo do tempol (D) nas reações contendo MPO (0,5 μM), H_2O_2 (50 μM), cloreto de sódio (100 mM), taurina (15 mM), DTPA (0,1 mM) e tempol (50 μM) em tampão fosfato 50 mM, pH 7,4; tempol estava ausente quando especificado. As linhas pretas e símbolos correspondem aos dados experimentais, e as linhas cinzas correspondem a simulação cinética com o programa Gepasi 3.30 empregando as reações e constantes cinéticas destacadas na Tabela 4.1. As incubações foram realizadas a 30°C, e a MPO empregada foi adquirida da Planta Natural Products.

4.2 Efeito de nitróxidos sobre a inflamação aguda induzida pela carragenina em patas de ratos

4.2.1 Atenuação do edema nas patas dos ratos induzido pela carragenina

Foi demonstrado que nitróxidos inibem a atividade clorinante da MPO *in vitro* (Figuras 4.1.1 e 4.1.3, Augusto et al., 2009; Rees et al., 2009) e em neutrófilos ativados (Rees et al., 2009). Portanto, mais estudos sobre suas ações como antioxidantes e moduladores enzimáticos em modelos animais eram relevantes (Cuzzocrea et al., 2004; Wilcox e Pearlman, 2008; Augusto et al., 2008; Rees et al., 2009; Tshako et al., 2010; Wilcox, 2010). Portanto, selecionamos a inflamação aguda induzida por carragenina em patas de ratos esperando obter informações sobre a habilidade de nitróxidos modularem a atividade da MPO e o consequente dano oxidativo *in vivo*.

Apesar de inibirem a atividade clorinante da MPO *in vitro* (Figuras 4.1.1 e 4.1.3) de forma similar, o tempol e seus derivados hidrofóbicos, N3tempol, bztempol e tritempol (Figura 1.3.2), poderiam apresentar diferentes efeitos em um modelo animal já que a partição e o metabolismo dos compostos estariam operantes. Os nitróxidos testados (0,17 mmol/kg) (Figura 1.3.2) reduziram significativamente o edema da pata induzido pela carragenina (Figura 4.2.1). Experimentos controle mostraram que os efeitos inibitórios dos nitróxidos foram comparáveis àqueles de drogas anti-inflamatórias clássicas, tais como indometacina (10 mg/kg; 0,028 mmol/kg) e colchicina (2 mg/kg; 0,005 mmol/kg) que inibiram 75% e 63% do edema de pata, respectivamente, 3 h após a administração da carragenina (dados não mostrados). Tempol foi o nitróxido menos eficiente, e seu efeito inibitório praticamente não se alterou com o tempo após a administração de carragenina (1,5, 3,0, 4,5 ou 6 h) (Figura 4.2.1A). Este resultado está de acordo com um estudo fenomenológico

previamente publicado que abordou o efeito do tempol no mesmo modelo de inflamação (Khattab, 2006). Em tempos iniciais, o nitróxido mais eficiente foi o tritempo, porém seu efeito inibitório diminuiu em tempos mais longos, tornando-se similar aos dos outros nitróxidos após 6 h da administração da carragenina (Figura 4.2.1A). De fato, ocorreu uma boa correlação entre o efeito inibitório do nitróxido e o log P em todos os tempos, exceto às 6 h (por exemplo, Figura 4.2.1B e C). Provavelmente, este comportamento é devido ao fato de que a absorção e o transporte de uma droga em modelos animais geralmente se correlacionam com o log P (Lin e Lu, 1997). Portanto, mais rápidos transporte e absorção do tritempo devem ser responsáveis por um efeito inibitório significativamente maior que do tempol após 3 h da administração da carragenina (Figura 4.2.1A). De fato, análises por EPR dos homogenatos das patas dos ratos tratados com o tritempo e sacrificados 3 h após a administração da carragenina mostraram uma concentração total de nitróxido (nitróxido mais hidroxilamina) maior do que aquelas dos ratos tratados com o tempol (cerca de 4 e 2 μM , respectivamente) (Figura 4.2.1C). Seis horas após a administração de carragenina ambos nitróxidos e seus derivados hidroxilamina foram praticamente não detectáveis (Figura 4.2.1C), indicando que foram metabolizados para produtos inativos do ponto de vista redox (Borisenko et al., 2004; Augusto et al., 2008; Lam et al., 2008; Goldstein et al., 2008).

Figura 4.2.1. Inibição pleo nitróxidos do edema da pata em ratos induzido pela carragenina. A) Tempol (~), N3tempo (Δ), bztempo (Λ), tritempo ($\square$) ou DMSO ($\circ$) foram administrados i.p. 15 min antes da injeção intraplantar de carragenina (100 μ L de 1% carragenina diluída em salina) na pata traseira esquerda dos ratos. Nos tempos especificados, a espessura da pata foi medida com um paquímetro. Os valores mostrados são a média $\pm$ desvio padrão obtidos de experimentos com 4 animais diferentes; * $p < 0,001$, ANOVA de uma via com Tukey como pós-teste para comparações múltiplas. A porcentagem de inibição do edema da pata induzido pela carragenina pelos nitróxidos testados após 3 (B) e 6 h (C) da administração da carragenina plotado contra o valor de log P de cada nitróxido. Os coeficientes de correlação (r) foram significantes ao nível de 1% pelo teste t (uma só cauda). D) Os níveis representativos dos nitróxidos (barras pretas) e nitróxidos mais hidroxilamina (barras vazias) nas patas dos ratos tratados com carragenina e tempol ou tritempo nos especificados tempos determinados por análise de EPR. O inserto mostra um espectro de EPR representativo obtido após a adição de ferricianeto (1 mM) nos homogenatos das patas do rato tratado com o tritempo 3 h após a administração de carragenina. As condições instrumentais foram: potência de microondas, 20 mW; amplitude de modulação, 1,0 G; constante de tempo, 327 ms; velocidade de varredura, 0,29 G/s.

4.2.2 Atenuação da oxidação e nitratação de proteínas e dos níveis de MPO nas patas dos ratos

O primeiro grupo de animais foi sacrificado após 6 h da administração de carragenina e os homogenatos dos músculos das patas dos ratos analisados quanto

a presença de MPO e de proteínas oxidadas e nitradas. Os experimentos de *Dot-blot* mostraram consideráveis níveis de proteínas contendo resíduos de 3-nitrotirosina (1,9 nmol/mg) (Figura 4.2.2A) e metionina sulfóxido (Figura 4.2.2B) como esperado para a resposta inflamatória induzida pela carragenina (Cuzzocrea et al., 1999). Todos os nitróxidos testados reduziram os níveis de proteínas modificadas em cerca de 50% (Figura 4.2.2). Similarmente, os nitróxidos diminuíram os níveis de MPO nos homogenatos das patas dos ratos para aproximadamente 40% (em média) dos valores do controle (Figura 4.2.3C). Em paralelo, as atividades peroxidásica (Figura 4.2.3A) e clorinante (Figura 4.2.3B) encontraram-se reduzidas em 50% dos valores dos animais que somente receberam carragenina. Nós monitoramos ambas as atividades porque muitas proteínas como hemoglobina e mioglobina também apresentam atividade peroxidásica, enquanto que a atividade clorinante é específica para a MPO. Nós tentamos detectar os níveis de proteínas contendo resíduos de 3-clorotirosina nos homogenatos das patas por UPLC/ESI/MS (adaptado de Orhan et al., 2004; Chen et al., 2010). Entretanto, os níveis de 3-clorotirosina nos homogenatos das patas aparentemente foram menores do que o limite de detecção do método (100 fmol) (Figura 4.2.4). Coletivamente, estes resultados indicam que o edema, os níveis de MPO, a atividade de MPO e os níveis aumentados de proteínas oxidadas e nitradas são eventos inter-relacionados que ocorrem durante a inflamação induzida pela carragenina. Adicionalmente, estes resultados demonstram que, após 6 h da administração da carragenina, todas as respostas foram inibidas de forma similar pelos nitróxidos testados.

Figura 4.2.2. Inibição pelos nitróxidos da nitração e oxidação de resíduos de proteína nos homogenatos das patas dos ratos após 6 h de inflamação. Os níveis de proteínas nitradas (A) e oxidadas (B) nos homogenatos das patas dos ratos após 6 h da administração de carragenina obtida de ratos não tratados e tratados com nitróxidos. Os homogenatos (5 µg de proteína) foram aplicados numa membrana de nitrocelulose através de um sistema de *Dot blot*, corado com Ponceau S e revelado com um anticorpo contra resíduos de 3-nitrotirosina (A) ou metionina sulfóxido (B), conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.2.4.4). A nitração de proteína foi semi quantificada pela comparação com um padrão de BSA nitrada com peroxinitrito, já o conteúdo de metionina sulfóxido foi normalizado como porcentagem de um controle de carragenina. Os inserts são representativos de quatro experimentos independentes. As abreviações se referem a: -Car, animal não tratado; Car, animal tratado com carragenina; Ind, Car + indometacina; Tpl, Car + tempol; N3t, Car + N3tempo; Bzt, Car + bztempo; Tri, Car + tritempo; Alb-, 5 µg de BSA; e Alb+ 5 µg de BSA contendo 5 pmol de nitrotirosina. Os valores mostrados são a média ± desvio padrão obtidos de três experimentos com 4 animais diferentes; *p<0,01 e **p<0,05, ANOVA de uma via com Tukey como pós-teste para comparações múltiplas.

Figura 4.2.3. Os nitróxidos inibem a migração de neutrófilos induzida pela carragenina para a pata do rato após 6 h de inflamação. Os níveis de atividade peroxidásica (A), clorinante (B) e da proteína MPO (C) nos homogenatos das patas 6 h após a administração de carragenina obtidos dos ratos não tratados e tratados com nitróxidos. As análises e quantificações foram realizadas conforme descrito em Materiais e Métodos (itens 3.2.4.8-10). Os valores mostrados são a média $\pm$ desvio padrão obtidos de experimentos com 4 animais diferentes. Para quantificação dos níveis de MPO (C), a MPO humana comercial (400 ng) foi usada como padrão (inserto, primeira linha) e o limite de detecção do anticorpo anti-MPO foi determinado de aproximadamente 30 ng. * $p < 0,01$, ANOVA de uma via com Tukey como pós-teste para comparações múltiplas. O inserto representa um experimento representativo.

Figura 4.2.4. Investigação por LC-MS de 3-clorotirosina em homogenatos de patas de rato submetidos a edema por carragenina. As proteínas do músculo subplantar dos ratos (1 mg) foram processadas conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.2.4.5). Em seguida, o hidrolisado foi submetido à análise de UPLC/MS. Tirosina, 3-clorotirosina e 3-cloro $^{13}\text{C}_6$ tirosina foram monitoradas pelos íons em m/z 182, m/z 216, m/z 222, respectivamente. Cromatograma do íon extraído A) m/z 182, B) m/z 216 e C) m/z 222. Os inserts representam os espectros de massas das regiões de 12,8 a 13,2 min em A) e da região de 20,9 a 21,3 min em C). Os cromatogramas e espectros são representativos de experimentos com 4 animais diferentes

Como uma correlação entre a lipofilicidade do nitróxido e a inibição do edema da pata foi mantida em todos os tempos exceto às 6 h (compare as Figuras 4.2.1B e C), foi importante comparar os efeitos inibitórios dos nitróxidos em tempos mais iniciais. Para tal, selecionamos os dois nitróxidos que mais diferem em lipofilicidade,

o tempol e tritempo (Figura 1.3.2), e o tempo de 3 h porque o edema da pata aparentemente alcançou o máximo nesse tempo (Figura 4.2.1A). Saturações aparentes também foram observadas para os níveis de proteínas nitradas (2,2 e 1,9 nmol/mg às 3 e 6 h, respectivamente) (Figuras 4.2.1A e 4.2.5A), níveis de atividade clorinante (8,2 U/mg e 9,3 U/mg às 3 e 6 h, respectivamente) (Figuras 4.2.3B e 4.2.6B) e níveis de MPO (138 e 169 ng às 3 e 6 h, respectivamente) (Figuras 4.2.3C e 4.2.6C). No caso de animais também tratados com o tempol ou tritempo, o edema foi inibido em 41% e 74%, respectivamente, 3 h após a administração de carragenina (Figura 4.2.1A). Similarmente, houve diferenças significativas na redução da maioria dos parâmetros inflamatórios pelo tempol e tritempo. Por exemplo, os níveis de 3-nitrotirosina foram inibidos em 41% ou 58% (Figura 4.2.5A), as atividades peroxidásica e clorinante em 27% ou 52% (Figura 4.2.6A e B) e os níveis de MPO em 46% ou 62%, respectivamente (Figura 4.2.6C). Portanto, o tritempo foi aproximadamente 1,6 vezes mais eficiente que o tempol em inibir a maioria dos indicadores inflamatórios 3 h após a administração da carragenina. Em paralelo, nesse tempo, a concentração total de tritempo nas patas dos ratos foi aproximadamente 2 vezes maior que a do tempol (Figura 4.2.1D).

4.2.3 Redução da carbonilação de proteínas e da exsudação nas patas de ratos induzidas pela carragenina

O nível de proteínas oxidadas presentes nas patas dos ratos conforme determinado pela imuno-quantificação de resíduos de metionina sulfóxido (Figuras 4.2.2B e 4.2.5B) foi o único índice que consideravelmente desviou dos outros indicadores usados para monitorar a resposta inflamatória à carragenina e sua modulação pelos nitróxidos após 3 e 6 h. Além disso, o efeito inibitório do tempol e

tritempo sobre os níveis de metionina sulfóxido foram significativamente diferentes às 6 h, mas foram similares às 3 h, em contraste com a tendência que foi observada nos outros índices monitorados. Esta discrepância pode ser causada por artefatos oriundos da susceptibilidade de resíduos de metionina à oxidação (Levine et al., 2000), embora tenhamos adicionado metionina (50 mM) durante a preparação dos homogenatos para minimizar oxidações *ex-vivo*. Para esclarecer este ponto, também monitoramos a oxidação de proteínas pelos níveis de proteínas carboniladas detectados por marcação com FTC e separação por SDS-PAGE (Figura 4.2.7A). Os níveis de proteínas carboniladas normalizadas pelo conteúdo total de proteína aumentaram aproximadamente 3,5 vezes em resposta à carragenina e foram similares 3 e 6 h após sua administração (Figura 4.2.7C). Ambos, o tempol e tritempo, inibiram a carbonilação de proteínas em 50% 3 h após a administração da carragenina, mas os efeitos inibitórios foram aparentemente atenuados para aproximadamente 28% após 6 h. Estes dados de quantificação relativa dos níveis de proteínas oxidadas (Figuras 4.2.2B, 4.2.5B e 4.2.7C) sugerem que, 3 h após a administração da carragenina, as proteínas oxidadas provavelmente começaram a ser mobilizadas para reparo, no caso da oxidação da metionina (Levine et al., 2000; Moskovitz et al., 2001), ou para degradação, no caso da carbonilação (Nyström, 2000). A variabilidade nos níveis de proteínas oxidadas também resultaria das consideráveis mudanças no perfil das proteínas presentes nos homogenatos em resposta à carragenina, conforme evidenciado pelo gel de SDS-PAGE corado com azul de coomassie (Figura 4.2.7B). Em resposta à carragenina, ocorreu uma diminuição relativa nas bandas de proteínas na região de 37-25 kDa e um aumento nas bandas na região de 70 kDa. Como o dano oxidativo em proteínas depende da

estrutura da proteína e do oxidante gerado (Vaz et al., 2009; Hawkins e Davies, 2001), mudanças no perfil de proteínas podem influenciar suas oxidações.

O aumento pronunciado da banda protéica na região de 70 kDa nos homogenatos das patas dos ratos em resposta à carragenina (Figura 4.2.7B) indicam exsudação plasmática, com a albumina passando a ser o principal alvo de carbonilações (Figura 4.2.7A) (Rogers et al., 1989; Baraniuk et al., 2005). Esta conclusão foi confirmada pela comparação dos géis 2D de homogenatos obtidos de animais controles e tratados com carragenina (Figura 4.2.7D). A excisão, hidrólise com tripsina e análise de MS da banda pronunciada a aproximadamente 70 kDa e de pI 6,1 foi identificada como albumina de soro de rato (peptídeos encontrados, 17; cobertura, 24%; *score*, 661).

Figure 4.2.5. Inibição da nitração e oxidação de resíduos de proteína nos homogenatos das patas dos ratos pelo tempol e tritempo, após 3 h de inflamação, é dependente de suas lipofilicidades. Os níveis de proteínas nitradas (A) e oxidadas (B) nos homogenatos das patas dos ratos após 3 h da administração de carragenina obtida de ratos não tratados e tratados com nitróxidos. Os homogenatos (5 µg de proteína) foram aplicados numa membrana de nitrocelulose através de um sistema de *Dot blot*, corado com Ponceau S e revelado com um anticorpo contra resíduos de 3-nitrotirosina (A) ou metionina sulfóxido (B), conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.2.4.4). A nitração de proteína foi semi quantificada pela comparação com um padrão de BSA nitrada com peroxinitrito, já o conteúdo de metionina sulfóxido foi normalizado como porcentagem de um controle de carragenina. Os inserts são representativos de quatro experimentos independentes. As abreviações se referem a: -Car, animal não tratado; Car, animal tratado com carragenina; Ind, Car + indometacina; Tpl, Car + tempol; N3t, Car + N3tempo; Bzt, Car + bztempo; Tri, Car + tritempo; Alb-, 5 µg de BSA; e Alb+ 5 µg de BSA contendo 5 pmol de nitrotirosina. Os valores mostrados são a média ± desvio padrão obtidos de três experimentos com 4 animais diferentes; *p<0,01 e **p<0,05, ANOVA de uma via com Tukey como pós-teste para comparações múltiplas.

Figura 4.2.6. O tempol e tritemol inibem a migração de neutrófilos induzida pela carragenina para a pata do rato, após 3 h de inflamação, dependente de suas lipofilicidades. Os níveis de atividade peroxidásica (A), clorinante (B) e da proteína MPO (C) nos homogenatos das patas 3 h após a administração de carragenina obtidos dos ratos não tratados e tratados com nitróxidos. As análises e quantificações foram realizadas conforme descrito em Materiais e Métodos (itens 3.2.4.8-10). Os valores mostrados são a média $\pm$ desvio padrão obtidos de experimentos com 4 animais diferentes. Para quantificação dos níveis de MPO (C), a MPO humana comercial (150 ng) foi usada como padrão (inserto, primeira linha) e o limite de detecção do anticorpo anti-MPO foi determinado de aproximadamente 30 ng. * $p < 0,01$ e ** $p < 0,05$, ANOVA de uma via com Tukey como pós-teste para comparações múltiplas. O inserto representa um experimento representativo.

Figura 4.2.7. O tempol e tritono inibem a exsudação plasmática e a carbonilação de proteínas nos homogenatos das patas. Os níveis de proteínas carboniladas nos homogenatos das patas dos ratos 6 h e 3 h após a administração de carragenina obtidos de ratos não tratados e tratados com nitróxidos (A-C). As proteínas carboniladas usando SDS-PAGE de uma dimensão marcadas com FTC (A) e azul de coomassie (B). Para determinação da carbonilação de proteínas, homogenatos (1 mg/mL de proteína, 50 µL) foram incubados FTC (1 mM) e foram processados conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.2.4.6). A imagem da proteína fluorescente (A) no gel foi capturada, e então, o gel foi corado com azul de coomassie (B). C) A fluorescência da proteína carbonilada foi normalizada com o conteúdo de proteína de cada linha. Os valores mostrados são a média ± desvio padrão obtidos de experimentos com 4 animais diferentes. * $p < 0,01$, ANOVA de uma via com Tukey como pós-teste para comparações múltiplas. D) Porção representativa do gel de SDS-PAGE de segunda dimensão de homogenatos de ratos controle ou tratados com carragenina conforme especificado. A banda pronunciada nos ratos tratados foi identificada como albumina de soro de rato por proteólise e análise de MS, como descrito no texto.

4.2.4 A atividade catalítica da MPO tem um papel no desenvolvimento do edema

Recentemente, foi demonstrado que a MPO atua como mediadora da migração e da sobrevivência de neutrófilos *in vitro* e *in vivo* (Lau et al., 2005; Kebir et al., 2011; Klinke et al., 2011). Por outro lado, nossos resultados indicam que os nitróxidos inibiram a migração de neutrófilos para o sítio inflamatório já que inibiram os níveis locais de MPO (Figuras 4.2.3 e 4.2.6). Todavia, não estava claro se havia alguma relação entre a atividade da MPO e a inflamação induzida pela carragenina em patas de ratos. Nesse contexto, resolvemos avaliar o efeito de um inibidor potente e irreversível da MPO *in vitro* (Kettle et al., 1995; 1997) e *in vivo* (Forghani et al., 2012), ABAH, na inflamação induzida por carragenina. Após 3 h de inflamação, ABAH (60 mg/kg) reduziu o edema da pata em 35% (Figura 4.2.8A) bem como os níveis de proteínas contendo 3-nitrotirosina (34%, Figura 4.2.8B). Em paralelo, a atividade clorinante da MPO foi similarmente reduzida (37%, Figura 4.2.8C), porém os níveis de MPO no tecido praticamente não se alteraram (Figura 4.2.8D). Esses resultados corroboram a visão de que a migração de neutrófilos e a atividade da MPO têm um papel relevante na inflamação aguda induzida pela carragenina. Também, de que esse processo inflamatório foi inibido pelos nitróxidos principalmente porque eles reduzem a migração de células inflamatórias para o local da lesão.

Figura 4.2.8. ABAH reduz o edema de pata induzido pela carragenina ao reduzir a atividade da MPO *in vivo*. ABAH (60 mg/kg) foi administrado i.p. 15 min antes da injeção intraplantar de carragenina (100 µL de 1% carragenina diluída em salina) na face plantar da pata traseira esquerda dos ratos. Após 3 h, a espessura da pata (A) foi medida com um paquímetro. B) Homogenatos (5 µg de proteína) foram submetidos a *Dot blot* e revelados com anticorpo contra resíduos de 3-nitrotirosina. O inserto é representativo de dois experimentos independentes. -Car, animal não tratado com carragenina; +Car, animal tratado com carragenina; ABAH, +Car e ABAH; +Car_{dilitonito}, homogenato do animal tratado com carragenina pré-tratado com ditionito de sódio (10 mM) por 10 min, a 25°C. (C) Os níveis de atividade clorinante nos homogenatos foram determinados conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.2.4.9). D) Homogenatos (100 µg de proteína) foram submetidos à SDS-PAGE e foram revelados com anticorpo contra proteína MPO. Para quantificação dos níveis de MPO. (D), a MPO humana comercial (150 ng) foi usada como padrão (primeira linha) e o limite de detecção do anticorpo anti-MPO foi determinado de aproximadamente 30 ng. Os valores mostrados são a média de experimentos com 2 animais diferentes, onde o desvio entre os valores não se diferiu em mais que 10%. Os insertos são representativos de dois experimentos independentes.

4.3 Tempol inibe a migração de neutrófilos *in vitro*?

4.3.1. O tempol modula a quimiotaxia e a polimerização da actina em neutrófilos

Os resultados acima indicaram que o tempol e os outros nitróxidos testados inibem a migração de neutrófilos no modelo de inflamação aguda em ratos (Figuras 4.2.3 e 4.2.6). Tornou-se, então, importante avaliar se a inibição da quimiotaxia pelos nitróxidos advinha de efeitos sistêmicos ou de uma ação direta sobre os neutrófilos. Para isso, estudamos os efeitos do tempol na migração de neutrófilos humanos *in vitro*.

Neutrófilos humanos ($3,3 \times 10^6/\text{mL}$) foram pré-incubados com diferentes concentrações do tempol por 30 min e as migrações em resposta ao PMA (100 ng/mL) ou fMLP (10 nM) foram avaliadas na câmara de Boyden. De acordo com a literatura (Hannigan et al., 2002), observamos que os neutrófilos ativados pelo PMA (Figura 4.3.1A) ou fMLP (Figura 4.3.1B) migraram cerca de 100 e 120 μm , respectivamente, após 2 h de incubação na câmara. O tempol inibiu a quimiotaxia de maneira dependente da concentração e o valor de IC_{50} foi 25 μM , independentemente do agente quimiotático utilizado (Figura 4.3.1). Digno de nota foi o fato de que aproximadamente 50 μm da distância percorrida pelos neutrófilos corresponderam à migração randômica em condições basais (Zhan et al., 2002). O tempol (100 μM) não modificou a migração randômica de neutrófilos ou atuou como quimiotático *per se* (dados não mostrados).

Os agentes quimiotáticos elicitam uma série de mudanças nos neutrófilos durante a migração. Estas incluem, principalmente, a alongação celular e a polimerização de actina globular (actina G) em actina filamentosa (actina F) na interface interna da membrana plasmática (Hattori et al., 2010a, 2010b). Como

actina polimerizada é insolúvel em detergentes como Triton X-100 e NP-40 em concentrações de 0,5-1% (Downey et al., 1992), avaliamos se o tempol afeta os níveis de actina insolúvel em Triton X-100 (0,75%). Os resultados mostraram que tanto a ativação com PMA (10 min) quanto com fMLP (1 min) induziram a polimerização de actina em níveis comparáveis em neutrófilos humanos (Figura 4.3.2A). A pré-incubação das células com diferentes concentrações do tempol por 30 min inibiu a formação de actina F com um IC_{50} de 27 μ M (Figura 4.3.2A). Entretanto, se os neutrófilos humanos são pré-incubados com tempol (25 μ M) por tempos relativamente mais curtos (5 min), nenhum efeito é observado (Figura 4.3.2A). Como ensaios com neutrófilos humanos são limitados pela disponibilidade de doadores frequentes, além do baixo rendimento obtido na separação dessas células que sobrevivem por pouco tempo (Babior e Golde, 2001), resolvemos analisar os efeitos do tempol sobre HL-60 diferenciadas em neutrófilos (chamadas de neutrófilos de cultura). Como esperado, a adição de PMA às células aumentou os seus níveis de fração insolúvel ao Triton X-100 (Figura 4.3.2B). O tempol na concentração de 25 μ M diminuiu em aproximadamente 50% a formação de actina F (Figura 4.3.2B). Em paralelo, confirmamos por experimentos de microscopia de fluorescência que a mesma concentração do tempol inibe a polimerização de actina monitorada por marcação com faloidina (Cooper, 1987) (Figura 4.3.2C). Coletivamente, esses resultados demonstram que o tempol pré-incubado com neutrófilos humanos ou de cultura por 30 min atenua a reorganização do citoesqueleto das células ativadas.

Figura 4.3.1. Inibição da quimiotaxia de neutrófilos humanos *in vitro* pelo tempol. Neutrófilos humanos suspensos em RPMI ($3,3 \times 10^6/\text{mL}$) foram pré-incubados com tempol (nas concentrações indicadas) por 30 min a 37°C em tubos de plástico estéreis. Em seguida foram transferidos para a Câmara de Boyden e incubadas por 2 h a 37°C sob atmosfera ar/CO_2 (5%) contra um gradiente de PMA (100 ng/mL) (A, B) ou fMLP (10 nM) (C,D). Em seguida, os filtros foram removidos para fixação das células e coloração com Hematoxilina de Harris. A migração dos neutrófilos no filtro foi determinada por microscopia óptica pelo método *leading front*, no qual a distância percorrida é medida da face superior do filtro até o plano mais distante que ainda contenha duas células com objetiva de 40x. Quatro campos foram contados com o objetivo de se obter a média para cada filtro. Os valores mostrados são a média $\pm$ desvio padrão obtidos de três experimentos independentes. As imagens microscópicas são representativas da migração dos neutrófilos ativados com PMA (A) e fMLP (C) por 50 μm através do filtro de 8 μm . * $p < 0,01$, ANOVA de uma via com Tukey como pós-teste para comparações múltiplas.

A citotoxicidade do tempol após pré-incubação com neutrófilos de cultura foi avaliada pelo método de exclusão de azul de tripan, incorporação de brometo de etídeo e atividade de lactato desidrogenase no sobrenadante das células. As células ($3,3 \times 10^6/\text{mL}$) incubadas com o tempol (até 100 μM) por 30 min em PBS glicose

permaneceram viáveis (>97%) segundo os métodos utilizados (dados não mostrados). De fato, efeitos tóxicos do tempol em modelos celulares têm sido descritos para concentrações milimolares do nitróxido (Monti et al., 2001; Samuni et al., 2004). Mesmo quando células são pré-incubadas com o tempol por 30 min e em seguida, tratadas com fMLP (10 nM) ou PMA (100 ng/mL) por mais 1 ou 15 min, respectivamente, as células permaneceram viáveis (>93%) (dados não mostrados). Esses dados indicam que os efeitos inibitórios do tempol sobre a polimerização de actina em neutrófilos de cultura não resultam de maior morte celular.

4.3.2. Efeitos do tempol sobre a explosão oxidativa de neutrófilos humanos

Como os efeitos do tempol sobre a polimerização de actina dos neutrófilos se mostraram dependentes de pré-incubação, tornou-se importante examinar eventuais alterações de outras propriedades características de neutrófilos, como a explosão oxidativa. Neutrófilos humanos ($3,3 \times 10^6/\text{mL}$) quando ativados com PMA, após uma fase lenta de 2,5 min, consumiram O_2 a uma taxa de $0,83 \text{ nmol/min}/10^6$ células (Figura 4.3.3A) reduzindo-o para $\text{O}_2^{\bullet-}$ ($0,90 \text{ nmol/min}/10^6$ células) (Figura 4.3.3B). Independentemente do tempo de pré-incubação (5 e 30 min), o tempol inibiu a redução do citocromo c ($40 \mu\text{M}$) pelo $\text{O}_2^{\bullet-}$ ($k = 1,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; Butler et al., 1975) de maneira dependente de concentração, sugerindo que o nitróxido compete com o citocromo c pelo ânion radical ($k = 6,9 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; Krishna et al., 1996). De fato, ao dobrarmos a concentração do citocromo c ($80 \mu\text{M}$), o efeito de tempol ($50 \mu\text{M}$) foi abolido (Figura 4.3.3B). Portanto, a aparente inibição do consumo de O_2 e da formação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Figura 4.3.3B) é explicada pela atividade superóxido dismutásica do tempol (Tabela 4.1, Equações (4.1.10 e 11)).

Figura 4.3.2. Inibição da polimerização da actina pelo tempol. Neutrófilos humanos (A) ou neutrófilos de cultura (B) ($3,3 \times 10^6/\text{mL}$) foram pré-incubados com tempol (nas concentrações indicadas) em PBS glicose a 37°C por 5 ou 30 min. Em seguida, as células foram ativadas pela adição de fMLP (10 nM) ou PMA (100 ng/mL). Após 1 ou 10 min, respectivamente, as células foram sedimentadas e ressuspensoas em tampão Triton-PHEM para extração do citoesqueleto. O precipitado insolúvel em Triton X-100 foi ressuspendido em 100 μL tampão de amostra e 25 μL foi submetido à SDS-PAGE e Western Blotting. A marcação 25 (5 min) indica que tempol (25 μM) foi incubado com as células por 5 min. Os valores mostrados são a média $\pm$ desvio padrão obtidos em três experimentos independentes. Os inserts são representativos de três géis de SDS-PAGE. * $p < 0,01$, ANOVA de uma via com Tukey como pós-teste para comparações múltiplas. C) Marcação da actina polimerizada (actina F) com faloidina Alexa Fluor 594. O sistema descrito em A) foi ativado com PMA na presença de tempol (25 μM) por 10 min. Em seguida, as células foram fixadas, permeabilizadas e coradas com DAPI (azul) e faloidina Alexa Fluor 594 (vermelho). As lâminas foram montadas e analisadas por microscopia de fluorescência sob aumento de 100x. As imagens são representativas de três experimentos independentes.

Estudos recentes indicaram que a formação de H_2O_2 via NADPH oxidase é essencial para a polimerização de actina e para a migração leucocitária (Hattori et al., 2010a). Portanto, a formação de H_2O_2 extracelularmente foi monitorada pela oxidação do amplex red via atividade peroxidásica da HRP. Em células pré-tratadas com o tempol, os níveis extracelulares de H_2O_2 produzidos pelas células ativadas por PMA (100 ng/mL) não foram praticamente alterados (dados não mostrados). Em paralelo, analisamos por EPR o consumo do tempol por neutrófilos humanos ($3,3 \times 10^6$ /mL) pré-incubados com o tempol (15 μ M) e ativados com PMA (100 ng/mL) após 15 min (Figura 4.3.4). A quantificação da concentração residual do tempol revelou que 10% do nitróxido inicial foi reduzido para a hidroxilamina correspondente e 25% foi permanentemente convertido para espécies diamagnéticas que não são re-oxidadas por ferricianeto (Figura 4.3.4). Digno de nota é o fato de que a concentração do tempol determinada por EPR não diminuiu durante o pré-tratamento (dado não mostrado). Até esse ponto, nossos resultados sugerem que o efeito inibitório do tempol sobre a quimiotaxia de neutrófilos não está relacionado com uma inibição da formação extracelular de H_2O_2 pela NADPH oxidase.

Figura 4.3.3. Efeito do tempol sobre a explosão oxidativa de neutrófilos humanos. Neutrófilos humanos ($3,3 \times 10^6/mL$) foram pré-incubadas com tempol (nas concentrações indicadas) em PBS glicose a $37^\circ C$ por 30 min em 300 μL de reação. Em seguida, as células foram ativadas pela adição de PMA (100 ng/mL). O consumo de O_2 (A) dos neutrófilos ($5 \times 10^6/mL$) foi monitorado em eletrodo de Clark num volume de 2 mL. A seta indica a adição de PMA. B) A formação de superóxido foi acompanhada pela redução do citocromo C. No meio reacional estavam presentes citocromo c (CitC) nas concentrações de 40 ou 80 μM . A concentração de SOD (hSOD1) foi de 100 $\mu g/mL$. As cinéticas são representativas de três experimentos independentes.

Figura 4.3.4. Consumo do tempol durante a explosão oxidativa de neutrófilos humanos. Neutrófilos humanos ($3,3 \times 10^6/mL$) foram pré-incubadas com tempol (15 μM) em PBS glicose a $37^\circ C$ por 30 min. Em seguida, as células foram ativadas pela adição de PMA (100 ng/mL). Após 15 min, as amostras foram centrifugadas (400g) e os sobrenadantes submetidos à análise de EPR antes de uma segunda leitura após a adição de ferricianeto (100 μM). Os espectros são representativos de três experimentos independentes. As condições instrumentais foram: potência de microondas, 20 mW; amplitude de modulação, 1 G; constante de tempo, 327 ms; velocidade de varredura, 0,29 G/s.

4.3.3. Formação de ROS intracelular mediada pelo tempol

A pré-incubação dos neutrófilos com o tempol por 30 min foi fundamental para a atenuação da polimerização de actina *in vitro* (Figura 4.3.2). Como os nitróxidos tem potencial para promover, transitoriamente, oxidação de biomoléculas em células e tecidos (Yin et al., 2004; May et al., 2005), avaliamos se o tempol induz alteração do estado redox de neutrófilos de cultura. Para isso, acompanhamos a oxidação

intracelular inespecífica da DCFH monitorada por fluorescência (Wang and Joseph, 1999). O tempol aumentou a velocidade de oxidação de DCFH de maneira dependente da concentração (Figura 4.3.5A). Uma estimativa dos níveis de oxidação intracelular da DCFH após 30 min em presença de tempol (50 μ M) correspondeu aqueles resultantes da oxidação da DCFH (10 μ M) por 0,3 μ M de H_2O_2 em presença de 1 μ M HRP (em 150 μ L de tampão fosfato, pH 7,4). Como 1×10^6 neutrófilos possuem cerca de 74 μ g de proteína (Beutler et al., 2001), uma estimativa grosseira permite calcular que 608 pmol de H_2O_2 /mg de proteína seriam formados dentro das células incubadas com tempol (50 μ M) por 30 min. Digno de nota é que esses níveis de oxidantes não alteraram a concentração intracelular de glutatona em neutrófilos de acordo com as análises por espectrometria de massas (1 nmol/ 10^6 células) (dado não mostrado) (Carr e Winterbourn, 1997).

O efeito de vários agentes sobre a oxidação intracelular de DCFH promovida pelo tempol foi também examinado. A pré-incubação de neutrófilos de cultura ($3,3 \times 10^6$ /mL) com PEG-Catalase (250 U/mL), DNP (15 μ M) ou DPI (15 μ M) inibiu a oxidação da DCFH induzida pelo tempol (50 μ M) em aproximadamente 50% (Figura 4.3.5B). Contrariamente, PEG-SOD (250 U/mL) aumentou em 2 vezes a oxidação da DCFH (Figura 4.3.5B). Esses resultados sugerem que o tempol promove a formação de H_2O_2 ou seu precursor em neutrófilos via flavoproteínas com o possível envolvimento de mitocôndrias.

Também, substituímos o tempol por compostos relacionados. Uma amina derivada do tempol, 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidinol, e um nitróxido neutro com um anel de 5 membros, 3-carbamoil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidini-1-oxil (3-CP), não promoveram oxidação da DCFH na concentração de 50 μ M (Figura 4.3.5B). A amina derivada do tempol não possui o centro redox $-NO\bullet$ característico de

nitróxidos. Por sua vez, nitróxidos pirrólicos são reconhecidamente mais resistentes a reações de redução que derivados piperidínicos (May et al., 2005). Portanto, esses dados confirmam que as reações de redução e oxidação do grupo nitróxido do tempol têm papel na sua atividade pró-oxidante.

Figura 4.3.5. Formação de ROS em neutrófilos humanos promovida pelo tempol. Neutrófilos humanos ($3,3 \times 10^6$ /mL) foram pré-incubados com DCFH-DA (10 μ M) por 10 min em PBS glicose. Em seguida, as células foram sedimentadas e ressuspensas em PBS glicose contendo tempol (nas concentrações indicadas) a 37°C. A) A cinética de oxidação da DCFH foi monitorada em um leitor de microplacas com excitação e emissão em 484 e 520 nm, respectivamente. As cinéticas são representativas de cinco experimentos independentes. B) Neutrófilos humanos pré-tratados com DCFH-DA foram pré-incubados com Cat (PEG-Catalase) (250 U/mL), SOD (PEG-SOD) (250 U/mL), DNP (15 μ M) ou DPI (15 μ M) por 15 min a 37°C antes da adição de tempol (50 μ M). Alternativamente as células pré-tratadas com DCFH-DA foram incubadas com 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidino (Piperidina) ou 3-carbamoyl-2,2,5,5-tetrametilpiperidino-1-oxil (3-CP) na concentração de 50 μ M. A cinética de fluorescência foi acompanhada por 30 min. Os dados de inibição foram obtidos do valor de fluorescência final e 100% de oxidação equivalem aos neutrófilos humanos tratados somente com tempol (50 μ M). Os valores mostrados são a média $\pm$ desvio padrão de n=3.

Até este ponto, os resultados evidenciam que o tempol induz um estresse oxidativo no interior das células (Figuras 4.3.5). Para confirmar isso, avaliamos a ativação da via do fator de transcrição Nrf2 que é conhecido por responder positivamente a condições oxidativas e está relacionado com eventos de sinalização celular (Cho et al., 2004; Giudice et al., 2010). Em condições basais, o Nrf2 se encontra no citoplasma das células (Figura 4.3.6). O tratamento com o tempol por 30 min levou à translocação do Nrf2 para o núcleo de neutrófilos de cultura de maneira dependente da concentração (Figura 4.3.6). Em contrapartida, em células incubadas com o tempol (50 μ M) por tempo relativamente mais curto (~5 min) o Nrf2 não migra

para o núcleo (Figura 4.3.6). Esse resultado confirma a atividade pró-oxidante do tempol em neutrófilos.

Figura 4.3.6. Translocação nuclear do Nrf2 em neutrófilos de cultura. Neutrófilos de cultura ($6,6 \times 10^6/\text{mL}$) foram incubadas com o tempol (nas concentrações especificadas) em PBS glicose por 5 ou 30 min a 37°C . A) A fração nuclear foi isolada, submetida à SDS-PAGE e revelada com o anticorpo contra Nrf2. A lamina-B foi usada como controle da proteína total aplicada. Os dados são expressos como a relação entre o nível de Nrf2 e o conteúdo de proteína total. O item, 25,5 min indica que tempol (25 μM) foi incubado com as células por 5 min. Os dados são representados como média $\pm$ desvio. * $p < 0,01$, ANOVA de uma via com Tukey como pós-teste para comparações múltiplas.

4.3.4. Caracterização das ROS formadas em neutrófilos tratados com tempol

A DCFH sofre oxidações inespecíficas por diversos mecanismos, não permitindo a caracterização e quantificação de ROS específicas (Wrona et al., 2005). A oxidação do DHE (50 μM) e a separação cromatográfica dos produtos resultantes pode revelar a formação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ dentre outras espécies reativas (Fernandes et al., 2007; Zielonka et al., 2008). Portanto, essa metodologia foi empregada para analisar as ROS produzidas pela incubação de neutrófilos de cultura ($6,6 \times 10^6/\text{mL}$) com tempol por 30 min. Observou-se que o DHE foi oxidado de maneira dependente da concentração do nitróxido, sendo que 50 μM do tempol aumentou em 2,5 vezes a concentração de EOH intracelular (207 *versus* 83 pmol/mg de proteína) (Figura

4.3.7A), sem alterar seus níveis extracelulares (dado não mostrado). Embora os níveis intracelulares de etídio (Figura 4.3.7A) também aumentaram após tratamento com o tempol de uma maneira dependente da concentração, sua concentração no meio extracelular permaneceu praticamente inalterada (dado não mostrado). O fato de maiores concentrações do tempol (100 μM) diminuírem os níveis de EOH intracelulares e aumentarem etídio está de acordo com as constantes de velocidade descritas para a reação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ com o tempol e DHE (Krishna et al., 1996; Zhao et al., 2003). A produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ foi também avaliada pela inativação da enzima aconitase (Gardner et al., 1994). Em condições basais, neutrófilos de cultura apresentaram uma atividade de aconitase de aproximadamente 1,2 mU/mg que foi diminuída pelo tratamento com o tempol de maneira dependente da concentração (Figura 4.3.7B). É assumido que 125 pmol de $\text{O}_2^{\bullet-}$ seriam suficientes em inibir 50% da atividade da aconitase de mamífero (Castro et al., 1994) e esse valor é da mesma ordem de grandeza das concentrações de $\text{O}_2^{\bullet-}$ determinadas pela formação de EOH (Figura 4.3.7A). Coletivamente, esses resultados confirmam que o tempol promove a produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$, que se dismuta a H_2O_2 , no interior de neutrófilos de cultura.

Figura 4.3.7. Formação intracelular de $O_2^{\bullet-}$ em neutrófilos de cultura mediada pelo tempol. A) Neutrófilos de cultura ($6,6 \times 10^6/mL$) foram incubados com DHE (50 μM) na presença de tempol (nas concentrações especificadas) em PBS glicose/DTPA (0,1 mM) por 30 min a 37°C. Em seguida, as células foram sedimentadas, lavadas com PBS glicose/DTPA (0,1 mM) e lisadas com Triton X-100 (0,1%). O lisado celular foi tratado como descrito em Materiais e Métodos (item 3.2.5.9) antes de ser injetado no HPLC. As quantidades de DHE, EOH e etídio foram calculadas pela comparação das áreas dos picos das amostras com aquelas correspondentes de uma curva de calibração. O dado é expresso em nmol de DHE, EOH ou etídeo por mg de proteína no lisado celular. A abreviação 50+Cat se refere às células pré-tratadas com PEG-Catalase (250 U/mL) e tempol (50 μM). B) Neutrófilos de cultura ($6,6 \times 10^6/mL$) foram incubadas com o tempol (nas concentrações indicadas) em PBS glicose por 30 min a 37°C. Em seguida, as células foram lisadas com Triton X-100 (0,5 %) em Tris-HCl (50 mM), pH 7,4. Uma alíquota do lisado foi diluída 30 vezes no tampão de reação que continha citrato (5 mM), $MnCl_2$ (0,5 mM), NADP (0,2 mM), isocitrato desidrogenase (2 U/mL) em Tris-HCl (50 mM), pH 7,4, e incubadas por 30°C. A formação de NADPH foi monitorada em 340 nm. O dado é expresso em atividade específica (U/mg). Os valores apresentados são a média $\pm$ desvio padrão obtidos de três experimentos independentes. * $p < 0,01$ comparado com os respectivos produtos de oxidação nas células sem tratamento, ANOVA de uma via com Tukey como pós-teste para comparações múltiplas.

4.3.5. Efeitos do tempol na formação de $O_2^{\bullet-}$ intracelular em neutrófilos

ativados

Neutrófilos de cultura ativados com PMA durante 15 min tiveram os níveis extracelulares de EOH cerca de 30 vezes aumentados em relação às células não ativadas (dado não mostrado). Em paralelo, a concentração de EOH intracelular foi 6,5 maior em células ativadas (600 *versus* 92 pmol/mg de proteína) (Figura 4.3.8A). Dessa maneira, nós hipotetizamos que as ROS provenientes de fontes intracelulares em neutrófilos ativados fossem mais relevantes que as extracelulares em modular funções de neutrófilos (Fialkow et al., 2007), tais como polimerização de actina e

migração celular. Os resultados preliminares demonstraram que a porção insolúvel a Triton X-100 de neutrófilos de cultura ativados com PMA (100 ng/mL) foi completamente abolida quando as células foram pré-tratadas com DPI (15 μ M) (Hattori et al., 2010a) ou PEG-Catalase (250 U/mL), mas não com catalase (250 U/mL) (Figura 4.3.8B). Em síntese, esses estudos evidenciaram que $O_2^{\bullet-}$ e consequentemente H_2O_2 são produzidos em quantidades razoáveis por fontes intracelulares em neutrófilos de cultura estimulados com PMA. Além disso, nossos dados suportam que principalmente o H_2O_2 intracelular desempenhe papel fundamental na regulação da reorganização do citoesqueleto durante a quimiotaxia.

De acordo com o exposto acima, resolvemos avaliar o efeito da pré-incubação do tempol na ativação intracelular da NADPH oxidase em neutrófilos de cultura. As células quando pré-incubadas com o tempol (25, 50 e 100 μ M) por 30 min e estimulados pelo PMA por 15 min, tiveram as concentrações de EOH intracelulares diminuídas, mas sem alterar os níveis basais de etídio (Figura 4.3.8). Nós estimamos que o tempol 38 μ M reduza a produção de EOH em 50%. Da mesma forma, em células pré-tratadas com o tempol 100 μ M por tempo relativamente mais curto (~5 min) e ativadas com PMA, também verificamos a redução na concentração de EOH intracelulares em 60%. Todavia, a concentração de etídio aumentou em 36%, suportando a participação da atividade superóxido dismutásica do tempol (Figura 4.3.8) (Krishna et al., 1996). Em resumo, esses estudos da formação intracelular de espécies reativas demonstraram que o tempol atenua a produção de $O_2^{\bullet-}$ no interior de neutrófilos estimulados com PMA com um IC_{50} de 38 μ M.

Coletivamente, os resultados apresentados neste item sugerem que baixas concentrações do tempol incubadas com neutrófilos elicitam a formação de espécies reativas (Figuras 4.3.5-7). Embora produzidas em baixos níveis, tais espécies devem

consumir parte do poder redutor das células levando-as a produzir um menor nível de espécies reativas intracelulares quando ativadas com agentes quimiotáticos (Figura 4.3.8). Essa cadeia de eventos resultaria em inibição da migração celular.

Figura 4.3.8. Efeito do tempol na formação intracelular de ROS em neutrófilos ativados e papel do H_2O_2 na polimerização da actina. A) Neutrófilos de cultura ($6,6 \times 10^6/\text{mL}$) foram incubados na presença de tempol (nas concentrações especificadas) em PBS glicose/DTPA (0,1 mM) por 5 ou 30 min a 37°C . Em seguida, DHE (50 μM) foi adicionado e as células foram ativadas pela adição de PMA (100 ng/mL) por 15 min. Então, as células foram sedimentadas, lavadas com PBS glicose/DTPA (0,1 mM) e lisadas com Triton X-100 (0,1%). O lisado celular foi tratado como descrito em Materiais e Métodos (item 3.2.5.9). A abreviação 100, 5 min se refere às células pré-tratadas com tempol (100 μM) por 5 min antes da adição de PMA. O dado é expresso em nmol de DHE, EOH ou etídeo por mg de proteína no lisado celular. Os valores apresentados são a média $\pm$ desvio padrão obtidos de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, quando comparados com os respectivos produtos de oxidação no controle de neutrófilos ativados com PMA. ANOVA de uma via com Tukey como pós-teste para comparações múltiplas. B) Neutrófilos de cultura ($6,6 \times 10^6/\text{mL}$) foram pré-incubados com catalase (Cat, 250 U/mL), PEG-Catalase (PEG-Cat, 250 U/mL) ou DPI (15 μM) em PBS glicose a 37°C por 10 min. Em seguida, as células foram ativadas pela adição de PMA (100 ng/mL). Após 10 min, as células foram sedimentadas e ressuspensas em tampão Triton-PHEM para extração do citoesqueleto para a marcação contra a actina como descrito nos Materiais e Métodos (item 3.2.5.7). A lamina-B foi usada como controle da proteína total aplicada. Os valores apresentados são a média obtidos de dois experimentos independentes onde o desvio entre os valores não se diferiu em mais que 10%.

4.4 Efeito do tempol sobre as modificações da hSOD1 resultantes de sua atividade peroxidásica dependente do par bicarbonato/dióxido de carbono

4.4.1. Efeito do tempol no ciclo peroxidásico da hSOD1

O par bicarbonato/dióxido de carbono é oxidado durante a atividade peroxidásica da hSOD1 para $\text{CO}_3^{\bullet-}$ (Bonini et al., 2004; Medinas et al., 2007, 2009) que pode ser monitorado pela oxidação de DHR para rodamina ($\epsilon_{500\text{nm}} = 7,88 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Wrona et al., 2005). Na ausência do tempol, a atividade específica por monômero da hSOD1 foi de $30,6 \pm 0,2 \text{ mU/mg}$ (Medinas et al., 2009) (Figura 4.4.1A). O tempol inibiu a formação de rodamina de maneira dependente da concentração (Figura 4.4.1A) sugerindo que ele esteja atuando como varredor de radical carbonato (Goldstein et al., 2004). Isso foi confirmado por experimentos de cinética de competição (Figura 4.4.1B) (Winterbourn, 1987). Relacionando em um gráfico os valores de $(F/(1-F)) k_{\text{DHR}} [\text{DHR}]$ e as concentrações do tempol que promoveram esta inibição pode-se calcular a constante de velocidade de segunda ordem para a reação do tempol como de $(3,4 \pm 0,1) \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 7,4, 37°C), que é numericamente igual ao coeficiente angular da reta (Equação (3.2.3)) (Figura 4.4.1B). Esse valor foi uma ordem de grandeza maior que aquele previamente determinado por experimentos de radiólise de pulso para a reação do tempol com $\text{CO}_3^{\bullet-}$ ($4,0 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pH 10,3, 25°C) (Goldstein et al., 2004). Apesar dessa diferença obtida em diferentes condições experimentais, o resultado mostrado na Figura 4.4.1B sugere que o tempol compete com a DHR pelo $\text{CO}_3^{\bullet-}$.

Figura 4.4.1. O tempol compete pelo radical carbonato formado durante a atividade peroxidásica da hSOD1 dependente do par bicarbonato/dióxido de carbono. A) A reação continha hSOD1 (2 μM por monômero), bicarbonato de sódio (25mM), DHR (0,1 mM), tempol (nas concentrações especificadas) e DTPA (0,1 mM) em tampão fosfato (50mM), pH7,4. H₂O₂ (1 mM) foi adicionado e a reação foi incubada a 37°C. A oxidação do DHR a rodamina foi monitorada espectrofotometricamente em 500 nm ($\epsilon = 7,88 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A região vazia no gráfico corresponde ao período de oscilação decorrente à adição de H₂O₂. Os traços cinéticos são representativos de três experimentos independentes. B) A figura mostra a porcentagem de inibição da oxidação do DHR ($F/(1-F)$) plotado contra a concentração do tempol para obter a constante de velocidade de segunda ordem (k_{tempol}) conforme estabelecido pela equação $(F/(1-F)) k_{\text{DHR}} [\text{DHR}] = k_{\text{tempol}} [\text{tempol}]$. Os valores mostrados são a média $\pm$ desvio padrão obtidos de três experimentos independentes.

Experimentos de captação de spin com DMPO (50 mM) também foram realizados para examinar a influência do tempol na formação de $\text{CO}_3^{\bullet-}$ pela hSOD1 durante sua atividade peroxidásica. O captador de spin DMPO reage com $\text{CO}_3^{\bullet-}$ com uma constante de velocidade de segunda ordem de $1,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Alvarez et al., 2007) para produzir o aduto DMPO-OH ($a_N = 14,9 \text{ G}$; $a_H = 14,9 \text{ G}$). Na presença de bicarbonato/dióxido de carbono, grandes quantidades do radical aduto DMPO-OH são geradas (Figura 4.4.2) (Yim et al., 1990; Sankarapandi e Zweier, 1999). O tempol nas concentrações de 30 e 75 μM competem com DMPO pelo radical carbonato e inibem a formação do DMPO-OH em 12 e 28%, respectivamente (Figura 4.4.2), o que está de acordo com as constantes de velocidade de reação descritas na literatura (Alvarez et al., 2007; Goldstein et al., 2005). Estes resultados confirmam que o tempol atua como varredor de $\text{CO}_3^{\bullet-}$.

Figura 4.4.2. Formação do aduto DMPO-OH na atividade peroxidásica da hSOD1 dependente do par bicarbonato/dióxido de carbono. A) hSOD1 (30 μ M por monômero), DMPO (50 mM), bicarbonato de sódio (25 mM), tempol (nas concentrações especificadas), DTPA (0,1 mM) em tampão fosfato (50 mM), pH 7,4, foram incubados a 37°C. H_2O_2 (1 mM) foi adicionado para iniciar a reação.

Nos tempos especificados, alíquotas foram submetidas à análise de EPR. Os espectros de EPR são representativos de três experimentos independentes. B) A concentração do aduto DMPO-OH na amostra foi estimada pela dupla integração do espectro de EPR e comparação com uma curva padrão de tempol analisado nas mesmas condições. As cruzes e os quadrados pretos indicam as linhas dos espectros do tempol e DMPO-OH, respectivamente, que foram usados para cálculo da inibição da formação do DMPO-OH. Sem tempol (~) e com tempol 15 μ M (○) ou 75 μ M (△). As condições experimentais foram: potência de microondas, 10 mW; amplitude de modulação, 1,0 G; constante de tempo, 41 ms; taxa de varredura, 1,25 G/s.

Contudo, os resultados acima (Figuras 4.4.1 e 4.4.2) não excluem a influência do tempol na atividade catalítica da hSOD1. Dessa forma, resolvemos avaliar o consumo do substrato H_2O_2 durante a atividade peroxidásica da hSOD1 dependente do bicarbonato/dióxido de carbono (Liochev e Fridovich, 2002). A velocidade inicial do consumo de H_2O_2 foi de 17,5 μ M/min (Figura 4.4.3). O tempol nas concentrações até 75 μ M não alterou a velocidade inicial de consumo do substrato pela hSOD1 (Figura 4.4.3), indicando que nessas concentrações, o tempol não inibe o ciclo catalítico da enzima.

4.4.2. Efeito do tempol na dimerização covalente da hSOD1

Nós confirmamos a formação de um dímero covalente da hSOD1 dependente de bicarbonato/dióxido de carbono e H_2O_2 após 1 h de reação (Figura 4.4.4) (Zhang et al., 2003, 2004a, 2004b; Medinas et al., 2010). O tempol inibiu a dimerização de uma maneira dependente da concentração ($\text{IC}_{50} = 14 \mu\text{M}$) (Figura 4.4.4). Digno de nota foi o fato de que uma concentração equimolar do tempol em relação ao monômero da hSOD1 inibiu completamente a formação do dímero (Figura 4.4.4). Captadores de $\text{CO}_3^{\bullet-}$ como DMPO, PBN e nitrona azulênol também inibiram a formação do dímero covalente da hSOD1 mas em concentrações da ordem de dezenas de milimolar (Zhang et al., 2003). Os efeitos inibitórios marcantes de concentrações micromolares do tempol sugerem outros mecanismos além da competição pelo $\text{CO}_3^{\bullet-}$.

Figura 4.4.3. Tempol não interfere na atividade peroxidásica da hSOD1 dependente do par bicarbonato/dióxido de carbono. A) Bicarbonato de sódio (25 mM), DTPA (0,1 mM) em tampão fosfato (50 mM), pH 7,4, foram incubados a 37°C sem hSOD1 (Δ) e com hSOD1 (30 μM por monômero) (~), hSOD1 + tempol 15 μM (○), hSOD1 + tempol 75 μM (Δ). H_2O_2 (1 mM) foi adicionado para iniciar a reação. Alíquotas foram retiradas nos tempos especificados e diluídas em dez vezes em tampão fosfato (50 mM), hidrocloreto de ortodiansidina (0,3 mM) e HRP (1 μM), pH 7,4. O H_2O_2 residual foi determinado espectrofotometricamente em 460 nm e comparados com uma curva padrão de H_2O_2 . Os valores mostrados são a média ± desvio padrão obtidos de três experimentos independentes.

4.4.3. Atenuação da perda da atividade dismutásica e do desenovelamento da hSOD1

O consumo de H_2O_2 pela hSOD1 durante sua atividade peroxidásica em tampão bicarbonato/dióxido de carbono (Figura 4.4.3) diminui muito com o tempo de reação indicando inativação da enzima, como reportado na literatura (Liochev e Fridovich, 2002; Elam et al., 2003). Nas nossas condições, hSOD1 (30 μM por monômero) perdeu aproximadamente 65 e 89% de sua atividade dismutásica durante sua atividade peroxidásica na ausência ou presença de bicarbonato, respectivamente (Figura 4.4.5A). O tempol na concentração de 15 μM protegeu a enzima de inativação o que é consistente com seus efeitos varredores de $\text{CO}_3^{\bullet-}$ que deve participar da inativação da enzima via oxidação das histidinas do sítio ativo.

Por outro lado, análises por ELISA usando um anticorpo que reconhece hSOD1 desenovelada (Rakhit et al., 2007; Kerman et al., 2010) demonstraram que após 1 h de incubação de hSOD1 (30 μM por monômero), H_2O_2 e bicarbonato formas desenoveladas da enzima são detectáveis e seus níveis são inibidos em cerca de 50% pelo tempol na concentração de 15 μM (Figura 4.4.5B). Esses resultados indicam que as oxidações mediadas pelo $\text{CO}_3^{\bullet-}$ desestabilizam a estrutura da hSOD1, como previamente sugerido (Zhang et al., 2004a) e mais recentemente confirmado e esclarecido em nosso laboratório (Coelho et al., 2012, dados não publicados). Nesses estudos, os autores apresentam evidências de que a formação do dímero covalente da hSOD1 leva à formação transitória de um tetrâmero que enfraquece as ligações não covalentes do dímero nativo, levando à desenovelamento e agregação (Coelho et al, 2012, em preparação). Aqui, testamos o efeito do tempol sobre a agregação da hSOD1 resultante de sua atividade peroxidásica dependente de bicarbonato/dióxido de carbono por espalhamento de

luz dinâmica. Os resultados obtidos confirmam que a inibição da formação do dímero covalente pelo tempol inibe a agregação da proteína (Figura 4.4.5C).

Figura 4.4.4. Inibição da formação do dímero covalente da hSOD1 formado durante sua atividade peroxidásica dependente do par bicarbonato/dióxido de carbono pelo tempol. hSOD1 (30 μM por monômero), bicarbonato de sódio (25 mM), DBNBS (10 mM), tempol (nas concentrações especificadas) e DTPA (0,1 mM) foram incubados em tampão fosfato (50 mM), pH 7,4, H_2O_2 (1 mM) foi adicionado para iniciar a reação. As misturas reacionais foram incubadas a 37°C por 1 h. Após a incubação, alíquotas da reação (5 μg de proteína) foram submetidas à SDS-PAGE seguido pela revelação com um anticorpo contra hSOD1. O gel é representativo de três experimentos independentes. Os valores mostrados no gráfico são a média $\pm$ desvio padrão obtidos de três experimentos independentes. * $p < 0,01$, ANOVA de uma via com Tukey como pós-teste para comparações múltiplas.

4.4.4. Consumo do tempol por reações radiculares

No ciclo peroxidásico da hSOD1 dependente de bicarbonato/dióxido de carbono, o tempol foi estequiometricamente consumido em relação a concentração de hSOD1 (30 μM por monômero) em até 1 h de reação (Figura 4.4.6A). Digno de nota é o fato de que a partir desse tempo a enzima está praticamente inativa (Figura 4.4.5A).

Figura 4.4.5. Tempol protege a hSOD1 da perda de atividade dismutásica (A) e desenovelamento (B) durante sua atividade peroxidásica dependente do par bicarbonato/dióxido de carbono. A) hSOD1 (30 μ M por monômero), bicarbonato de sódio (25 mM), tempol (15 μ M) e DTPA (0,1 mM) foram incubados em tampão fosfato (50 mM), pH 7,4. Quando indicado, H₂O₂ (1 mM) foi adicionado para iniciar a reação e incubadas a 37°C. Após 1 h, catalase (100 μ g/mL) foi e a atividade dismutásica residual da hSOD1 foi medida. Cem por cento de atividade específica da hSOD (controle) corresponde a $4,3 \pm 0,2 \times 10^3$ U/mg (mg de proteína normalizada pelo conteúdo de cobre). B) Desenovelamento da hSOD1. Mesmas que em A). A detecção de uSOD foi realizada por ELISA. Anti-hSOD1 foi usado como controle da proteína total. A hSOD1 desenovelada foi preparada conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.2.6.11). Os valores mostrados no gráfico são a média $\pm$ desvio padrão obtidos de três experimentos independentes. * $p < 0,01$. ANOVA de uma via com Tukey como pós-teste para comparações múltiplas. C) Diâmetro médio das partículas. Mesmo que em A), porém hSOD1 (60 μ M por monômero) e tempol (60 μ M). Após 1 h, catalase (0,1 U/mL) foi adicionada e as medidas de espalhamento de luz foram realizadas após mais 6 dias de incubação a 37°C. Os valores expressam a média de dois experimentos independentes. Demais informações estão descritas em Materiais e Métodos (item 3.2.6.12).

A bSOD é uma enzima funcional e estruturalmente similar à humana, exceto pela perda do resíduo de triptofano na posição 32 (Zhang et al., 2003). Portanto, o $\text{CO}_3^{\bullet-}$ produzido pela bSOD não induz sua dimerização covalente (Zhang et al., 2003). Em nosso sistema, o tempol não foi consumido durante a atividade peroxidásica da bSOD dependente de bicarbonato/dióxido de carbono (Figura 4.4.6B), confirmando que o consumo do tempol é dependente do resíduo de triptofano.

Para tentar esclarecer o consumo do tempol, analisamos suas concentrações residuais e eventuais produtos por HPLC/UV-Vis. Similarmente ao determinado acima (Figura 4.4.6), a concentração do tempol diminuiu equimolarmente à concentração da hSOD1 (30 μM por monômero) e nenhuma espécie derivada do tempol foi detectada por UV-Vis durante a cromatografia (Figura 4.4.7). Esses resultados indicam que o tempol é irreversivelmente consumido, provavelmente, por reação de recombinação com o radical triptofanila da hSOD1 (Wright e English, 2003).

Figura 4.4.6. Análise do consumo do tempol durante a atividade peroxidásica da hSOD1 dependente do par bicarbonato/dióxido de carbono por EPR. A) hSOD1 (30 μM por monômero), bicarbonato de sódio (25mM), tempol (15, 50 ou 75 μM) e DTPA (0,1 mM) foram incubados em tampão fosfato (50mM), pH 7,4. H_2O_2 (1 mM) foi adicionado para iniciar a reação e incubadas a 37°C. Após 1 h, a reação foi submetida à análise de EPR seguida pela adição de catalase (100 μg/mL) antes de uma segunda leitura. Os espectros de EPR são representativos de três experimentos independentes. B) Mesmas condições descritas em (A), mas na presença de bSOD (30 μM por monômero) ao invés de hSOD1. A concentração do tempol foi 50 μM. Os espectros de EPR são representativos de dois experimentos independentes. A concentração de tempol na amostra foi estimada pela dupla integração do espectro de EPR e comparação com uma curva padrão de tempol analisado nas mesmas condições. As condições experimentais foram: potência de microondas, 20 mW; amplitude de modulação, 1,0 G; constante de tempo, 41 ms; taxa de varredura, 1,25 G/s.

Para testar a hipótese acima, examinamos a produção de radical triptofanila por experimentos de captação de spin com DNBBS (20 mM). Incubações da hSOD1 com H_2O_2 e bicarbonato na presença de DNBBS produziram um espectro imobilizado cujo parâmetro de EPR é consistente com de um radical aduto hSOD1-Trp-DNBBS ($a_N = 13,6$ G) como anteriormente reportado (Zhang et al., 2003) (Figura 4.4.8). Em presença de DNBBS, o tempol nas concentrações de 1 e 15 μM foram marginalmente consumidos (dado não mostrado) e a quantidade de hSOD1-Trp-DNBBS não foi alterada. Isso fica claro pela comparação das linhas do radical aduto que não coincide com as linhas do espectro do tempol (marcado na Figura 4.4.8). Então, concentrações micromolares do tempol não competem com concentrações milimolares de DNBBS pelo radical hSOD1-Trp*. Esse fato que está de acordo com

as constantes de velocidade de segunda ordem dos radicais centrados em carbono com captadores e com nitróxidos (Wright e English, 2003).

Figura 4.4.7. Análise do consumo do tempol durante a atividade peroxidásica da hSOD1 dependente do par bicarbonato/dióxido de carbono por HPLC-UV/Vis. hSOD1 (30 μM por monômero), bicarbonato de sódio (25 mM), tempol (50 μM) e DTPA (0,1 mM) foram incubados em tampão fosfato (50 mM), pH 7,4. H₂O₂ (1 mM) foi adicionado para iniciar a reação e incubadas a 37°C. Após 1 h, as amostras foram submetidas à ultracentrifugação (Microcon; corte de 5 kD; Millipore) para excluir a hSOD1 antes da injeção no HPLC. A) Cromatograma obtido por HPLC-UV/Vis em 240 nm. B) A concentração de tempol residual na reação foi estimada pela dupla integração do espectro de absorbância (A) e comparação com aquele de uma solução padrão de tempol. Os valores mostrados no gráfico são a média ± desvio padrão obtidos de três experimentos independentes. *p<0,01, ANOVA de uma via com Tukey como pós-teste para comparações múltiplas.

Figura 4.4.8. Formação do aduto hSOD1-Trp-DBNBS durante a atividade peroxidásica da hSOD1 dependente do par bicarbonato/dióxido de carbono. hSOD1 (30 μM por monômero), bicarbonato de sódio (25 mM), DBNBS (20 mM), tempol (1 e 15 μM) e DTPA (0,1 mM) foram incubados em tampão fosfato (50 mM), pH 7,4, H₂O₂ (1 mM) foi adicionado para iniciar a reação. As reações foram incubadas a 37°C por 30 min. Após incubação, a mistura reacional foi submetida à análise de EPR. Os espectros de EPR são representativos de três experimentos independentes. Os pontos indicam as linhas dos espectros do aduto DBNBS-proteína utilizadas para comparações. As condições experimentais foram: potência de microondas, 20 mW; amplitude de modulação, 1,0 G; constante de tempo, 327 ms; taxa de varredura, 0,29 G/s.

Nossos dados indicam que um aduto entre o tempol e radical triptofanila seria formado no sistema estudado. Com o objetivo de provar a formação desse aduto, realizamos digestão triptica da hSOD1 após *turnover* em presença e ausência de tempol seguida de análise por MALDI-ToF/ToF e UPLC-ESI-q-ToF (Wright e English, 2003). Como descrito previamente (Medinas et al., 2010), a sequência $^{31}\text{VWGSIK}^{36}$ (m/z 689,5) que contem o triptofano foi encontrada na hSOD1 nativa (Figura 4.4.9A). Na hSOD1 oxidada, os peptídeos contendo triptofano (cerca de 20% do inicial) e os produtos de oxidação do triptofano, quinurenina (VKynGSIK, m/z 693,4) e NFK (VNFKGSIK, m/z 721,6) também foram identificados (Figura 4.4.9B) (Medinas et al., 2010). Em presença do tempol, a formação dos produtos de oxidação do triptofano não foi detectada e o peptídeo nativo foi detectado em maiores quantidades (Figura 4.4.9C). Como aventado, foi possível identificar um pico com m/z 861,7 que corresponde ao esperado para um aduto entre tempol e o peptídeo VWGSIK (Figura 4.4.9C). O peptídeo de m/z 805,9 correspondente à autólise da tripsina foi usado como controle interno da ionização no MALDI-ToF/ToF (Wright e English, 2003). Não foi possível detectar esse aduto por UPLC-ESI-q-ToF, provavelmente devido a instabilidade da ligação (dado não mostrado) (Lardinois et al., 2009). Em conclusão, nossos resultados demonstram que o tempol inibe a dimerização da hSOD1 resultante de sua atividade peroxidásica dependente de bicarbonato/dióxido de carbono principalmente porque se recombina com o radical hSOD1-Trp* antes da ligação cruzada entre as subunidades da proteína.

Figura 4.4.9. Formação do aduto covalente entre hSOD1-Trp* e tempol. A) As misturas reacionais continham hSOD1 (30 μ M por monômero), bicarbonato de sódio (25 mM) e DTPA (0,1 mM) em tampão fosfato (50 mM), pH 7,4. B) (A) + H₂O₂ (1 mM). C) (B) + tempol (75 μ M). Todas as incubações foram realizadas a 37°C por 1 h. Em seguida, as amostras foram desnaturadas, reduzidas e alquiladas seguidas pela digestão triptica conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.2.6.10). Os produtos de digestão da hSOD1 foram analisados por MALDI-ToF/ToF. VWGSIK, m/z 689,5; VKynGSIK, m/z 693,4; VNFKGSIK, m/z 721,6; peptídeo de autólise da tripsina, m/z 805,9; VW(Tempol)GSIK, m/z 861,7. Kyn e NFK se referem à quinurenina e N-formilquinurenina, respectivamente. As figuras da esquerda correspondem ao espectro original; as figuras centrais ao aumento de 10 vezes da região de m/z 650-900; e as figuras da direita correspondem ao aumento de 50 vezes da região de m/z 850-870. Os espectros do Maldi-ToF correspondem a três experimentos independentes.

5 Discussão

5.1 Inibição da atividade clorinante da MPO por nitróxidos

Enquanto realizávamos nosso trabalho, um extenso estudo desenvolvido por Rees et al. (2009) demonstrou que nitróxidos aromáticos e alifáticos cíclicos inibem a atividade clorinante da MPO monitorada pela oxidação da metionina de uma maneira dependente das estruturas dos compostos (Rees et al., 2009). Os resultados descritos em nosso trabalho da inibição do tempol sobre a atividade clorinante da MPO monitorada pela cloração da taurina (Figuras 4.1.1, 4.1.2, 4.1.6 e 4.1.7) estavam de acordo com a maioria dos dados e conclusões apresentados no trabalho de Rees et al. (2009). A contribuição do nosso trabalho foi fornecer dados cinéticos (Figuras 4.1.4 e 4.1.5) para refinar o mecanismo inibitório.

Nossos estudos mostraram que o tempol reage com o HOCl com baixa constante de velocidade de segunda ordem mesmo em pH ácido ($k = 0,29 \pm 0,01 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pH = 5,4) (Figura 4.1.2). Então, os nitróxidos não podem agir como varredores de HOCl a menos que eles sejam modificados e possuam grupos químicos que reajam com o oxidante, tais como tióis, tioéters e aminas (Malle et al., 2007). Esta propriedade difere da alta reatividade dos nitróxidos com outras “espécies reativas” biologicamente relevantes, tais como $\text{O}_2^{\bullet-}$, radicais hidroxila, $^{\bullet}\text{NO}_2$ e $\text{CO}_3^{\bullet-}$ (Goldstein et al., 2006; Soule et al., 2007; Wilcox e Pearlman, 2008; Augusto et al., 2008).

Em relação às estruturas dos nitróxidos, os resultados mostraram que todos os nitróxidos testados (Figura 1.3.2) inibiram a atividade clorinante da MPO *in vitro* com valores similares de IC_{50} (Figura 4.1.3). Este resultado corrobora a importância do potencial de redução dos nitróxidos no mecanismo inibitório já que todos os

compostos testados têm o mesmo centro redox (Figura 1.3.2) (Rees et al., 2009), independentemente de seus coeficientes de lipofilicidade. Este resultado descarta, também, uma possível interação dos compostos com o bolsão hidrofóbico da enzima (Hori et al., 1994).

As cinéticas das reações do tempol com MPO-I e MPO-II foram re-examinadas sob condições otimizadas, confirmando que tempol reage rapidamente com MPO-I ($k = (3,5 \pm 0,5) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Figura 4.1.4). Entretanto, a reação do tempol com MPO-II foi mostrada ser mais complexa que a previamente considerada (Vaz e Augusto, 2008; Augusto et al., 2009; Rees et al., 2009), apresentando saturação cinética (Figura 4.1.5). Este tipo de resposta é incomum para oxidações mediadas pela MPO-II, mas foi anteriormente relatado para acetaminofeno (Marquez et al., 1993), ascorbato e iodeto (Marquez e Dunford, 1990) e atribuído a uma simples interação entre esses substratos e a MPO-II. Similarmente, uma interação entre MPO-II e tempol ocorreria antes da transferência de elétrons para produzir MPO e o cátion oxamônio do tempol ($K = (2,04 \pm 0,1) \times 10^{-5} \text{ M}$; $k_{4.1.7} = (3,6 \pm 0,1) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$) (Equações (4.1.6) e (4.1.7)). O interessante é que este comportamento de saturação cinética com MPO-II foi descrito para substratos com estruturas e propriedades químicas bastante diferentes como tempol ($E^\circ = 0,84 \text{ V}$) (Israeli et al., 2005), acetaminofeno ($E^\circ = 0,71 \text{ V}$) (Bisby e Tabassum, 1988), ascorbato ($E^\circ = 0,28 \text{ V}$) (Buettner, 1993) e iodeto ($E^\circ = 0,44 \text{ V}$) (Vogel, 1979). Esse fato, corrobora a idéia de que a oxidação de substratos pela MPO-II é limitado tanto pelo potencial de redução dos substratos como por outras características que permanecem não completamente elucidadas (Marquez et al., 1993; Jantschko et al., 2002; Soubhye et al., 2010).

No caso da reação entre MPO-II e tempol, o intermediário [MPO-II-tempol] sugerido pela cinética não pode ser confirmado por espectrofotometria porque o espectro de absorção no visível foi indistinguível daquele da MPO-II, exceto pela ausência de ponto isosbético entre a MPO e MPO-II em 441 nm (Figura 4.1.6B) (Hoogland et al., 1987; Marquez et al., 1990; 1994; Marquez e Dunford, 1995). Contudo, o intermediário [MPO-II-tempol] que decai lentamente tanto para MPO-II e tempol ($k_{4.1.6} = 2,0 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$) como para e MPO e TPNO⁺ ($k_{4.1.7} = 3,6 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$) (Figura 4, Tabela 1), parece ser crucial no mecanismo pelo qual tempol inibe a atividade clorinante da MPO. Isto é corroborado pela razoável concordância entre os dados experimentais (Figura 4.1.7, linhas pretas e símbolos) e a modelagem cinética das mudanças na concentração dos produtos e substratos com o tempo durante a cloração da taurina mediada pela MPO na presença do tempol (Figura 4.1.7, linhas cinzas; Tabela 4.1, reações destacadas) (Marquez et al., 1994; Folkes et al., 1995; Furtmüller et al., 1998, 2000; Goldstein et al., 2006; Ramos et al., 2007).

As reações empregadas para simular os dados experimentais foram destacadas na Tabela 4.1 e devem ser comentadas já que a produção de HOCl livre durante a cloração de pequenos substratos pela MPO permanece controversa na literatura (Marquez e Dunford, 1994; Spalteholz et al., 2006; Ramos et al., 2007; Davies et al., 2008). O mecanismo inibitório do tempol na presença de concentrações fisiológicas de cloreto (0,1 M) pode ser razoavelmente simulado assumindo que a taurina é clorada pelo complexo [MPO-I-Cl⁻] (Tabela 4.1, (Equações (4.1.2d)); (Figura 4.1.7). Outras hipóteses resultam em processos clorinantes que durariam menos que 1 s sob as condições experimentais da Figura 4.1.7 mesmo na presença de tempol (dados não mostrados). Modelagens obtidas assumindo que HOCl livre é formado por um único passo pela reação da MPO-I e

cloreto (Equação (4.1.2)) (Furtmüller et al., 1998) ou quando consideramos que o complexo $[MPO-I-Cl^-]$ (Equação (4.1.2a)) decai para HOCl livre, que clorina substratos (Furtmüller et al., 2000) discordam completamente dos dados experimentais relatados aqui (Figura 4.1.7) e daqueles descritos para a oxidação da metionina por Rees et al. (2009) na Figura 2. Portanto, o efeito inibitório do tempol sobre a cloração da taurina mediada pela MPO (nosso trabalho) e oxidação da metionina (Rees et al., 2009) suportam a idéia de que estes substratos são modificados antes do HOCl deixar o sítio ativo (Marquez e Dunford, 1994; Spalteholz et al., 2006; Ramos et al., 2007; Davies et al., 2008).

A modelagem cinética dos nossos dados experimentais (Figura 4.1.7, linhas pretas) foi apenas razoável e não melhorou quando incluímos outras reações dos intermediários da MPO, como as reações da MPO-I e MPO-II com $O_2^{\bullet-}$ (Kettle et al., 2007; Rees et al., 2009). Tal fato sugere que detalhes mecanísticos das reações catalisadas pela MPO permanecem desconhecidos e precisam ser elucidados. Até este ponto, a modelagem cinética de nossos dados experimentais, embora limitada (Figura 4.1.7), indica que as reações destacadas na Tabela 4.1 desempenham um papel relevante no efeito inibitório do tempol.

5.2 Efeito de nitróxidos sobre a inflamação aguda induzida pela carragenina em patas de ratos

A demonstração de que o tempol e nitróxidos cíclicos inibiam a atividade da MPO e o dano oxidativo resultante em proteínas *in vitro* (Figuras 4.1.1 e 4.1.3) tornou relevante examinar esses efeitos *in vivo*. Escolhemos a inflamação aguda induzida pela carragenina em patas de ratos como modelo. Os resultados mostraram que os nitróxidos testados atenuaram todos os índices empregados para

monitorar a inflamação, porém não encontramos evidências para inibição da atividade da MPO (Figuras 4.2.1-3 e 4.2.5-7). De fato, os níveis de atividade clorinante, que depende especificamente da MPO, correlacionaram com os níveis de MPO nas patas dos ratos (Figuras 4.2.3 e 4.2.6). Similarmente, o edema da pata, os níveis de proteínas oxidadas e nitradas e exsudação plasmática correlacionaram grosseiramente com os níveis protéicos de MPO nas patas dos animais não tratados e tratados com os nitróxidos. A análise global dos efeitos dos nitróxidos testados sobre a inflamação induzida pela carragenina mostrou que eles, principalmente o tritempo, agiram similarmente a menores quantidades de colchicina quanto a inibição do edema, da oxidação e nitração de proteínas, da atividade clorinante, dos níveis de MPO e da exsudação plasmática (Figuras 4.2.5, 4.2.6 e 4.2.7). Como a colchicina é um clássico inibidor da quimiotaxia de neutrófilos (Chang, 1975; Vinegar et al., 1981), os efeitos comparáveis dos nitróxidos sugerem que eles inibem a inflamação induzida pela carragenina principalmente pela redução da migração de neutrófilos para o sítio inflamatório (Figura 5.1).

Recentemente, foi demonstrado que o conhecido inibidor irreversível da MPO, ABAH, inibe o dano oxidativo mediado pela MPO e suas consequências num modelo murino de demielinização (Forghani et al., 2012). Em nosso modelo, a administração de ABAH antes da injeção da carragenina reduziu o edema, a nitração de proteínas e, claro, a atividade clorinante da MPO sem alterar seus níveis teciduais (Figura 4.2.8) (Forghani et al., 2012). Portanto, nossos resultados apresentam evidências da importância da atividade catalítica da MPO em promover o dano oxidativo durante a inflamação aguda induzida pela carragenina. Também, nossos resultados mostraram razoável correlação entre a atividade de MPO e todos outros parâmetros inflamatórios monitorados nas patas dos ratos dos animais tratados e não tratados

com os nitróxidos (Figuras 4.2.1-3 e 4.2.5-7). Essa correlação corrobora que os nitróxidos agiram principalmente por inibir a migração de neutrófilos já que os níveis de MPO no sítio inflamatório refletem a quimiotaxia neutrofílica (Brown et al., 2001; Planas et al., 2002; Cunha et al., 2008).

Figura 5.1. Representação do mecanismo de inibição de nitróxidos sobre a inflamação aguda induzida pela carragenina. O X representa as substituições na molécula do tempol (Figura 1.3.2).

Com relação a aspectos de estrutura e função, nossos resultados demonstraram que todos os nitróxidos testados inibiram a atividade clorinante da MPO com valores de IC₅₀ similares *in vitro* (Figuras 4.14.1 e 4.1.3). *In vivo*, a atenuação da inflamação induzida pela carragenina correlacionou com a lipofilicidade do nitróxido em tempos iniciais, mas, as diferenças nos efeitos foram pequenas (Figuras 4.2.1, 4.2.5, 4.2.6 e 4.2.7) quando comparadas com as diferenças de hidrofobicidade (Figura 1.3.2). Portanto, aumentar a lipofilicidade da molécula do tempol não resultou em melhora considerável da eficiência no modelo

animal. Isso provavelmente foi devido à boa distribuição do tempol por órgãos e tecidos (Wilcox e Pearlman, 2008; Wilcox, 2010) e a não alteração do potencial de redução dos nitróxidos sintetizados. De maneira similar, estratégias para aumentar o acúmulo mitocondrial de nitróxidos por ligação a grupos facilmente captados pela membrana mitocondrial não aumentaram consistentemente seus efeitos protetores (Wilcox e Pearlman, 2008; Wilcox, 2010).

5.3 Tempol inibe a migração de neutrófilos *in vitro*?

Os resultados aqui apresentados (Figuras 4.2.3 e 4.2.6) e outros trabalhos da literatura (Thiemerman et al., 2001; Cuzzocrea et al., 2004; Tshako et al., 2009) evidenciaram que nitróxidos inibem a migração de neutrófilos e macrófagos para sítios inflamatórios em vários modelos animais. A maioria desses estudos empregou abordagens fenomenológicas para descrever o a modulação negativa do processo inflamatório por nitróxidos. Nossos estudos *in vitro* com neutrófilos humanos e linhagem de cultura HL-60 diferenciada em neutrófilos (neutrófilo de cultura) demonstraram que tempol pré-incubado por 30 min com as células, inibe a quimiotaxia reduzindo a polimerização da actina (Figuras 4.3.1 e 4.3.2). Como valores similares de IC_{50} foram determinados tanto para a quimiotaxia *in vitro* (Figura 4.3.1) quanto para a reorganização da actina citoplasmática (Figura 4.3.2) nossos resultados confirmam que ambos os eventos são relacionados (Hattori et al., 2010a, 2010b).

Uma análise global dos resultados apresentados no item 4.3, indica que o tempol atua como um pró-oxidante fraco em neutrófilos de cultura, promovendo formação de H_2O_2 de forma dependente de reações redox do grupo nitróxido e da atividade de flavoenzimas (Figuras 4.3.5 e 4.3.7). Esta modificação do estado redox

de neutrófilos foi suficiente para ativar o Nrf2 de maneira dependente da concentração de tempol (Figura 4.3.6). A ativação desse fator de transcrição induz a transcrição de diversos genes de enzimas antioxidantes (Giudice et al., 2010). Embora essa resposta adaptativa possa explicar a amplitude dos efeitos protetores de nitróxidos em modelos crônicos (Thiemmerman et al., 2001; Augusto et al., 2008; Wilcox e Pearlman, 2008; Tsuchioka et al., 2009, Wilcox, 2010), ela não explica a atenuação de processos agudos. Nesse sentido, a ativação de Nrf2 não justificaria os efeitos inibitórios do tempol sobre a quimiotaxia.

Como hipótese alternativa pode-se sugerir que o leve efeito oxidante da pré-incubação com tempol diminua o poder redutor das células. Esse processo levaria a menor produção de espécies reativas intracelulares em resposta à ativação com PMA (Figura 4.3.8A). Em neutrófilos, H_2O_2 advindo de fontes intracelulares está envolvido na regulação de suas funções, enquanto que oxidantes produzidos para o meio externo estão principalmente envolvidos com a resposta imune (Figura 4.3.8B; Fialkow et al., 2007). Recentemente, foi demonstrado que a produção de H_2O_2 via NADPH oxidase é essencial para a polimerização da actina e a migração leucocitária (Hattori et al., 2010a). O mecanismo não foi esclarecido, mas se acredita que envolva a oxidação de tióis reativos de proteínas envolvidas na transdução de sinais (Rhee, 2006; Clavreul et al., 2006; Winterbourn, 2008; Ushio-Fukai, 2009; Dickinson e Chang, 2010). Nesse contexto, podemos sugerir que o tempol inibe a quimiotaxia de neutrófilos por reduzir a produção de oxidantes reguladores de vias intracelulares estimuladas por proteínas cinases (Kamata e Hirata, 1999; Rhee, 2006; Leslie, 2006; Gopalakrishna et al., 2008; Hattori et al., 2010b, Knock e Ward, 2011).

5.4 Efeito do tempol sobre as modificações da hSOD1 resultantes de sua atividade peroxidásica dependente do par bicarbonato/dióxido de carbono

Nossos estudos demonstraram que o tempol não inibe a atividade peroxidásica da hSOD1 dependente do par bicarbonato/dióxido de carbono (Fig. 4.4.3). Todavia, o tempol compete com vários agentes pelo produto, $\text{CO}_3^{\bullet-}$, de maneira dependente das respectivas concentrações e constantes de velocidade de segunda ordem com o radical (Figuras 4.4.1 e 4.4.2). Mais importante, o tempol protegeu parcialmente a enzima de inativação (Figura 4.4.5), provavelmente reagindo com $\text{CO}_3^{\bullet-}$ que deve também atacar os resíduos de His do sítio ativo.

Outro alvo importante do $\text{CO}_3^{\bullet-}$ é o resíduo ^{32}Trp da hSOD1, cuja oxidação leva a vários produtos (Zhang et al, 2003, 2004), inclusive a um dímero formado pela ligação covalente de resíduos ^{32}Trp de duas subunidades através do N3 e C1 de cada resíduo, respectivamente (Medinas et al., 2010). Como a hSOD1 é a única enzima dentre os mamíferos que contém o resíduo ^{32}Trp , os produtos de oxidação desse resíduo poderiam ter um papel na ELA (Zhang et al., 2003, 2004; Medinas et al., 2010). Os nossos resultados mostraram que o tempol inibe a formação do dímero covalente da hSOD1 e os subsequentes processos de desenovelamento e agregação da proteína (Coelho et al., 2012 em preparação) (Figura 4.4.5). Também, foi demonstrado que o tempol é consumido no processo reagindo com o radical ^{32}Trp , já que o peptídeo VW(tempol)GSIK pode ser caracterizado por espectrometria de massas (Figura 4.4.5) (Figura 5.2).

O estudo sistemático dos efeitos do tempol sobre a atividade peroxidásica da hSOD1 dependente de bicarbonato/dióxido de carbono pode aprofundar a compreensão dos mecanismos patogênicos da ELA. Recentemente, o grupo demonstrou que o tratamento contínuo com o tempol (30 mM na água consumida)

aumenta ligeiramente a sobrevivência de ratos $hSOD1^{G93A}$, os quais superexpressam a mutante G93A da hSOD1 e são um modelo da doença humana. O aumento na sobrevivência dos animais pelo tempol foi acompanhado por inibição da perda de neurônios, do dano oxidativo e dos níveis de formas não nativas de hSOD1 nas medulas dos ratos (Linares et al., 2012, submetido). A necessidade de altas doses de tempol para um efeito protetor modesto poderia ter relação com o consumo do nitróxido pela atividade peroxidásica da hSOD1. De qualquer forma, a participação dessa atividade na patogênia da ELA permanece uma questão aberta.

Figura 5.2. Representação do mecanismo proposto da peroxidação mediada pela hSOD1 na presença de bicarbonato e o efeito protetor do tempol (TPNO*) sobre a lesão em neurônios motores.

6 Conclusões

Nosso trabalho apontou, em paralelo a outro grupo de pesquisa (Rees et. al., 2009), um potencial novo alvo biológico de nitróxidos cíclicos, a enzima MPO. Assim, complementamos estudos anteriores do grupo que mostraram que nitróxidos inibem a nitração de proteínas mediada por MPO em meio ácido sem interferir diretamente com a enzima, mas, reagindo com seu produto nitrante, o $\text{NO}_2^\bullet$. Essa reação regenera NO_2^- e produz o cátion oxâmonio derivado do tempol que, por sua vez, regenera tempol oxidando o H_2O_2 para $\text{O}_2^\bullet$ e O_2 (Vaz e Augusto, 2009). No caso da atividade clorinate da MPO, que pode resultar tanto em cloração como em oxidação de biomoléculas, mostramos que o tempol atua como um inibidor reversível da enzima. Isso ocorre porque o tempol leva ao acúmulo de MPO-II e do complexo [MPO-II-tempol] que não participam do ciclo clorinante da MPO. Assim, contribuimos para demonstrar que tempol e outros nitróxidos cíclicos possuem a capacidade de reduzir o dano oxidativo e nitro-oxidativo mediado por MPO por diferentes mecanismos.

Para tentar demonstrar a operância dos efeitos inibitórios de nitróxidos sobre a MPO em um modelo animal, selecionamos a inflamação aguda induzida por carragenina em patas de ratos. De fato, os nitróxidos testados atenuaram consideravelmente a inflamação e dano molecular, mas a ação inibitória principal ocorreu *upstream* à MPO. Ou seja, os nitróxidos inibiram a migração de neutrófilos ao sítio inflamatório, reduzindo os níveis de MPO nele presentes. Esses estudos complementaram outros trabalhos da literatura que também evidenciaram, em diferentes modelos animais, a inibição da migração de neutrófilos e macrófagos para sítios inflamatórios por nitróxidos cíclicos (Thiemermann et al., 2001; Cuzzocrea et al., 2004; Tshako et al., 2010). Finalmente, pelo nosso conhecimento, esse estudo

dos efeitos atenuantes de nitróxidos sobre a inflamação aguda induzida por carragenina forneceu as primeiras evidências de que as atividades enzimáticas da MPO são relevantes para o desenvolvimento do edema, a oxidação e nitração de proteínas teciduais e a injúria vascular.

Os resultados obtidos no modelo animal tornaram obrigatório examinar os efeitos do tempol sobre a migração de neutrófilos humanos e de cultura *in vitro*. Nossos dados demonstram que tempol inibe a quimiotaxia e a polimerização da actina em neutrófilos em cultura desafiados com fMLP e PMA. Esses efeitos inibitórios foram observados só quando o tempol é pré-incubado com as células, indicando alteração do estado redox das mesmas. De fato, confirmamos um leve efeito pró-oxidante do tempol por várias metodologias, inclusive a translocação nuclear do Nrf2. Como esse fator de transcrição controla a síntese de várias enzimas antioxidantes, essa resposta adaptativa das células aos efeitos pró-oxidantes transitórios do tempol pode explicar a eficácia do tempol em modelos animais de inflamação crônica. Todavia, não pode explicar os rápidos efeitos inibitórios da migração dos neutrófilos em cultura. Esses efeitos precisam ser melhor elucidados. Tentativamente, pode-se sugerir que tempol iniba a quimiotaxia de neutrófilos por reduzir a produção de oxidantes intracelulares que regulam vias envolvidas na migração celular.

Uma extensão do nosso trabalho foi realizar um estudo sistemático dos efeitos do tempol sobre a atividade peroxidásica da hSOD1 dependente de bicarbonato/dióxido de carbono. Mostramos que o tempol inibe a formação do dímero covalente da hSOD1 e os subsequentes processos de desenovelamento e agregação da proteína. Também, demonstramos que o tempol é consumido no processo reagindo com o radical ^{32}Trp , já que o peptídeo $^{31}\text{VW(tempol)GSIK}^{36}$ pode

ser caracterizado por espectrometria de massas. Essa demonstração do consumo de tempol por radicais centrados em carbono é importante porque ressalta uma via de consumo do tempol em ambientes muito oxidantes, embora esse tipo de reação possa ser reversível em determinadas condições (Lam et al., 2008). Outra possível implicação geral desse estudo será auxiliar na compreensão dos mecanismos patogênicos da ELA (Linares et al., 2012, submetido), embora o envolvimento da atividade peroxidásica da hSOD1 seja uma questão aberta.

Finalmente, nossos estudos demonstraram que aumentar consideravelmente a hidrofobicidade da molécula de tempol tem efeitos marginais sobre suas ações biológicas.

7 Referências

- ABU-SOUD, H. M.; HAZEN, S. L. Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 5425-5430, 2000.
- AGALAVE, S. G.; MAUJAN, S. R.; PORE, V. S. Click chemistry:1,2,3-triazoles as pharmacophores. **Chemistry An Asian Journal**, v. 6, p. 2696-2718, 2011.
- AGNER, K. Crystalline Myeloperoxidase. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 12, p. 89-94, 1958.
- ALVAREZ, B. et al. Inactivation of human Cu,Zn superoxide dismutase by peroxynitrite and formation of histidiny radical **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 37, n. 6, p. 813-822, 2004.
- ALVAREZ, M. N. et al. Reaction of the carbonate radical with the spin-trap 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide in chemical and cellular systems: Pulse radiolysis, electron paramagnetic resonance, and kinetic-competition studies. **Free Radical in Biology and Medicine** v. 43, p. 1523-1533, 2007.
- ALVES, R.; ANTUNES, F.; SALVADOR, A. Tools for kinetic modeling of biochemical networks. **Nature Biotechnology**, v. 24, p. 667-672, 2006.
- AMARAL, A. T. et al. Physicochemical parameters involved in the lethal toxicity of N,N[(dimethylamino)ethyl]-4-substituted benzoate hydrochlorides: A QSAR study. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 32, p. 433-443, 1997.
- ANDREWS, P. C.; PARNES, C.; KRINSKY, N. I. Comparison of myeloperoxidase and hemi-myeloperoxidase with respect to catalysis, regulation, and bactericidal activity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 228, p. 439-442, 1984.
- AUGUSTO, O. **Radicais livres: bons, maus e naturais**. São Paulo: Oficina de Textos, 2006.
- AUGUSTO, O. et al. Cyclic nitroxides inhibit the toxicity of nitric oxide-derived oxidants: mechanisms and implications. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, p. 179-189, 2008.
- AUGUSTO, O. et al. Inhibition of the chlorinating activity of myeloperoxidase by nitroxides. In: 6th INTERNATIONAL HUMAN PEROXIDASE MEETING, 2009, Chapel Hill. **Resumos...** Chapel Hill: Cleveland Clinic Center, 2009.
- BABIOR, B. M. GOLDE, D. W. Composition and metabolism of neutrophils. In: **Williams Hematology**. New York: McGraw-Hill, 2001, p. 753-759. Editado por Marshall A. Lichtman, Ernest Beutler, Thomas Uri Seligsohn, Kenneth Kaushansky e Josef T. Prchal.
- BALDUS, S. et al. Spatial mapping of pulmonary and vascular nitrotyrosine reveals the pivotal role of myeloperoxidase as a catalyst for tyrosine nitration in inflammatory diseases. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 33, p. 1010-1019, 2002.
- BANCI, L. et al. Metal-free superoxide dismutase forms soluble oligomers under physiological conditions: A possible general mechanism for familial ALS. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, p. 11263-11267, 2007.

- BAO-HAN, Z.; YUN-FENG, C.; GUO-DONG, Y.; AN-XIN, W. Synthesis and crystal structure of 4-azido-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl free radical. **Chinese Journal of Structural Chemistry**, v. 25, p. 127-130; 2006.
- BARANIUK, J. N. et al Related neuropathology in rhinosinusitis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 171, p. 5-11, 2005.
- BARR, D. P. et al. ESR Spin-trapping of a Protein-derived Tyrosyl Radical from the Reaction of Cytochrome c with Hydrogen Peroxide. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 15498-15503, 1996.
- BATY, J. W.; HAMPTON, M. B; WINTERBOURN, C. C. Detection of oxidant-sensitive thiol proteins by fluorescent labeling and two dimensional electrophoresis. **Proteomics**, v. 2, p. 1261-1266, 2002.
- BATY, J. W. et al. Proteomic detection of hydrogen peroxide-sensitive thiol proteins in Jurkat cells. **Biochemical Journal**, v. 389, p. 785-795, 2005.
- BEUTLER, E. Composition and metabolism of neutrophils. In: **Williams Hematology**. New York: McGraw-Hill, 2001, p. 745-752. Editado por Marshall A. Lichtman, Ernest Beutler, Thomas Uri Seligsohn, Kenneth Kaushansky e Josef T. Prchal.
- BISBY, R. H. AND TABASSUM, N. Properties of the radicals formed by one-electron oxidation of acetaminophen- A pulse radiolysis study. **Biochemical Pharmacology**, v. 37, p. 2731-2738, 1988.
- BLECH, D. M.; BORDERS, C. L., Jr. Hydroperoxide anion, HO_2^- , is an affinity reagent for the inactivation of yeast Cu,Zn superoxide dismutase: Modification of one histidine per subunit. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 224, p. 579-586, 1983.
- BOECHAT, N. et al. Novel 1,2,3-triazole derivatives for use against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) strain. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 5988-5999, 2011.
- BONINI, M. G. et al. Direct EPR detection of the carbonate radical anion produced from peroxynitrite and carbon dioxide. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 10802-10806, 1999.
- BONINI, M. G.; FERNANDES, D. C.; AUGUSTO, O. Albumin oxidation to diverse radicals by the peroxidase activity of Cu, Zn-superoxide dismutase in the presence of bicarbonate or nitrite: Diffusible radicals produce cysteinyl and solvent-exposed and -unexposed tyrosyl radicals. **Biochemistry**, v. 43, p. 344-351, 2004.
- BORISENKO, G. G. et al. Nitroxides scavenge myeloperoxidase-catalyzed thiyl radicals in model systems and in cells. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, p. 9221-9232, 2004.
- BOS, A.; WEVER, R.; ROOS, D. Characterization and quantification of the peroxidase in human monocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 525: p. 37-44, 1978.
- BOSSY-WETZEL, E.; NEUMEYER, D. D.; GREEN, D. R. Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. **The EMBO Journal**, v. 17, p. 37-49, 1998.

- BOYDEN, S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 115, p. 453-466, 1962.
- BOYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. **Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation**, v. 21, p. 77-90, 1968.
- BOZEMAN, P. M.; LEARN, D. B.; THOMAS, E. L. Assay of the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. **Journal of Immunological Methods**, v. 126, p. 125-133, 1990.
- BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRADLEY, P. P. et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, p. 206-209, 1982.
- BRAY, R. C. et al. (1974). Reduction and inactivation of Superoxide dismutase by hydrogen peroxide. **Biochemical Journal**, v. 139, p. 43-48, 1974.
- BRENNAN, M. L. et al. A tale of two controversies: defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 17415-1742, 2002.
- BRENNAN, M. L.; HAZEN, S. L. Emerging role of myeloperoxidase and oxidative stress markers in cardiovascular risk assessment. **Current Opinion in Lipidology**, v. 14, p. 353-359, 2003.
- BROWN, K. E; BRUNT, E. M.; HEINECKE, J. W. Immunohistochemical Detection of Myeloperoxidase and Its Oxidation Products in Kupffer Cells of Human Liver. **The American Journal of Pathology**, v. 159, p. 2081-2088, 2001.
- BUETTNER, G R. The pecking order of free radicals and antioxidants:lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 300, p. 535-543, 1993.
- CABELLI, D. E. et al. The interaction between Cu(I) superoxide dismutase and hydrogen peroxide. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, 9967-9971, 1989.
- CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods in Enzymology**, v. 113, p. 484-490, 1985.
- CARR, A. C.; WINTERBOURN, C. C. Oxidation of neutrophil glutathione and protein thiols by myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. **Biochemical Journal**, v. 327, p. 275-281, 1997.
- CASTRO, L.; RODRIGUEZ, M.; RADI, R. Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 29409-29415, 1994.
- CHANG, Y. Mechanism of action of colchicine. II. Effects of colchicine and its analogs on phagocytosis and chemotaxis in vitro. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 194, p. 159-164, 1975.

- CHANG, J. et al. Comparative proteomics: characterization of a two-dimensional gel electrophoresis system to study the effect of aging on mitochondrial proteins. **Mechanisms of Ageing Development**, v. 124, p. 33-41, 2003.
- CHAUDHURI, A. R. et al. Detection of protein carbonyls in aging liver tissue: A fluorescence-based proteomic approach. **Mechanisms of Ageing Development**, v. 127, p. 849-886, 2006.
- CHEN, J. et al. Oxidative modification of von Willebrand factor by neutrophil oxidants inhibits its cleavage by ADAMTS13. **Blood**, V. 115, p. 706-712, 2010.
- CHO, S. H. et al. Redox regulation of PTEN and protein tyrosine phosphatases in H₂O₂ mediated cell signaling. **FEBS Letters**, v. 560, p. 7-13, 2004.
- CLAIRBORNE, A. Catalase activity. In: **Handbook of Methods for Oxygen Radical Research**. Boca Raton: CRC Press, 1985, p. 283-284. Editado por Roger Greenwald.
- CLAVREUL, N. et al. S-glutathiolation of p21ras by peroxynitrite mediates endothelial insulin resistance caused by oxidized low-density lipoprotein. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, p. 2454-2461, 2006.
- COELHO, F. R. et al. Oxidative and structural modifications of hSOD1 resulting from its carbon dioxide-dependent peroxidase activity. 2012 (em preparação).
- COOPER, J. A. Effects of Cytochalasin and Phalloidin on Actin. **The Journal of Cell Biology**, v. 105, p. 1473-1478, 1987.
- CROW, J. P.; ISCHIROPOULOS, H. Detection and quantitation of nitrotyrosine residues in proteins: *in vivo* marker of peroxynitrite. **Methods in Enzymology**, v. 269, p. 185-194, 1996.
- CUNHA, T. M. et al. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, p. 824-832, 2008.
- CUZZOCREA, S. et al. Effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model of carrageenan-induced pleurisy. **European Journal of Pharmacology**, v. 25, p. 209-222, 2000.
- CUZZOCREA, S. et al. Inducible nitric oxide synthase-knockout mice exhibit resistance to pleurisy and lung injury caused by carrageenan. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 162, p. 1859-1866, 2000.
- CUZZOCREA, S. et al. Tempol reduces the activation of nuclear factor-kappaB in acute inflammation. **Free Radical Research**, v. 38, p. 813-819, 2004.
- CUZZOCREA, S. et al. Protective effects of Mn(III)tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin (MnTBAP), a superoxide dismutase mimetic, in paw oedema induced by carrageenan in the rat. **Biochemical Pharmacology**, v. 58, p. 171-176, 2009.
- DALE, D. C.; BOXER, L.; LILES, W. C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. **Blood**, v. 112, p. 935-945, 2008.
- DALLE-DONNE, I. et al. Methionine oxidation as a major cause of the functional impairment of oxidized actin. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 32, p. 927-937, 2002.
- DAVIES, M. J. et al. Mammalian heme peroxidases: from molecular mechanisms to health implications. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 10, p. 1199-1234, 2008.

- DELANGE, R. J. **Handbook of Biochemistry and Molecular Biology**. Cleveland: CRC Press, 1976. 295 p. Editado por Gerald. D. Fasman.
- DELANOTE, V.; VANDEKERCKHOVE, J.; GETTEMANS, J. Plastins: versatile modulators of actin organization in (patho)physiological cellular processes. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 26, p. 769-779, 2005.
- DHANASEKARAN, A. et al. Mitochondria superoxide dismutase mimetic inhibits peroxide-induced oxidative damage and apoptosis: role of mitochondrial superoxide. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 39, p. 567-583, 2005.
- DI PAOLA, R. et al. Effects of Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32, p. 1062-1068, 2005.
- DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **Journal of Pathology**, v. 104, p. 15-29, 1971.
- DICKINSON, B. C; CHANG, C. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. **Nature Chemical Biology**, v. 7, p. 504-511, 2011.
- DOWNEY, G. P. et al. Phorbol ester-induced actin assembly in neutrophils: role of protein kinase C. **The Journal of Cell Biology**, v. 116, n. 3, p. 695-706, 1992.
- DRAGUTAN, I.; MEHLHORN, R. J. Modulation of oxidative damage by nitroxide free radicals. **Free Radical Research**, v. 41, p. 303-315, 2007.
- DUNFORD, H. B. **Heme Peroxidases**. New York: Wiley-VCH, 1999.
- DUNFORD, H. B. **Peroxidases and Catalases. Biochemistry, Biophysics, Biotechnology and Physiology**. Hoboken: John Wiley & Sons, 1976. 459 p.
- ELAM, J. S. et al. An alternative mechanism of bicarbonate-mediated peroxidation by copper-zinc superoxide dismutase: rates enhanced via proposed enzyme-associated peroxy carbonate intermediate. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 21032-21039, 2003.
- FACUNDO, H. T.; DE PAULA, J. G.; KOWALTOWSKI, A. J. Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels prevent oxidative stress, permeability transition and cell death. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 37, p. 75-82, 2005.
- FARAH, M. E. et al. Diverse protective roles of the actin cytoskeleton during oxidative stress. **Cytoskeleton**, v. 68, p. 340-354, 2011.
- FERNANDES, D. C. et al. Tempol diverts peroxynitrite/carbon dioxide reactivity toward albumin and cells from protein-tyrosine nitration to protein-cysteine nitrosation. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 38, p. 189-200, 2005.
- FERNANDES, D. C. et al. Analysis of DHE-derived oxidation products by HPLC in the assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity in vascular systems. **American Journal of Physiology: Cell Physiology**, v. 292, p. C413-C422, 2007.
- FIALKOW, L. et al. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 15, p. 153-164, 2007.

- FIEDLER, T. J.; DAVEY, C. A.; FENNA, R. E. X-ray crystal structure and characterization of halide-binding sites of human myeloperoxidase at 1.8 Å resolution. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 11964-11971, 2000.
- FLAHERY, D. M. et al. Oxidant-Mediated Increases in Redox Factor-1 Nuclear Protein and Activator Protein-1 DNA Binding in Asbestos-Treated Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 168, p. 5675-5681, 2002.
- FOLKES, L. K.; CANDEIAS, L. P.; WARDMAN, P. Kinetics and mechanisms of hypochlorous acid reactions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 323, p. 120-126, 1995.
- FORGHANI, R. et al. Demyelinating Diseases: Myeloperoxidase as an Imaging Biomarker and Therapeutic Target. **Radiology**, v. 263, p. 451-460, 2012.
- FURTMÜLLER, P. G.; BURNER, U.; OBINGER, C. Reaction of myeloperoxidase compound I with chloride, bromide, iodide, and thiocyanate. **Biochemistry**, v. 37, p. 17923-17930, 1998.
- FURTMÜLLER, P. G.; OBINGER, C.; HSUANYU, Y.; DUNFORD, H. B. Mechanism of reaction of myeloperoxidase with hydrogen peroxide and chloride ion. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 5858-5864, 2000.
- FURTMÜLLER, P. G. et al. Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 445, p. 199-213, 2006.
- GALIJASEVIC, S.; ABDULHAMID, I.; ABU-SOUD, H. M. Melatonin is a potent inhibitor for myeloperoxidase. **Biochemistry**, v. 47, p. 2668-2677, 2008.
- GALKIN, K. E. et al. High-resolution cryo-EM structure of the F-actin-fimbrin/plastin ABD2 complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 1494-1498, 2008.
- GARDNER, P. R. et al. Aconitase is a sensitive and critical target of oxygen poisoning in cultured mammalian cells and in rat lungs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, p. 12248-12252, 1994.
- GARIBOLDI, M. B. et al. The nitroxide tempol induces oxidative stress, p21(WAF1/CIP1), and cell death in HL60 cells. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 29, p. 633-641, 2000.
- GAUT, J. P. et al. Myeloperoxidase produces nitrating oxidants in vivo. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 109, p. 1311-1319, 2002.
- GIUDICE, A.; ARRA, C.; TURCO, M. C. Review of molecular mechanisms involved in the activation of the Nrf2-ARE signaling pathway by chemopreventive agents. **Methods in Molecular Biology**, v. 647, p. 37-74, 2010.
- GOLDSTEIN, S. et al. The role of oxoammonium cation in the SOD-mimic activity of cyclic nitroxides. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, p. 789-795, 2003.
- GOLDSTEIN, S.; SAMUNI, A.; MERENYI, G. Reactions of nitric oxide, peroxynitrite, and carbonate radicals with nitroxides and their corresponding oxoammonium cations. **Chemical Research of Toxicology**, v. 17, p. 250-257, 2004.

GOLDSTEIN, S. et al. Structure-activity relationship of cyclic nitroxides as SOD mimics and scavengers of nitrogen dioxide and carbonate radicals. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 110, p. 3679-3685, 2006.

GOLDSTEIN, S.; SAMUNI, A.; MERENYI, G. Kinetics of the reaction between nitroxide and thiyl radicals: nitroxides as antioxidants in the presence of thiols. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 112, p. 8600-8605, 2008.

GOPALAKRISHNA, R. et al. A Direct Redox Regulation of Protein Kinase C Isoenzymes Mediates Oxidant-induced Neuritogenesis in PC12 Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 14430-14444, 2008.

GRACANIN, M.; DAVIES, M. J. Inhibition of protein tyrosine phosphatases by amino acid, peptide, and protein hydroperoxides: Potential modulation of cell signaling by protein oxidation products. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 42, n. 10, p. 1543-1551, 2007.

GRUZMAN, A. et al. Common molecular signature in SOD1 for both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, p. 12524-12529, 2007.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. New York: Oxford University Press Inc., 2007.

HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood**, v. 92, p. 3007-3017, 1998.

HANNIGAN, M. et al. Neutrophils lacking phosphoinositide 3-kinase γ show loss of directionality during N-formyl-Met-Leu-Phe-induced chemotaxis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, p. March 19, 2002.

HATTORI, H. et al. Small-molecule screen identifies reactive oxygen species as key regulators of neutrophil chemotaxis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, p. 3546-3551, 2010a.

HATTORI, H. et al. Reactive oxygen species as signaling molecules in neutrophil chemotaxis. **Communicative & Integrative Biology**, Commun. Integr. Biol. v. 3, p. 278-281, 2010b.

HAWKINS, C. L.; DAVIES, M. T. Generation and propagation of radical reactions on proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1504, p. 196-219, 2001.

HAZEN, S. L. et al. Mass spectrometry quantification of 3-chlorotyrosine in human tissues with attomole sensitivity: a sensitive marker for myeloperoxidase-catalyzed chlorination at sites of inflammation. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 23, p. 909-916, 1997.

HEROLD, S.; SHIVASHANKAR, K.; MEHL, M. Myoglobin scavenges peroxynitrite without being significantly nitrated. **Biochemistry**, v. 41, p. 13460-13472, 2002.

HILL K. E. et al. Thioredoxin reductase activity is decreased by selenium deficiency. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 234, p. 293-295, 1997.

- HOFFMAN, B. M.; EAMES, T. B. Protonated nitroxide free radical. **Journal of the American Chemical Society**, v. 91, p. 2169-70, 1969.
- HOOGLAND, H. et al. Spectral properties of myeloperoxidase compounds II and III. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 916, p. 76-82, 1987.
- HORGAN, K. et al. Inhibition of protein kinase C mediated signal transduction by tamoxifen. Importance for antitumour activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 35, n. 24, p. 4463-4465, 1986.
- HORI, H. et al. Aromatic substrate molecules bind at the distal heme pocket of myeloperoxidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 8388-8392, 1994.
- HOUGH, M. A.; HASNAIN, S. S. Structure of fully reduced bovine copper zinc superoxide dismutase at 1.15 Å. **Structure**, v. 11, p. 937-946, 2003.
- HURST, J. K. What really happens in the neutrophil phagosome?. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 53, p. 508-520, 2012.
- ISRAELI, A. et al. Kinetics and mechanism of the comproportionation reaction between oxoammonium cation and hydroxylamine derived from cyclic nitroxides. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 38, p. 317-324, 2005.
- JACOB, C. et al. DMSO-treated HL60 cells: a model of neutrophil-like cells mainly expressing PDE4B subtype. **International Immunopharmacology**, v. 2, p. 1647-56, 2002.
- JANTSCHKO W. et al. Redox intermediates of plant and mammalian peroxidases: a comparative transient-kinetic study of their reactivity toward indole derivatives. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 398, p. 12-22, 2002.
- JANTSCHKO, W. et al. Exploitation of the unusual thermodynamic properties of human myeloperoxidase in inhibitor design. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, p. 1149-1157, 2005.
- JOHNSTON, J. A. et al. Formation of high molecular weight complexes of mutant Cu,Zn-superoxide dismutase in a mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 12571-12576, 2000.
- KAGAN, V. E. et al. Targeting nitroxides to mitochondria: location, location, location, and ...concentration: highlight commentary on "Mitochondria superoxide dismutase mimetic inhibits peroxide-induced oxidative damage and apoptosis: role of mitochondrial superoxide". **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 43, p. 348-350, 2007.
- KAMATA, H.; HIRATA, H. Redox regulation of cellular signaling. **Cellular Signaling**, v. 11, p. 1-14, 1999.
- KARSTEN, U.; WOLLENBERGER, A. Improvements in the ethidium bromide. Methods for direct fluorometric estimation of DNA and RNA in cell and tissue homogenates. **Analytical Biochemistry**, v. 77, p. 464-470, 1976.
- KAUR, H.; LEUNG, K. H. W.; PERKINS, M. J. A water soluble nitroso-aromatic spin-trap. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, v. 3, p. 142-143, 1981.

- KEBIR, D. E. et al. Myeloperoxidase delays neutrophil apoptosis through CD11b/CD18 integrins and prolongs inflammation. **Circulation Research**, v. 103, p. 352-359, 2011.
- KERMAN, A. et al. Amyotrophic lateral sclerosis is a non-amyloid disease in which extensive misfolding of SOD1 is unique to the familial form. **Acta Neuropathologica**, v. 119, p. 335-344, 2010.
- KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Assays for the chlorination activity of myeloperoxidase. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 502-512, 1994.
- KETTLE, A. J. et al. Inhibition of myeloperoxidase by benzoic acid hydrazides. **Biochemical Journal**, v. 308, p. 559-563, 1995.
- KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Myeloperoxidase: a key regulator of neutrophil oxidant production. **Redox Report**, v. 3, p. 3-15, 1997.
- KETTLE, A. J.; GEDYE, C. A.; WINTERBOURN, C. C. Mechanism of inactivation of myeloperoxidase by 4-aminobenzoic acid hydrazide. **Biochemical Journal**, v. 321, p. 503-508, 1997.
- KHATTAB, M. M. Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, attenuates peroxynitrite- and superoxide anion-enhanced carrageenan-induced paw edema and hyperalgesia: a key role for superoxide anion. **European Journal of Pharmacology**, v. 548, p. 167-173, 2006.
- KISSNER, R. et al. Formation and properties of peroxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis. *Chemical Research in Toxicology*, v. 10, p. 1285-1292, 1997.
- KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, p. 598-625, 2005.
- KLINKE, A. et al. Myeloperoxidase attracts neutrophils by physical forces. **Blood**, v. 117, p. 1350-1358, 2011.
- KNOCK, G. A; WARD, J. P. T. Redox Regulation of Protein Kinases as a Modulator of Vascular Function. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, p. 1531-1547, 2011.
- KRISHNA, M. C. Do Nitroxide Antioxidants Act as Scavengers of O₂^{•-} or as SOD Mimics? **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 26026-26031, 1996.
- KRISHNA, M. C. et al. Studies of structure-activity relationship of nitroxide free radicals and their precursors as modifiers against oxidative damage. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, p. 3477-3492, 1998.
- LAM, M. A. et al. Nitric oxide and nitroxides can act as efficient scavengers of protein-derived free radicals. **Chemical Research of Toxicology**, v. 21, p. 2111-2119, 2008.
- LANZA, F. et al. Does a relationship exist between neutrophil myeloperoxidase deficiency and the occurrence of neoplasms? **Journal of Clinical & Laboratory Immunology**, v. 22, p. 175-180, 1987.
- LARDINOIS, O. M.; ORTIZ DE MONTELLANO, P. R. EPR spin-trapping of a myeloperoxidase protein radical. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 270, p. 199-202, 2000.

- LARDINOIS, O. M. et al. Spin scavenging analysis of myoglobin protein-centered radicals using stable nitroxide radicals: characterization of oxoammonium cation-induced modifications. **Chemical Research of Toxicology**, v. 22, p. 1034-1049, 2009.
- LAU, D. et al. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, p. 431-436, 2005.
- LEINWEBER, B. et al. Aggregation of ALS mutant superoxide dismutase expressed in Escherichia coli. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 36, p. 911-918, 2004.
- LESLIE, N. R. The redox regulation of PI 3-kinase-dependent signaling. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, p. 1765-1774, 2006.
- LEVINE, R. L.; MOSKOVITZ, J.; STADTMAN, E. R. Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. **IUBMB Life**, v. 50, p. 301-307, 2000.
- LIN, J. H.; LU, A. Y. H. Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development. **Pharmacology Reviews**, v. 49, p. 403-449, 1997.
- LINARES, E.; GIORGIO, S.; AUGUSTO, O. Inhibition of in vivo leishmanicidal mechanisms by tempol: nitric oxide down-regulation and oxidant scavenging. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 44, p. 1668-1676, 2008.
- LINARES, E. et al. Tempol moderately extends survival in a hSOD1^{G93A} rat model of ALS inhibiting neuronal loss, oxidative damage and levels of non-native hSOD1^{G93A} forms. submetido para **PLoS ONE**, 2012.
- LIOCHEV, S. I.; FRIDOVICH, I. Copper, zinc superoxide dismutase and H₂O₂. Effects of bicarbonate on inactivation and oxidations of NADPH and urate, and on consumption of H₂O₂. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 34674-34678, 2002.
- MALLE, E.; BUCH, T.; GRONE, H-J. Myeloperoxidase in kidney disease. **Kidney International**, v. 64, p. 1956-1967, 2003.
- MALLE, E. et al. Modification of low-density lipoprotein by myeloperoxidase-derived oxidants and reagent hypochlorous acid. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1761, p. 392-415, 2006.
- MALLE, E. et al. Myeloperoxidase: a target for new drug development?. **British Journal of Pharmacology**, v. 152, p. 838-854, 2007.
- MARQUEZ, L. A.; DUNFORD, H. B.; VAN WART, H. Kinetic studies on the reaction of compound II of myeloperoxidase with ascorbic acid. Role of ascorbic acid in myeloperoxidase function. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 5666-5670, 1990.
- MARQUEZ, L. A.; HUANG, J. T.; DUNFORD, H. B. Spectral and kinetic studies on the formation of myeloperoxidase compounds I and II: roles of hydrogen peroxide and superoxide. **Biochemistry**, v. 33, p. 1447-1454, 1994a.
- MARQUEZ, L. A.; DUNFORD, B. H. Chlorination of taurine by myeloperoxidase. Kinetic evidence for an enzyme-bound intermediate. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 7950-7956, 1994b.

- MARQUEZ, L. A.; DUNFORD, B. H. Interaction of acetaminophen with myeloperoxidase intermediates: optimum stimulation of enzyme activity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 305, p. 414-420, 1993.
- MARQUEZ, L. A.; DUNFORD, H. B. Kinetics of oxidation of tyrosine and dityrosine by myeloperoxidase compounds I and II. Implications for lipoprotein peroxidation studies. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 30434-30440, 1995.
- MAY, J. M. et al. Ascorbic acid decreases oxidant stress in endothelial cells caused by the nitroxide tempol. **Free Radical Research**, v. 39, p. 195-202, 2005.
- MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, p. 6049-6055, 1969.
- MEDINAS, D. B. et al. The carbonate radical and related oxidants derived from bicarbonate buffer. **IUBMB Life**, v. 59, p. 255-262, 2007.
- MEDINAS, D. B. et al. Peroxymonocarbonate and carbonate radical displace the hydroxyl-like oxidant in the SOD1 peroxidase activity under physiological conditions. **Chemical Research in Toxicology**, 2009 v. 22, p. 639-648, 2009.
- MEDINAS, D. B. et al. A ditryptophan cross-link is responsible for the covalent dimerization of human superoxide dismutase 1 during its bicarbonate-dependent peroxidase activity. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 49, p. 1046-53, 2010.
- MENDES, P. Biochemistry by numbers: simulation of biochemical pathways with GEPASI 3. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, p. 361-363, 1997.
- MONTI, E. et al. Nitroxide TEMPOL impairs mitochondrial function and induces apoptosis in HL60 cells. **The Journal of Cellular Biochemistry**, v. 82, p. 271-276, 2001.
- MORLEY, S. C. The Actin-Bundling Protein L-Plastin: A Critical Regulator of Immune Cell Function. **International Journal of Cell Biology**, v. 2012, 2012.
- MORRIS, C. J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. **Methods in Molecular Biology**, v. 225, p. 115-121, 2003.
- MORRIS, J. C. The acid ionization constant of HClO from 5 to 35°. **Journal of Physical Chemistry**, v. 70, p. 3798-805, 1966.
- MOSKOVITZ, J. et al. Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, p. 12920-12925, 2001.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods** v. 65, p. 55-63, 1983.
- MÜTZE, S. et al. Myeloperoxidase-derived hypochlorous acid antagonizes the oxidative stress-mediated activation of iron regulatory protein 1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 40542-40549, 2003.

- MULLIGAN, V. K.; KERMAN, A.; HO, S.; CHAKRABARTTY A. Denaturational stress induces formation of zinc-deficient monomers of Cu,Zn superoxide dismutase: implications for pathogenesis in amyotrophic lateral sclerosis. **Journal of Molecular Biology**, v. 383, p. 424-436, 2008.
- NAKAO, L. S. et al. Metabolism of acetaldehyde to methyl and acetyl radicals: in vitro and in vivo electron paramagnetic resonance spin-trapping studies. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 29, p. 721-729, 2000.
- NAUSEEF, W. M. Myeloperoxidase biosynthesis by a human promyelocytic leukemia ct insight into myeloperoxidase deficiency. **Blood** v. 67, n. 30, p. 865-872, 1986.
- NOVAK, I. et al. Electronic structure of persistent radicals: nitroxides. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 69, p. 7628-7634, 2004.
- NYSTRÖM, T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. **EMBO Journal**, v. 24, p. 1311-1317, 2005.
- OECD. Partition Coefficient (n-octanol/water), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method. **Guideline for the testing of chemical**. 117, 2006.
- OGUSUCU, R. et al. Reactions of yeast thioredoxin peroxidase I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite. Rate constants by competitive kinetics. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 42, p. 326-334, 2007.
- ORHAN, H. et al. Simultaneous determination of tyrosine, phenylalanine and deoxyguanosine oxidation products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry as non-invasive biomarkers for oxidative damage. **Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 799, p. 245-254, 2004.
- PICK, E.; MIZEL, D. J. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **Journal of Immunological Methods**, v. 46, p. 211-226, 1981.
- PIRES, J. R. et al. Investigation of 5-Nitrofurán Derivatives: Synthesis, Antibacterial Activity and Quantitative Structure-Activity Relationships. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 3673- 3681, 2001.
- PLANAS, A. M. et al. Certain forms of matrix metalloproteinase-9 accumulate in the extracellular space after microdialysis probe implantation and middle cerebral artery occlusion/reperfusion. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 22, p. 918-925, 2002.
- PODREZ, E. A.; ABU-SOUD, H. M.; HAZEN, S. L. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 28, p. 1717-1725, 2000.
- PRAST-NIELSEN, S. et al. Inhibition of thioredoxin reductase 1 by porphyrins and other small molecules identified by a high-throughput screening assay. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 50, p. 1114-1123, 2011.
- RAKHIT, R. et al. An immunological epitope selective for pathological monomer-misfolded SOD1 in ALS. **Nature Medicine**, v. 13, p. 754-759, 2007.

- RALSTON, I. M.; DUNFORD, H. B. Horseradish peroxidase. XLII. Oxidations of L-tyrosine and 3,5-diiodo-L-tyrosine by compound II. **Canadian Journal of Biochemistry**, v. 58, p. 1270-1276, 1980.
- RAMIREZ, D. C.; GOMEZ MEJIBA, S. E.; MASON, R. P. Mechanism of hydrogen peroxide-induced Cu, Zn-superoxide dismutase-centered radical formation as explored by immunospin trapping: the role of copper- and carbonate radical anion-mediated oxidations. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 38, p. 201-214, 2005.
- RAMOS, D. R. et al. Myeloperoxidase-catalyzed taurine chlorination: initial versus equilibrium rate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 466, p. 221-233, 2007.
- REES, M. D. et al. Inhibition of myeloperoxidase-mediated hypochlorous acid production by nitroxides. **Biochemical Journal**, v. 421, p. 79-86, 2009.
- RHEE, S. G. et al. Hydrogen Peroxide: A Key Messenger That Modulates Protein Phosphorylation Through Cysteine Oxidation. Science Signaling: **Journal and Knowledge Environment**, v. 2000, p. pe1, 2000.
- RHEE, S. G. Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 17, p. 183-189, 2005.
- RHEE, S. G. Cell signaling. H_2O_2 , a necessary evil for cell signaling. **Science**, v. 312, p. 1882-1883, 2006.
- ROBERTS, B. R. et al. Structural characterization of zinc-deficient human superoxide dismutase and implications for ALS. **Journal of Molecular Biology**, v. 373, p. 877-890, 2007.
- ROGERS, D. F.; BOSCHETTO, P.; BARNES, P. J. Plasma exudation: correlation between Evans blue dye and radiolabelled albumin in guinea pig airways in vivo. **Journal of Pharmacological Methods**, v. 21, p. 309-315, 1989.
- SALVEMINI, D. et al. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 118, p. 829-838, 1996.
- SAMPSON, J. B.; BECKMAN, J. S. Hydrogen peroxide damages the zinc-binding site of zinc-deficient Cu,Zn superoxide dismutase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 392, p. 8-13, 2001.
- SAMPSON, J. B. et al. Myeloperoxidase and horseradish peroxidase catalyze tyrosine nitration in proteins from nitrite and hydrogen peroxide. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 356, p. 207-213, 1998.
- SAMUNI, A. et al. Kinetics and mechanism of hydroxyl radical and OH-adduct radical reactions with nitroxides and with their hydroxylamines. **Journal of the American Society**, v. 124, p. 8719-8724, 2002.
- SAMUNI, Y. et al. Factors Influencing Nitroxide Reduction and Cytotoxicity In Vitro. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 6, p. 587-595, 2004.
- SANKARAPANDI, S.; ZWEIER, J. L. Bicarbonate is required for the peroxidase function of Cu, Zn-superoxide dismutase at physiological pH. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 1226-1232, 1999.

- SATO, K. et al. Hydroxyl radical production by H_2O_2 plus Cu,Zn-superoxide dismutase reflects the activity of free copper released from the oxidatively damaged enzyme. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 25371-25377, 1992.
- SCHALLREUTER, K. U.; WOOD, J. M. The role of thioredoxin reductase in the reduction of free radicals at the surface of the epidermis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 36, p. 630-637, 1986.
- SCHREIER, S. et al. The spin label amino acid TOAC and its uses in studies of peptides: chemical, physicochemical, spectroscopic, and conformational aspects. **Biophysical Reviews**, v. 4, p. 45-66, 2012.
- SHANNON, L. M.; KAY, E.; LEW, J. Y. Peroxidase Isozymes from horseradish roots I. Isolation and physical properties. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 241, p. 2166-2172, 1966.
- SOUBHYE, J. et al. Structure-based design, synthesis, and pharmacological evaluation of 3-(aminoalkyl)-5-fluoroindoles as myeloperoxidase inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, p. 8747-8759, 2010.
- SOULE, B. P. et al. The chemistry and biology of nitroxide compounds. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 42, p. 1632-1650, 2007.
- SOUZA, D. A. et al. Synthesis, crystal structure, magnetism and electrochemical properties of two copper (II) furoyltrifluoroacetate complexes with nitroxide radical. **Inorganica Chimica Acta (Testo stampato)**, v. 370, p. 469-473, 2011.
- SPALTEHOLZ, H.; PANASENKO, O. M.; ARNHOLD, J. Formation of reactive halide species by myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 445, p. 225-234, 2006.
- STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current Protocols in Immunology**, v. 21, p. A.3B.1-A.3B.2, 2001.
- SYMONYAN, M.; NALBANDYAN, R. Interaction of hydrogen peroxide with superoxide dismutase from erythrocytes. **FEBS Letters**, v. 28, p. 22-24, 1972.
- TAUBER, A. L. Protein kinase C and the activation of the human neutrophil NADPH-oxidase. **Blood**, v. 69, p. 711-720, 1987.
- THIEMERMANN, C. Membrane-permeable radical scavengers (tempol) for shock, ischemia-reperfusion injury, and inflammation. **Critical Care Medicine**, v. 31, p. S76-84, 2003.
- TIEN, J. Myeloperoxidase-catalysed oxidation of tyrosine. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 367, p. 61-66, 1999.
- TRNKA, J. et al. A mitochondria-targeted nitroxide is reduced to its hydroxylamine by ubiquinol in mitochondria. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 44, p. 1406-1419, 2008.
- TSUHAKO, M. H. et al. Tempol ameliorates murine viral encephalomyelitis by preserving the blood-brain barrier, reducing viral load, and lessening inflammation. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 48, p. 704-712, 2010.

- USHIO-FUKAI, M. Compartmentalization of redox signaling through NADPH oxidase-derived ROS. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, p. 1289-1299, 2009.
- VALENTINE, J. S.; DOUCETTE, P. A.; POTTER, S. Z. Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 74, p. 563-593, 2005.
- VAN DALEN, C. J. et al. Nitrite as a substrate and inhibitor of myeloperoxidase: implications for nitration and hypochlorous acid production at sites of inflammation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 11638-11644, 2000.
- VAZ, S. M.; AUGUSTO, O. Inhibition of myeloperoxidase-mediated protein nitration by tempol: Kinetics, mechanism, and implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 8191-8196, 2008.
- VAZ, S. M. et al. Oxidation and nitration of ribonuclease and lysozyme by peroxynitrite and myeloperoxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 484, p. 127-133, 2009.
- VINEGAR, R. et al. Development of carrageenan pleurisy in the rat: effects of colchicine on inhibition of cell mobilization. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 168, p. 24-33, 1981.
- VOGEL, A. I. Oxidation-reduction reaction. In Vogel's Macro and semimicro qualitative inorganic analysis. London: Longman, 1979. Editado por G. Svehla.
- WANG, H.; JOSEPH, J. A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 27, p. 612-616, 1999.
- WILCOX, C. S.; PEARLMAN, A. Chemistry and antihypertensive effects of tempol and other nitroxides. **Pharmacology Reviews**, v. 60, p. 418-469, 2008.
- WILCOX, C. S. Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 126, p. 119-145, 2010.
- WINTERBOURN, C. C. The ability of scavengers to distinguish $^{\bullet}\text{OH}$ production in the iron-catalyzed Haber-Weiss reaction: comparison of four assays for $^{\bullet}\text{OH}$. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 3, p. 33-39, 1987.
- WINTERBOURN, C. C.; VISSERS, M. C. M.; KETTLE, A. J. Myeloperoxidase. **Current Opinion in Hematology**, v. 7, p. 53-58, 2000.
- WINTERBOURN, C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. **Nature Chemical Biology**, v. 4, p. 278-286, 2008.
- WITTMANN, S.; FRÖHLICH, D.; DANIELS, S. Characterization of the human fMLP receptor in neutrophils and in *Xenopus* oocytes. **British Journal of Pharmacology**, v. 135, p. 1375-1382, 2002.
- WRIGHT, P. J.; ENGLISH, A. M. Scavenging with TEMPO* to identify peptide- and protein-based radicals by mass spectrometry: advantages of spin scavenging over spin trapping. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, p. 8655-8665, 2003.
- WRONA, M.; PATEL, K.; WARDMAN, P. Reactivity of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms toward carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 38, p. 262-270, 2005.

- WRONA, M.; PATEL, K.; WARDMAN, P. Reactivity of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms toward carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 38, p. 262-270, 2005.
- YIM, M. B.; CHOCK, P. B.; STADTMAN, E. R. Copper,zinc superoxide dismutase catalyzes hydroxyl radical production from hydrogen peroxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, p. 5006-5010, 1990.
- YIN, W. et al. Conversion of the 2,2,6,6-tetramethylpiperidine moiety to a 2,2-dimethylpyrrolidine by cytochrome P450: evidence for a mechanism involving nitroxide radicals and heme iron. **Biochemistry**, v. 43, p. 5455-5466, 2004.
- ZENG, J.; FENNA, R. E. X-ray crystal structure of canine myeloperoxidase at 3 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 226, p. 185-207, 1992.
- ZHANG, H. et al. Bicarbonate-dependent peroxidase activity of human Cu,Zn-superoxide dismutase induces covalent aggregation of protein: intermediacy of tryptophan-derived oxidation products. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 24078-24089, 2003.
- ZHANG, H. et al. The carbonate radical anion-induced covalent aggregation of human copper, zinc superoxide dismutase, and alpha-synuclein: intermediacy of tryptophan- and tyrosine-derived oxidation products. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 36, p. 1355-1365, 2004.
- ZHANG, H. et al. The carbonate radical anion-induced covalent aggregation of human copper, zinc superoxide dismutase, and alpha-synuclein: intermediacy of tryptophan- and tyrosine-derived oxidation products. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 36, p. 1355-1365, 2004a.
- ZHANG, J. et al. Mass spectral evidence for carbonate-anion-radical-induced posttranslational modification of tryptophan to kynurenine in human Cu,Zn superoxide dismutase. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 37, p. 2018-2026, 2004b.
- ZHAO, H. et al. Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 34, p. 1359-1368, 2003.
- ZHOU, M. et al. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. **Analytical Biochemistry**, v. 253, p. 162-168, 1997.
- ZIELONKA, J. et al. Mechanistic similarities between oxidation of hydroethidine by Fremy's salt and superoxide: stopped-flow optical and EPR studies. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 39, p. 853-863, 2005.
- ZIELONKA, J.; VASQUEZ-VIVAR, J.; KALYANARAMAN, B. Detection of 2-hydroxyethidium in cellular systems: a unique marker product of superoxide and hydroethidine. **Nature Protocols**, v. 3, p. 8-21, 2008.
- ZUURBIER, K. W. et al. Human hemi-myeloperoxidase. Initial chlorinating activity at neutral pH, compound II and III formation, and stability towards hypochlorous acid and high temperature. **European Journal of Biochemistry**, v. 205, p. 737-742, 1992.

Súmula Curricular

Dados Pessoais:

Raphael Ferreira Queiroz

Vitória da Conquista-BA, 25 de dezembro de 1986

Formação acadêmica:

Fundamental:

1991-2000 Escola Padre Cícero, Vitória da Conquista-BA

Médio:

2001-2003 Centro Federal de Educação Tecnológica da Bahia (CEFET)
Vitória da Conquista-BA

Superior:

2004-2007 Universidade Federal de Alfenas, Alfenas-MG
Farmácia

Formação complementar:

2007-2008 Universidade Federal de Alfenas, Alfenas-MG
Habilitação em Análises Clínicas

Ocupação:

Bolsista de doutorado direto, CNPq, 2008-2012, para desenvolvimento do projeto intitulado “Estudos *in vitro* e *in vivo* dos mecanismos pelos quais nitróxidos cíclicos inibem lesões oxidativas”, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Ohara Augusto.

Publicações:

Resumos em congressos nacionais:

- **Queiroz**, R.F.; Augusto, O. (2012), Inhibition by tempol of neutrophil and neutrophil-like cell chemotaxis in cultures: A role for oxidants?. In: II Annual Congresso do Instituto de Química-USP. Guarujá.
- Pietro, T; Sousa, F.L.; **Queiroz**, R.F.; Nascimento, O.R.; Nantes, I.L. (2010), A24 Acid-base catalyst in the MP-8 reaction rate Constant associated to cationic interfaces. In: XXXIX Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq). Foz do Iguaçu.

- **Queiroz**, R.F.; Malvezzi, A.; Vaz, S.M. Amaral, At-do.; Jordão, A.K.; Cunha, A.; Ferreira, V.; Augusto, O. (2009), Inhibition of the chlorinating activity of myeloperoxidase by tempol. In: XXXVIII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq). Águas de Lindóia.
- **Queiroz**, R.F.; Vidigal, M.B.; Moreira, F.; Moreira, D.A.C.; Nunes, T.A.S.; Silva, L.; Avelino, C.C. (2008), T101 Lipid and glycemic plasma levels of diabetic rats treated with dietary fiber from passion fruit (*Passiflora edulis*). In: 20th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, XXXV Brazilian Congress of Clinical Analysis and VIII Brazilian Congress of Clinical Cytology, 2008, Fortaleza. 20th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, XXXV Brazilian Congress of Clinical Analysis and VIII Brazilian Congress of Clinical Cytology. New York : Walter de Gryter, 46:S1-S859.
- **Queiroz**, R.F.; Maximiano, F.P.; Nunes, T.A.S.; Moreira, D.A.C.; Azevedo, L.; Silva, L.B.C. (2008), Lipid and glycemic plasma levels of diabetic rats treated with dietary fiber from passion fruit (*Passiflora Edulis*). In: XXXVII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), XI Congress of Pan American Association for Biochemistry and Molecular Biology (PABMB). Águas de Lindóia.
- **Queiroz**, R.F.; Maximiano, F.P.; Nunes, T.A.S.; Alves, L.C.; Brigagão, M.R.P.; Schneedorf, J.M.; Silva, L.B.C.; Azevedo, L.; Moreira, D.A.C. (2008), Lipid and glycemic plasma levels of diabetic rats treated with dietary fiber from passion fruit (*Passiflora Edulis*). In: VI Jornada Científico-Cultural dos grupos PET da UNIFAL-MG. Alfenas.

Resumos em congressos internacionais:

- **Queiroz**, R.F.; Jordão, A.K.; Cunha, A.C.; Ferreira, V.F.; Brigagão, M.R.P.L.; Malvezzi, A. ; Amaral, A.T-do.; Augusto, O. (2011), Nitroxides attenuate carrageenan-induced inflammation in rat paws by reducing edema, protein nitro-oxidation, MPO and albumin levels in a lipophilicity-dependent manner. 19th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine, Atlanta, Georgia, November, 16-30.

- Almeida, P.D.O.; **Queiroz**, R.F.; Arriaga, A.M.C.; Vasconcelos, J.N.E., Augusto, O.; Lima, E.S. (2011), Down-regulation of human neutrophil chemotaxis by quercetin. VII Meeting of the South American Group of the Society for Free Radical Biology and Medicine, São Pedro, São Paulo, August 13-21.
- Paviani, V.; dos Prazeres, J.N.; **Queiroz**, R.F.; Augusto, O. (2011), Oxidative post-translational modifications of lysozyme treated with a carbonate radical generator. VII Meeting of the South American Group of the Society for Free Radical Biology and Medicine, São Pedro, São Paulo, August 13-21.
- Silva, D.F.; Coelho, F.R.; **Queiroz**, R.F.; Augusto, O. (2011), Oxidative and structural modifications of hSOD1 resulting from its carbon dioxide-dependent peroxidase activity. VII Meeting of the South American Group of the Society for Free Radical Biology and Medicine, São Pedro, São Paulo, August 13-21.
- Augusto, O.; **Queiroz**, R.F.; Vaz, S.M.; Malvezzi, A.; T-do Amaral, A.; Jordão, A.K.; Cunha, A.C.; Ferreira, V.F. (2009), Inhibition of the chlorinating activity of myeloperoxidase by nitroxides. 6th International Human Peroxidase Meeting, Chapel Hill, North Caroline, April 19-22.

Artigos completos:

- **Queiroz**, R.F.; Jordão, A.K.; Cunha, A.C.; Ferreira, V.F.; Brigagão, M.R.P.L.; Malvezzi, A.; Amaral, A.T.-do; Augusto, O. (2012), Nitroxides attenuate carrageenan-induced inflammation in rat paws by reducing neutrophil infiltration and the resulting myeloperoxidase-mediated damage. Free Radical Biology and Medicine. (aceito para publicação).
- **Queiroz**, R.F.; Vaz, S.M.; Augusto, O. (2011), Inhibition of the chlorinating activity of myeloperoxidase by tempol: Revisiting the kinetics and mechanisms. Biochemical Journal. 439:423-431; 2011.
- Malvezzi*, A; **Queiroz***, R.F; de-Rezende, L; Augusto, O; Amaral, AT.-do (2011), MPO Inhibitors Selected by Virtual Screening. Molecular Informatics. 30:605-613. (***autoria igualitária**).
- **Queiroz**, R.F.; Maximiano, F.P.; Nunes, T.A.S. Moreira, D.A.C.; Azevedo, L.; Silva, L.B.C. (2008), Avaliação do perfil lipídico, glicêmico, conteúdo de glicogênio hepático e cardíaco em ratos diabéticos suplementados com

farinha de casca de maracujá (*Passiflora edulis*). Revista Brasileira de Nutrição Clínica. 23:173-177.

-

Artigos em preparação:

- **Queiroz**, R.F.; Augusto, O. (2012), Inhibition by tempol of neutrophil and neutrophil-like cell chemotaxis in cultures: A role for oxidants?.
- **Queiroz**, R.F.; Linares, E.; Augusto, O. (2012), Tempol inhibits hSOD1 modifications resulting from its bicarbonate-carbon dioxide-dependent peroxidase activity.
- **Queiroz**, R.F.; Arriaga, A.M.C.; Vasconcelos, J.N.E., Lima, E.S; Augusto, O. (2012), Down-regulation of neutrophil chemotaxis by bergenin: Inhibition of actin polymerization.

Prêmios e distinções:

- 2011: Prêmio viagem da Society for Free Radical Biology and Medicine (South American Group) para apresentar o trabalho “Inhibition of the chlorinating activity of myeloperoxidase by tempol: Revisiting the kinetics and mechanisms”. (comunicação oral).
- 2010: Prêmio de melhor poster na area de Enzimas da XXXIX Annual Meeting of the Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society por apresentar o trabalho “Reactions of tempol with myeloperoxidase: re-evaluation of rate constants”.