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

ÁLBERT SOUZA PEIXOTO

**Oxidação da proteína dissulfeto isomerase por
peroxinitrito: cinética, produtos e implicações
biológicas.**

Versão original da Dissertação/Tese

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

05/09/2017

ÁLBERT SOUZA PEIXOTO

**Oxidação da proteína dissulfeto isomerase por
peroxinitrito: cinética, produtos e implicações
biológicas.**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Ciências
(Bioquímica).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ohara Augusto

São Paulo

2017

*Aos meus pais, Jussiará e Zenildo
pelo amor incondicional e incentivo.*

AGRADECIMENTO(S)

Inicialmente quero agradecer a Deus pela vida e por todos milagres alcançados.

Aos meus pais Jussiarra e Zenildo e ao meu irmão Tácio por fazerem meus sonhos se tornarem realidade e por todo carinho, incentivo e apoio durante todos estes anos. Eu amo vocês.

Aos meus tios Manoel e Cida e ao meu primo Bruno, minhas referências em São Paulo, obrigado pelo cuidado e carinho.

A toda minha família, grandes incentivadores que sempre acreditaram e torceram por mim, muito obrigado por tudo, tenho orgulho de fazer parte desta família.

A minha orientadora, Professora Ohara Augusto pela orientação durante estes dois anos e pelo exemplo de competência e profissionalismo. Obrigado por acreditar e confiar em mim.

Aos meus colegas e amigos de laboratório: Fernando, Verônica, Dani, Ryan, Berê, Edlaine, Janaína e Gabriel pela convivência e colaboração.

Aos amigos, Ray, Marcela, João, Isabela, Lucas, Adriano, Marcos, Sandro e Henrique pela amizade verdadeira. Vocês sempre poderão contar comigo, obrigado por todo apoio, incentivo, colaboração e por ouvir minhas angústias e meus anseios.

À profª Flávia Meotti pelas discussões científicas, colaborações e, sobretudo, pela amizade.

Aos professores, Luiz Netto, Francisco Laurindo, Sayuri, Graziella, Sandro e Alicia pelo empréstimo de reagentes/equipamentos, colaborações, discussões científicas e sugestões/conselhos.

À Dra. Ana Lochabel por toda atenção e tempos dedicados para auxiliar-me na expressão da proteína.

Ao amigo, professor e conselheiro Dr. Raphael Queiroz, pela amizade, colaboração, discussões científicas, conselhos e por todo apoio desde o final da graduação para que eu chegasse até o mestrado. Muito obrigado!

Aos amigos e professores da graduação, Gildomar, Leandra, Carla e Rafael por todo conhecimento compartilhado, sem vocês esta caminhada não estaria findada.

Aos amigos de São Paulo, especialmente William por todo companheirismo, convivência e sempre torcer por mim.

Aos eternos amigos de Itabuna e Jequié que sempre me apoiaram e torceram pelos meus objetivos. Vocês jamais serão esquecidos.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado e à FAPESP e CEPID Redoxoma pelo apoio financeiro.

A todos os demais que aqui não foram citados, porém jamais serão esquecidos, muito obrigado por terem feito parte desta caminhada.

RESUMO

Peixoto, A.S. **Oxidação da proteína dissulfeto isomerase por peroxinitrito: cinética, produtos e implicações biológicas.** 2017. 94p. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Proteína dissulfeto isomerase (PDI) é uma ditiol-dissulfeto óxido redutase ubíqua que é responsável por uma série de funções celulares, inclusive na sinalização celular e nas respostas a eventos que causam dano celular. Entretanto, a PDI pode se tornar disfuncional através das modificações pós-traducionais, incluindo as promovidas por oxidantes biológicos. Estes oxidantes são provavelmente os responsáveis pelas modificações oxidativas pós-traducionais da PDI que foram detectadas em várias condições associadas ao estresse oxidativo, levando à disfunção da proteína. Devido a falta de estudos cinéticos com a PDI nativa e a falta de caracterização dos produtos dessas reações, investigamos se a diminuição da fluorescência da PDI nativa pode ser empregada para estudos da cinética de oxidação com peróxido de hidrogênio. Posteriormente, investigamos a cinética e os produtos da reação entre PDI e peroxinitrito. Nossos experimentos mostraram que a oxidação por excesso de peróxido de hidrogênio levava a uma diminuição da fluorescência de forma dependente do tempo e da concentração do oxidante, permitindo a determinação da constante de velocidade de segunda ordem ($k = (17,3 \pm 1,3) \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pH 7,4, 25 °C). Relevantemente, mostramos que o processo era totalmente revertido por DDT, mostrando que o peróxido de hidrogênio oxida quase exclusivamente os grupos ditióis da PDI (Cys⁵³ e Cys⁵⁶ e Cys³⁹⁷ e Cys⁴⁰⁰). Utilizando a mesma abordagem para estudar a oxidação da PDI por peroxinitrito, notamos que o decréscimo da fluorescência intrínseca da PDI nativa e a velocidade só era proporcional às concentrações sub-estequiométricas ou estequiométricas do oxidante em relação aos tióis reativos da PDI. Somente nessas condições o processo se mostrava reversível por DDT, indicando que os ditióis da PDI eram o alvo preferencial do peroxinitrito mas que a oxidação de outros resíduos também ocorria. A reação dos tióis reativos da PDI com peroxinitrito foi considerada relativamente rápida ($6,9 \pm 0,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pH 7,4, 25 °C), e os resíduos de Cys reativos dos domínios a e a' aparentam reagir com constantes de velocidade similares. Experimentos de proteólise limitada, simulações cinética e análises de MS e MS/MS confirmaram que o peroxinitrito oxida preferencialmente os tióis redox ativos da PDI para os ácidos sulfênicos correspondentes, que, subsequentemente, reagem com os tióis vizinhos, produzindo dissulfetos (Cys⁵³-Cys⁵⁶ e Cys³⁹⁷-Cys⁴⁰⁰). Entretanto, uma fração de peroxinitrito decai para radicais levando à hidroxilação e nitração de outros resíduos próximos ao sítio redox ativo (Trp⁵², Trp³⁹⁶ e Tyr³⁹³). Assim, investigamos também a oxidação da PDI por excesso de peroxinitrito em relação aos grupos tióis reativos por diferentes metodologias. Experimentos de SDS-PAGE, western-blot e atividade redutase mostraram que o peroxinitrito promove inativação, nitração e agregação da PDI de forma dependente da concentração de peroxinitrito. Análises de MS e MS/MS mostraram que, em excesso, o peroxinitrito promove nitração (Tyr⁴³, Tyr⁴⁹, Tyr¹⁹⁶, Tyr³⁹³, Trp⁵², Trp³⁹⁶) e hidroxilação (Trp⁵², Trp³⁹⁶) da PDI. Em síntese, nossos estudos contribuem para melhor compreensão da oxidação da PDI por peroxinitrito e de suas possíveis consequências biológicas.

Palavras-chave: Proteína dissulfeto isomerase, peroxinitrito, cinética, oxidação de tióis nitração, agregação.

ABSTRACT

Peixoto, A.S. **Oxidation of the protein disulfide isomerase by peroxynitrite: kinetics, products and biological implication.** 2017. 94p. Msc. Dissertation – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Protein disulfide isomerase (PDI) is a ubiquitous dithiol-disulfide oxidoreductase that performs an array of cellular functions, including in cellular signaling and responses to cell-damaging events. Nevertheless, PDI can become dysfunctional by post-translational modifications, including those promoted by biological oxidants. These oxidants are likely responsible for the oxidative post-translational modifications of PDI, which have been detected under various conditions associated with oxidative stress, leading to protein dysfunction. However, the kinetics of the reactions of PDI with biological oxidants received limited studies and the products of these reactions were not characterized. Here, we examined whether the decrease in PDI fluorescence can be employed to follow the kinetics of the reaction of the full-length protein with biological oxidants. Also, we investigated the kinetics and products of the reaction between PDI and peroxynitrite. Our experiments showed that oxidation by excess hydrogen peroxide led to a decrease of PDI intrinsic fluorescence in a time- and concentration-dependent manner, permitting the determination of the second-order rate constant of the reaction ($k = (17.3 \pm 1.3) \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pH 7.4, 25 ° C). The oxidation was reversed by DDT, indicating that hydrogen peroxide oxidizes mainly PDI dithiols (Cys⁵³ and Cys⁵⁶ and Cys³⁹⁷ and Cys⁴⁰⁰). Using the same approach to study PDI oxidation by peroxynitrite we noted that the decrease of the native PDI fluorescence was proportional to sub-stoichiometric or stoichiometric concentrations of the oxidant relative to that of PDI reactive thiols. Only under these conditions, PDI oxidation was reversed by DDT, indicating that PDI dithiols were the preferred target of peroxynitrite but that oxidation of other residues also occurred. The reaction of the active redox thiols of the PDI with peroxynitrite can be considered relatively fast ($6.9 \pm 0.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, pH 7.4, 25 ° C), and the reactive Cys residues of domains a and a' were kinetically indistinguishable. Limited proteolysis experiments, kinetic simulations, and MS and MS/MS analyses confirmed that peroxynitrite preferentially oxidizes the redox-active Cys residues of PDI to the corresponding sulfenic acids, which subsequently react with the resolving thiols to produce disulfides (Cys⁵³-Cys⁵⁶ and Cys³⁹⁷-Cys⁴⁰⁰). However, a fraction of peroxynitrite decays to radicals leading to hydroxylation and nitration to other residues located close to the active site (Trp52, Trp396 and Tyr393). SDS-PAGE, western blotting and inhibition of the reductase activity experiments confirmed that excess peroxynitrite promotes further PDI oxidation, nitration, inactivation and aggregation in a concentration-dependent manner. MS and MS/MS analyses showed that peroxynitrite in a ten times excess relative to PDI reactive thiols promote PDI nitration (Tyr43, Tyr49, Tyr196, Tyr393, Trp52, Trp396) and hydroxylation (Trp52, Trp396). In conclusion, our studies contribute to a better understanding of PDI oxidation by peroxynitrite and its possible biological consequences.

Keywords: Protein disulfide isomerase, peroxynitrite, kinetics, thiol oxidation, protein nitration, protein aggregation.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	MODIFICAÇÕES OXIDATIVAS PÓS-TRADUCIONAIS DE PROTEÍNAS	12
1.2	PROTEÍNA DISSULFETO ISMERASE (PDI)	14
1.3	PEROXINITRITO	18
2	OBJETIVOS	21
3	MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1	MATERIAIS	22
3.2	MÉTODOS	23
3.2.1	Expressão e purificação da PDI	23
3.2.2	Quantificação de proteína	23
3.2.3	Redução da PDI	23
3.2.4	Alquilação da PDI	24
3.2.5	Quantificação de tióis reduzidos da PDI pelo ensaio do DTDP	24
3.2.6	Estudos cinéticos da reação de PDI com peróxido de hidrogênio	24
3.2.7	Estudos cinéticos de oxidação da PDI por peroxinitrito	25
3.2.8	Simulações cinéticas	26
3.2.9	Determinação das relações entre nitração, inativação e agregação da PDI promovidas por peroxinitrito	26
3.2.10	Análise das modificações oxidativas da PDI promovidas por peroxinitrito utilizando HPLC/ESI/MSMS após digestão trípica	29
3.2.11	Análise estatística	31
4	RESULTADOS	32
4.1	ESTUDO CINÉTICO DAS REAÇÕES DE PDI COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E PEROXINITRITO	32
4.1.1	Peróxido de hidrogênio oxida os ditióis da PDI e promove diminuição da fluorescência intrínseca da proteína nativa	32
4.1.2	Peroxinitrito oxida preferencialmente os ditióis da PDI	35
4.2	ASPECTOS MECANÍSTICOS DA REAÇÃO ENTRE PDI E PEROXINITRITO	39
4.2.1	Peroxinitrito preferencialmente oxida os tióis redox ativos da PDI, mas também se decompõem para radicais	39
4.2.2	Caracterização dos produtos de oxidação da PDI por peroxinitrito em condição estequiométrica	44
4.3	OXIDAÇÃO DA PDI POR EXCESSO DE PEROXINITRITO	52

4.3.1	Excesso de peroxinitrito promove nitração, inativação e agregação da PDI.	52
5	DISCUSSÃO	60
6	CONCLUSÃO	69
7	REFERÊNCIAS	71
APÊNDICES		71

1 INTRODUÇÃO

1.1 MODIFICAÇÕES OXIDATIVAS PÓS-TRADUCIONAIS DE PROTEÍNAS

A oxidação de proteínas por oxidantes e radicais livres em sistemas biológicos tem promovido relevantes discussões na literatura porque as proteínas são os principais alvos destas espécies reativas em condições fisiológicas, devido principalmente à sua alta abundância nas células e às altas constantes de velocidade de reação (DAVIES; DEAN, 1997; DAVIES et al., 1999; LINTON; DAVIES; DEAN, 2001).

Estas oxidações ocorrem principalmente nas cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos e no esqueleto proteico (Figura 1). De modo geral, o sítio de ataque na proteína depende de vários fatores, entre eles: (i) a natureza química das espécies reativas, como pode ser visto na figura 1, os oxidantes por dois elétrons reagem preferencialmente com as cadeias laterais, enquanto as espécies radicalares reagem tanto com as cadeias laterais quanto com o esqueleto proteico; (ii) a constante de velocidade de reação da espécie reativa com a molécula alvo; (iii) a concentração da molécula alvo; e (iv) a localização do oxidante em relação ao alvo (DAVIES; HAWKINS, 2004). Em sua maioria, as espécies reativas formadas em sistemas biológicos são espécies eletrofílicas, ou seja, deficientes em elétrons. Por isso os aminoácidos mais susceptíveis à oxidação são aqueles que contêm a cadeia lateral rica em elétrons, como os de cadeias laterais aromáticas: triptofano, tirosina, fenilalanina e histidina e os que contêm enxofre, como: metionina e cisteína (DAVIES, 2005).

Por meio destas reações, as proteínas podem ser modificadas por oxidação de maneira reversível ou irreversível. As oxidações reversíveis ocorrem em aminoácidos que contêm enxofre, como metionina (PMet – S = O) e cisteína (PCys –

SOH, PCys – SO₂H, PCys – S – S – CysP, PCys – SG), e são responsáveis por uma gama de funções fisiológicas. Diversas evidências têm apontado que a oxidação desses resíduos constitui um mecanismo importante de controle da estrutura e da função de várias proteínas envolvidas em vias de sinalização celular (DAVIES, 2005; WINTERBOURN; HAMPTON, 2008; FOMENKO et al., 2011; RHEE et al., 2012). Por outro lado, as modificações que não são reparadas nas células, como nitração, hidroxilação, carbonilação e ligações cruzadas (dirosina e ditriptofano), podem ocasionar perda de função, oligomerização, alteração do *turnover* e agregação, resultando em disfunção celular e tecidual, presente em diversas patologias humanas (Figura 1) (STADTMAN, 2001; DAVIES, 2005, 2016; DALLE-DONNE et al., 2006).

Figura 1. Possíveis sítios de ataques de oxidantes e radicais livres nas proteínas e suas implicações *in vivo* (adaptado de DAVIES, 2005)

1.2 PROTEÍNA DISSULFETO ISOMERASE (PDI)

A proteína dissulfeto isomerase (PDI) é uma ditiol-dissulfeto óxido redutase ubíqua que está localizada principalmente no retículo endoplasmático (RE), mas também tem sido detectada em outros compartimentos celulares, incluindo citoplasma, mitocôndrias e matriz extracelular. A PDI (Figura 2) contém 508 resíduos de aminoácidos organizados em uma estrutura em forma de U contendo domínios sequenciais nomeados a-b-b'-a' e c, este último contendo a sequência C-terminal KDEL de retenção no RE. Os domínios a e a' contêm um motivo redox ativo CGHC cada, enquanto os domínios b e b' na parte inferior do "U" são ricos em resíduos hidrofóbicos envolvidos na ligação da proteína substrato (*client protein*). Através de seus domínios ditiólicos, a PDI está ativamente envolvida no enovelamento de proteínas por oxidação, redução e isomerização de pontes dissulfeto. Além disso, a PDI tem uma função chaperona que não é dependente de atividade redox e, portanto, também participa do enovelamento de proteínas sem pontes dissulfeto. Não surpreende, assim, que a PDI seja considerada uma defesa contra o enovelamento incorreto (*misfolding*) e a agregação de proteínas, que são característicos das chamadas doenças de enovelamento incorreto de proteínas (*misfolding protein diseases*) (SEVIER; KAISER, 2002; WILKINSON; GILBERT, 2004; HATAHET; RUDDOCK, 2009; LAURINDO; PESCATORE; FERNANDES, 2012).

Apesar de suas funções cruciais, as rotas para a formação de pontes dissulfeto nativas são complexas e ainda não totalmente esclarecidas.

Figura 2. Estrutura esquemática da PDI. (A) Organização dos cinco domínios da PDI (a, b, b', a' e c) sendo a e a' os domínios que contêm os motivos redox ativos (WCGHC) e os domínios b e b' os principais sítios de ligação de proteínas substratos. (B) Estrutura cristalográfica da PDI de leveduras (Adaptado de LAURINDO et al., 2008).

Até recentemente, acreditava-se que a principal via para a oxidação do ditiol de uma proteína nascente em eucariotos dependia da oxidação dos ditióis da PDI por membros da família Ero 1 (*ER oxidoreductin 1*), produzindo dissulfetos na PDI, os quais, subsequentemente, oxidavam o ditiol da proteína nascente (Figura 2). O oxidante final desta via que se inicia por oxidação do ditiol da Ero 1 é o oxigênio molecular, o qual é reduzido a peróxido de hidrogênio. Essa reação é rápida porque Ero 1 contém FAD, que pode facilmente interagir com ambos, tióis e oxigênio molecular. Mais recentemente, rotas adicionais para a oxidação da PDI no retículo endoplasmático foram descritas sugerindo que Prdx 4 ou Gpx 7/8 usam o peróxido de hidrogênio gerado pela Ero 1 ou por outras vias não identificadas para a formação de pontes dissulfeto em proteínas nascentes (WILKINSON; GILBERT, 2004; TAVENDER et al., 2008; HATAHET; RUDDOCK, 2009; ZITO et al., 2010). Além disso, oxidantes de baixo peso molecular como o GSSG e o próprio peróxido

de hidrogênio também foram considerados como possíveis oxidantes diretos da PDI no processo de formação de pontes dissulfeto em proteínas nascentes no RE (Figura 3) (KARALA et al., 2009; SAARANEN et al., 2010; LAPPI; RUDDOCK, 2011; RUDDOCK, 2012). Da mesma forma, estudos propuseram que, em outros compartimentos celulares, a PDI regula e interage fisicamente com a NADPH oxidase, uma fonte de ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e, desta forma, é provável que em determinadas situações de estresse oxidativo e inflamação, a PDI esteja sob fluxos de outros oxidantes, como o peroxinitrito (LAURINDO; PESCATORE; FERNANDES, 2012; PESCATORE et al., 2012) .

Embora a oxidação da PDI por oxidantes de baixo peso molecular tenha sido proposta no mecanismo de catálise da enzima, essas oxidações permanecem pouco estudadas. Além disso, oxidantes de baixo peso molecular são provavelmente responsáveis pelas modificações oxidativas pós-traducionais da PDI que foram detectadas em várias células e modelos animais de doenças associadas ao estresse oxidativo (PARAKH; ATKIN, 2015). Por exemplo, a PDI foi detectada S-glutationilada em culturas de células desafiadas com um doador de óxido nítrico (TOWNSEND et al., 2009); S-nitrosada em doenças neurodegenerativas (UEHARA et al., 2006; WALKER et al., 2010; KIM et al., 2014); formando adutos com 4-hidroxinonenal em fígados de ratos tratados com dieta rica em gordura e etanol (CARBONE et al., 2005); carbonilada (RABEK; BOYLSTON; PAPACONSTANTINOU, 2003) e nitrada em camundongos envelhecidos (MARSHALL et al., 2013); e nitrada em biópsias musculares de pacientes com doenças mitocondriais (VATTEMI et al., 2011) e na medula espinhal de camundongos modelo de esclerose lateral amiotrófica (CASONI et al., 2005) (Figura 3). Os fatos acima descritos argumentam por uma maior compreensão da oxidação PDI por oxidantes de baixo peso molecular, dos produtos

e da cinética dessas reações. Por outro lado, a maioria das modificações oxidativas pós-tradução da PDI tem sido detectada pelo uso de anticorpos, uma abordagem que fornece informações estruturais limitadas.

Figura 3. Representação esquemática das possíveis interações de PDI com oxidantes de baixo peso molecular durante o enovelamento de proteínas nascentes no ER (lado esquerdo) e em condições de estresse oxidativo (lado direito).

Os poucos estudos cinéticos disponíveis estão limitados à oxidação do ditiól da PDI por glutathiona oxidada (GSSG) (LAPPI; RUDDOCK, 2011) e por peróxido de hidrogênio (KARALA et al., 2009), que não foram realizados com PDI nativa, mas com o domínio a da PDI mutada (W111F). Este mutante, como mostram estudos, reage com GSSG e peróxido de hidrogênio com constantes de velocidade de segunda ordem de 188 e 9,2 M⁻¹ s⁻¹, respectivamente (KARALA et al., 2009). Outro oxidante biológico, o dehidroascorbato, também oxida lentamente os ditióis da PDI (k = 12,5 M⁻¹ s⁻¹) (SAARANEN et al., 2010). Além disso, estudos mostraram que a oxidação dos tióis ativos da PDI nativa por GSSG diminuiu a fluorescência intrínseca da proteína de forma aparentemente reversível (TOWNSEND et al., 2009; WANG et al., 2012), mas não foram realizados estudos cinéticos.

1.3 PEROXINITRITO

O peroxinitrito é um potente agente oxidante formado em sistemas biológicos pela reação controlada por difusão ($k = 4,3 - 19 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) do ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) com óxido nítrico (NO^*) (LOBACHEV; RUDAKOV, 2006; RADI, 2013).

Na literatura, o termo “peroxinitrito” refere-se à soma do ânion peroxinitrito (ONOO^-) e de seu ácido conjugado, o ácido peroxinitroso (ONOOH), que em pH fisiológico se apresentam em equilíbrio com pK_a de 6,8 (LOBACHEV; RUDAKOV, 2006) (Figura 3). Este par ($\text{ONOO}^-/\text{ONOOH}$) promove uma gama de reações de oxidação a biomoléculas caracterizadas por reações diretas (por dois elétrons) ou reações envolvendo radicais derivados da sua homólise (por um elétron) (AUGUSTO et al., 2002).

O ânion peroxinitrito (ONOO^-) reage promovendo a oxidação por um elétron de centros de metais de transição como metaloproteínas e complexos metálicos, formando um complexo do tipo oxo-metal ($\text{Me}^{n+1}=\text{O}$) e radical dióxido de nitrogênio (NO_2^*), ou pode reagir com dióxido de carbono (CO_2), presente em altas concentrações nos fluídos biológicos, formando um aduto instável nitrosoperoxycarboxilato (ONOOCO_2^-) que rapidamente se decompõe gerando 65 % de CO_2 e nitrato (NO_3^-) e 35 % do ânion radical carbonato ($\text{CO}_3^{\bullet-}$) e NO_2^* (Figura 3) (DENICOLA et al., 1996; BONINI et al., 1999; FERRER-SUETA; RADI, 2009). Apesar de ser relativamente estável em meio alcalino, o peroxinitrito rapidamente se decompõe quando protonado (ONOOH) na ausência de moléculas alvos ($t_{1/2} = 2 \text{ s}$ a pH 7,4, 25 °C) (UPPU; PRYOR, 1996), sendo 70 % por isomerização, formando NO_3^- e H^+ , e 30 % por homólise, formando NO_2^* e radical hidroxila (OH^*) (BONINI et al., 1999). Já na presença de biomoléculas alvos, como os tióis (RSH) na forma de

tiolato (RS^-), o ácido peroxinitroso reage por dois elétrons formando o ácido sulfênico (RSOH), que pode reagir com um segundo tiol formando um dissulfeto (RSSR) (QUIJANO et al., 1997) (Figura 4).

Figura 4. Representação esquemática da formação do peroxinitrito a partir do ânion radical superóxido e do óxido nítrico e suas possíveis reações em sistemas biológicos: 1) reação com metais de transição, 2) adição nucleofílica ao CO_2 , 3) homólise, 4) oxidação por dois elétrons de tióis (Adaptado de AUGUSTO et al., 2002; RADI, 2013).

Embora o peroxinitrito possua meia-vida curta em pH fisiológico, já foi relatado em alguns estudos que este oxidante é capaz de atravessar membranas (MARLA; LEE; GROVES, 1997; DENICOLA; SOUZA; RADI, 1998), e, portanto, quando gerado a partir de uma fonte celular pode influenciar células alvos ao redor, em torno de 1 a 2 diâmetros celulares ($\sim 5 - 20 \mu\text{M}$) (SZABÓ; ISCHIROPOULOS; RADI, 2007).

Desta forma, o peroxinitrito é considerado um oxidante versátil e complexo, que reage por diferentes mecanismos e leva à formação de diversos produtos radicalares muito reativos (Figura 4). São estes radicais os principais responsáveis pela oxidação, nitração e nitrosação de biomoléculas como lipídeos, proteínas e DNA, que acionam uma série de respostas celulares, resultando em estresse de RE e em agregação de proteínas (PAXINOU et al., 2001; DICKHOUT et al., 2005; IQBAL et al., 2014; DEGENDORFER et al., 2016), em disfunção mitocondrial

(BROWN; BORUTAITE, 2004), em inibição ou ativação de vias de sinalização (XIE et al., 2006) e em morte celular (NILES; WISHNOK; TANNENBAUM, 2006).

2 OBJETIVOS

Considerando que a PDI executa diversas funções celulares mas pode se tornar disfuncional por ação de oxidantes biológicos, o objetivo geral desse projeto foi contribuir para a compreensão das interações da PDI com oxidantes biológicos e suas consequências fisiológicas. Inicialmente, a falta de estudos cinéticos com a PDI nativa nos levou a analisar se a fluorescência intrínseca da PDI poderia ser utilizada como ferramenta para estudar sua cinética de oxidação e, para isso, utilizamos o peróxido de hidrogênio como oxidante. Em seguida, nos propusemos estudar a cinética de oxidação da PDI pelo peroxinitrito, por várias razões: em primeiro lugar, o peroxinitrito já foi implicado no desenovelamento de proteínas e estresse de RE e é um dos principais oxidantes responsáveis pela nitração de proteínas *in vivo*. Além disso, em outros sítios celulares, a associação física entre PDI e NADPH oxidase torna bastante provável a exposição de PDI a fluxos deste oxidante. Por fim, analisamos os aspectos mecanísticos, caracterizamos os produtos da reação da PDI em condições estequiométricas e com excesso de peroxinitrito e discutimos suas possíveis implicações pato/fisiológicas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Foram utilizados reagentes químicos adquiridos da Sigma-Aldrich, Merck ou Fisher, com qualidade analítica ou superior. As soluções foram preparadas em água MilliQ e tratadas *overnight* com resina Chelex-100 para remoção de íons metálicos contaminantes, além de conterem DTPA (100 μM).

As soluções de peróxido de hidrogênio foram preparadas antes do uso, a partir do estoque, e as concentrações foram determinadas por espectrofotometria pela reação com peroxidase de raiz forte (HRP) para produzir composto I ($\epsilon_{403} = 5,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (OGUSUCU et al., 2007). O peroxinitrito foi sintetizado em nosso laboratório a partir do nitrito de sódio (0,6 M) e do peróxido de hidrogênio (0,65 M) em reator do tipo *quenched flow* como descrito anteriormente por BECKMAN et al. (1994). O peróxido de hidrogênio foi usado em excesso para diminuir a contaminação por nitrito e removido logo depois com dióxido de manganês. O peroxinitrito foi mantido a -80°C até o uso e as soluções estoques foram preparadas imediatamente antes do uso em NaOH (100 mM). As concentrações de peroxinitrito foram determinadas por espectrofotometria a 302 nm ($\epsilon_{302} = 1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e os níveis de nitrito contaminante (<30%) foram determinados a 354 nm ($\epsilon_{354} = 24,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) como anteriormente descrito (KISSNER et al., 1997). A tripsina de grau de espectrometria de massa “Gold” foi adquirida da Promega (Madison, WI, EUA). O DNBBS (3,5-dibromo-4-nitrosobenzeno sulfonato) foi sintetizado em nosso laboratório conforme procedimento descrito por KAUR et al. (1981).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Expressão e purificação da PDI

A PDIA1 recombinante foi expressa em *Escherichia coli* da linhagem BL21(DE3)pLysS transformada com o plasmídeo pET28a contendo cDNA para PDI-6x His tag humana. Primeiramente a enzima foi isolada e, em seguida, purificada utilizando a resina de cobalto imobilizado (TALON®; GE Healthcare) e gradiente de imidazol (10 – 200 mM) (IQBAL et al., 2014). As frações contendo a PDI foram reunidas e purificadas adicionalmente utilizando uma coluna de troca aniônica (Q Sepharose), conforme descrito por KARALA et al. (2007). As alíquotas contendo a enzima pura foram reunidas após a diálise e armazenadas a -20 °C.

3.2.2 Quantificação de proteína

A quantificação de proteína foi realizada por espectrofotometria a 280 nm, utilizando o coeficiente de extinção molar (ϵ) calculado pelo software “ProtParam Tool” (“ExPASy - ProtParam tool”) ($\epsilon_{280} = 45.380 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.2.3 Redução da PDI

A PDI purificada foi reduzida pela incubação com DTT (10 mM), por 1 h a 37 °C. Em seguida, o excesso de DTT e seus produtos foram removidos por gel filtração (coluna HiTrap™ Desalting 5mL; GE Healthcare) utilizando tampão fosfato (10 mM), pH 7,4, como fase móvel em sistema de cromatografia líquida rápida de proteína (FPLC, Akta Purifier, GE). A eluição da proteína foi monitorada por absorbância a 280 nm e a eluição do DTT foi monitorada pelo aumento da condutividade. Em seguida, a proteína foi concentrada por ultrafiltração (Amicon®

Ultra, 30 kDa, Millipore) a 4 °C, 3000 rpm por 20 min e quantificada de acordo com a seção 3.2.2.

3.2.4 Alquilação da PDI

Para alquilação, a PDI foi reduzida como descrito acima e depois da remoção do excesso de agente redutor a proteína reduzida foi incubada com iodoacetamida (55 mM) por 1h e 30 min a 37 °C protegida da luz e o excesso de agente alquilante removido por gel filtração. Após ultrafiltração (Amicon® Ultra, 30 kDa, Millipore) a 4 °C, 3000 rpm por 20 min, a PDI alquilada foi quantificada e os tióis quantificados conforme seção 3.2.5 para confirmação desta etapa.

3.2.5 Quantificação de tióis reduzidos da PDI pelo ensaio do DTDP

A concentração de tióis livres da PDI foi medida de acordo com o procedimento descrito por EGWIM e GRUBER (2001), na presença de SDS (1%). Após redução e quantificação, a PDI reduzida foi incubada com DTDP em excesso e, após 5 min em temperatura ambiente, a concentração de tióis livres na proteína foi determinada por espectrofotometria a 324 nm ($\epsilon_{324} = 21.400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Uma vez que dados preliminares indicaram que a concentração de tiol livre por proteína diminui após armazenamento a -20 °C, todos os experimentos foram realizados com PDI recentemente reduzida.

3.2.6 Estudos cinéticos da reação de PDI com peróxido de hidrogênio

Os espectros de emissão (300 - 400 nm) da PDI (5 µM) reduzida em tampão fosfato (100 mM), pH 7,4 a 25 °C foram registrados antes e depois da adição de várias concentrações de peróxido de hidrogênio em um fluorímetro Hitachi F-2500

(Hitachi High Technology America, Inc.), $\lambda_{\text{excitação}} = 295 \text{ nm}$. Após a oxidação da PDI por peróxido de hidrogênio, foi adicionado DTT (500 μM) às misturas, que foram incubadas por até 30 min antes de revarredura dos espectros de emissão para verificar a reversibilidade dos processos.

A cinética de reação PDI reduzida (5 μM) foi realizada nas mesmas condições e no mesmo instrumento ($\lambda_{\text{excitação}} = 295 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emissão}} = 340 \text{ nm}$) com excesso de peróxido de hidrogênio (0.25 – 1 mM) de pelo menos 10 vezes em relação à PDI para garantir cinética de pseudo-primeira. Os valores da constante observada (k_{obs}) foram determinados a partir dos ajustes das curvas obtidas com equações exponenciais simples usando o software OriginPro 8.0. Pelo menos três experimentos independentes para cada concentração do substrato foram realizados para calcular k_{obs} . A constante de segunda ordem para reação da PDI com peróxido de hidrogênio foi determinada pelo ajuste linear dos dados de k_{obs} versus concentração de peróxido de hidrogênio utilizada.

3.2.7 Estudos cinéticos de oxidação da PDI por peroxinitrito.

Esses estudos foram realizados em um espectrofotômetro de fluxo interrompido modelo SX-18MV com sistema de computação acoplado ao programa da *Applied photophysics (UK)*. Em todos os experimentos a temperatura foi mantida a $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e o pH final 7,4.

Para estudos cinéticos da reação da PDI com peroxinitrito por fluorescência, a PDI (5 μM) reagiu com concentrações crescentes de peroxinitrito (2,5 – 12,5 μM) e a diminuição da fluorescência total da PDI ($\lambda_{\text{excitação}} = 295 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emissão}} > 320 \text{ nm}$) foi registrada até o final da reação. Para avaliar o retorno da fluorescência após adição de DTT, a PDI (5 μM) foi pré-misturada com peroxinitrito (5 e 10 μM) em tampão

fosfato (100 mM), pH 7,2. Em seguida, após um tempo de espera de 5 min, a PDI oxidada reagiu com DTT (500 μ M) e o aumento da fluorescência total da PDI foi registrado nas mesmas condições. Para ajuste da concentração de proteína em relação ao tempo, menos de 10% do consumo de proteína foi adotado, permitindo um cálculo de velocidade inicial apropriado. As velocidades iniciais foram traçadas em relação às concentrações de peroxinitrito para obter a constante de velocidade de segunda ordem (CARVALHO et al., 2017). Para estudos cinéticos da reação da PDI com peroxinitrito por absorção, peroxinitrito (30 μ M) reagiu com PDI reduzida e alquilada (30 μ M) e o consumo de peroxinitrito foi avaliado pela diminuição da absorção a 310 nm ($\epsilon_{310} = 1.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (TRUJILLO et al., 2004).

3.2.8 Simulações cinéticas

Foram realizadas simulações cinéticas das reações de PDI com peroxinitrito e do próprio decaimento do peroxinitrito para radicais, empregando os valores de constantes de velocidades determinados em nosso trabalho e, assim, foi possível avaliar a distribuição das espécies ao longo da reação. Para isso, foi utilizado o programa Gepasi 3.3 software (<http://www.gepasi.org>) (MENDES, 1997).

3.2.9 Determinação das relações entre nitração, inativação e agregação da PDI promovidas por peroxinitrito.

3.2.9.1 Tratamento da PDI com peroxinitrito *in vitro*

As incubações continham PDI reduzida (10 μ M), peroxinitrito (10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 250 μ M e adição reversa de 250 μ M (R)) em tampão fosfato (100 mM), pH 7,4. No momento das reações, a PDI foi adicionada diretamente no tampão e o peroxinitrito foi adicionado na parede do tubo e vortexado rapidamente para mistura

dos reagentes. Após 5 min a 25 °C, alíquotas das misturas reacionais foram analisadas como descrito abaixo.

3.2.9.2 Avaliação da proteólise limitada e agregação da PDI por SDS-PAGE

Para o experimento de proteólise limitada, a PDI reduzida (10 µM) foi incubada com peroxinitrito (20, 40, 200 µM e adição reversa de 200 µM (R)). Após 5 min de incubação à temperatura ambiente, foi adicionado 0,02 µg de tripsina às amostras, que foram adicionalmente incubadas por 40 min a 37 °C. Em algumas amostras, DTT (500 µM) foi adicionado antes da adição de tripsina e a digestão foi encerrada pela adição de PMSF (10 mM) (WANG et al., 2012). Alíquotas das reações (cerca de 5 µg de proteína) foram solubilizadas em tampão de amostra Laemmli (62 mM Tris-HCl, pH 6,8, contendo 10% glicerol, 2% SDS, 100mM β-mercaptoetanol e 0,01% de azul de bromofenol), foram aquecidas a 95 °C por 5 min e submetidas à eletroforese em gel desnaturante/redutor de poliacrilamida (5% de gel de empacotamento e 10% gel de resolução) a 120 V por 1-2 h. Posteriormente, os géis foram fixados com metanol (45%) e ácido acético glacial (5%) por 30 min e foram corados com azul de Coomassie *overnight*. Depois, foram descorados com ácido acético (1 %). Para o experimento de agregação da PDI, as misturas das reações foram solubilizadas em tampão de amostra de Laemmli, aquecidas a 95 °C durante 5 min e submetidas à eletroforese em gel desnaturante/redutor de poliacrilamida (5 % de gel de empacotamento e 12 % gel de resolução) a 120 V por 1-2 h (IQBAL et al., 2014). Em seguida, os géis foram fixados e descorados como citado anteriormente. Por fim, foi realizada a análise de densitometria das bandas usando o software ImageJ 1.44p (NIH, USA).

3.2.9.3 Avaliação da nitração da PDI por Western blotting

Após eletroforese em gel de poliacrilamida, as proteínas foram transferidas (12 V, 90 min) para membrana de nitrocelulose. Em seguida, a membrana foi bloqueada com leite desnatado (5 %) em tampão TBST a 4 °C *overnight*. Posteriormente, foi incubada com anticorpo primário anti-nitrotirosina produzido em ovelha (1:4000) em TBSTt (TBST acrescido de 0,01% leite desnatado) por 2h a 25 °C e em seguida incubada com anticorpo secundário anti- IgG produzido em macaco (1:15000) em TBSTt por 2h a 25 °C. A cada etapa de incubação sucessiva a membrana foi lavada (3 vezes por 10 min) com tampão TBS (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM) ou TBST (tampão TBS acrescido de 0,05 % de Tween-20). A leitura de fluorescência das bandas foi realizada a 700 nm utilizando um (Li-cor)(EQUIPAMENTO).

3.2.9.4 Inativação da PDI

A inativação da PDI foi analisada por sua atividade redutase, cuja reação promove a precipitação da cadeia B da insulina após ser reduzida por DTT conforme descrito por WATANABE et al. (2014). Neste procedimento, a inativação é analisada pelo aumento do tempo de latência (*lag time*) necessário para a precipitação da insulina alcançar um valor de 0,1 a 540 nm. Após reação com peroxinitrito descrito na seção 3.2.6.1, PDI (1 µM) foi incubada em tampão fosfato (50 mM, EDTA (1mM), pH 7,4) com insulina (1 mg/mL) em presença de DTT (1.5 mM). O aumento da turbidez devido à precipitação da cadeia B da insulina foi monitorado a 540 nm utilizando um leitor de microplacas.

3.2.9.5 Detecção de radicais de PDI por espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR)

A formação de radicais de PDI por peroxinitrito foi avaliada por EPR utilizando DNBNS como captador de spin. As incubações continham PDI (60 μ M), DNBNS (10 mM) em tampão fosfato (100 mM), pH 7,4. Após adição de peroxinitrito (360 μ M), as amostras foram incubadas por 5 min à temperatura ambiente. Em seguida, alíquotas da reação (100 μ L) foram transferidas para *flat cell* de quartzo e os espectros adquiridos. Os espectros de EPR foram obtidos em um espectrômetro Bruker EMX nas seguintes condições: potência de micro-ondas, 20 mW; amplitude de modulação, 2,5 G; constante de tempo, 81,92 ms; 4 scans; velocidade de varredura 1,2 G/s.

3.2.10 Análise das modificações oxidativas da PDI promovidas por peroxinitrito utilizando HPLC/ESI/MSMS após digestão triptica

PDI (10 μ M) foi incubada na ausência e presença de peroxinitrito estequiométrico (20 μ M) ou excesso (200 μ M) em tampão fosfato (100 mM), pH 7,4 durante 5 min a 25°C. Em seguida, as amostras (100 μ L) foram diluídas com 900 μ L de tampão Tris-HCl (10 mM), pH 8,0 contendo iodoacetamida (55 mM) e cloreto de guanidina (6 M) e incubadas durante 4 h à temperatura ambiente protegidas da luz. Após este tempo, o excesso de iodoacetamida, de cloreto de guanidina e de outros compostos de baixo peso molecular foram removidos por filtração em coluna de corte de 10 kDa (PD10) e as amostras foram secas em rotoevaporador a vácuo. As frações foram ressuspensas em tampão bicarbonato de amônio (50 mM) e digeridas com tripsina “gold” (razão de proteína:tripsina 50:1) a 37 °C durante 12 h. Em seguida, foi adicionada uma segunda alíquota de tripsina na mesma razão às

amostras, que foram incubadas por mais 12 h. Ao final, a reação foi encerrada com 5% ácido fórmico por 20 min e em seguida os hidrolisados foram secos em rotoevaporador e mantidos a -20 °C até a análise. Antes das análises, os hidrolisados tripticos foram ressuspensos em água contendo 0,1 % de ácido fórmico, dessalinizados e concentrados em ZipTipC18 (Millipore, Bedford, MA). O ZipTipC18 foi lavado com 60% e 100% de acetonitrila contendo 0,1 % de ácido fórmico e depois equilibrado com água contendo 0,1 % de ácido fórmico. Os peptídeos foram carregados no ZipTipC18, seguido por 5 lavagens com água contendo 5 % de metanol e 0,1 % de ácido fórmico. Os peptídeos foram eluídos com 60 % de acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico. Os hidrolisados isentos de sal foram carregados numa coluna de nano-HPLC ACQUITY UPLC-C18 (20 mm x 180 µm, 5 µm, Waters) acoplada a um espectrômetro de massa quadrupolo-TOF-LC-MS / MS híbrido (TOF-6600) com Fonte nanospray (dos instrumentos AB Sciex). As amostras foram eluídas (400 nL/min) usando gradiente linear de 99 % de solvente A (água com 0,1 % de ácido fórmico) e 1 % de solvente B (acetonitrila com 0,1 % de ácido fórmico) até 35 % de solvente B por 60 min. As condições para a fonte de nanospray foram: capilar, 2,4 kV, aquecedor a seco e 100 °C. O modo positivo da fonte de ionização foi empregado. O software Analyst TF (versão 1.7.1) e o software Peak View (versão 2.2) da AB Sciex foram empregados para aquisição e processamento de dados. O software MASCOT (versão 2.5) (Matrix Science Ltd., Londres), MaxQuant (versão 1.2.7.429) e editor de sequências (versão 3.2) (Bruker Daltonics, alemão) foram empregados para a análise das modificações. A tolerância de massa em todas as experiências foi ≤ 10 ppm para análise de MS e $\leq 0,05$ Da para análise MS / MS. A taxa de descoberta falsa (FDR) foi $\leq 1,0$ %.

3.2.11 Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão amostral de valores determinados em pelo menos três experimentos independentes. A significância estatística foi calculada empregando a ANOVA de uma via e Tukey ou Dunnett como pós-teste, usando o software GraphPad 6.0 (GraphPad Software, Inc., EUA).

4 RESULTADOS

4.1 ESTUDO CINÉTICO DAS REAÇÕES DE PDI COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E PEROXINITRITO.

4.1.1 Peróxido de hidrogênio oxida os ditióis da PDI e promove diminuição da fluorescência intrínseca da proteína nativa.

Como já relatado, existem poucos estudos cinéticos de oxidação da PDI por oxidantes de baixo peso molecular. Os estudos existentes com GSSG (LAPPI; RUDDOCK, 2011) e peróxido de hidrogênio (KARALA et al., 2009) não foram realizados com a PDI nativa, mas com o domínio a da PDI mutada (W111F) para torná-la mais fluorescente às mudanças do estado redox. Foi também descrito que a fluorescência intrínseca da PDI nativa diminuía quando a enzima era oxidada por excesso de GSSG e sofria um deslocamento (aproximadamente 4 nm) no comprimento máximo de emissão mas não foram realizados estudos cinéticos ou quantitativos (TOWNSEND et al., 2009; WANG et al., 2012). Assim, primeiro testamos a possibilidade de usar a fluorescência intrínseca da PDI para estudos de cinética de oxidação, utilizando peróxido de hidrogênio como oxidante. Para isto, PDI reduzida (5 μ M) foi tratada com excesso de peróxido de hidrogênio (320 μ M) e as mudanças em seu espectro de fluorescência foram registradas. Como mostrado na Figura 5A, a fluorescência da PDI reduzida (linha preta) diminuiu após a adição de peróxido de hidrogênio (linha vermelha), mas não apresentou nenhuma mudança no comprimento máximo de emissão. A adição de DTT (500 μ M) à PDI oxidada recuperou a fluorescência inicial (linha azul), confirmando assim que os tióis reativos da PDI são os principais alvos do peróxido de hidrogênio (KARALA et al., 2009).

Embora a diminuição da fluorescência intrínseca da PDI após a oxidação seja pequena, pode ser utilizada para estudos cinéticos de oxidação. De fato, os experimentos de cinética mostraram que a diminuição da fluorescência da PDI (5 μM) após a oxidação por peróxido de hidrogênio (320 μM) se encaixa em um perfil de exponencial simples e é revertida pela adição de DTT (500 μM) (Figura 5B). Além disso, nossos experimentos mostraram que a oxidação por excesso de peróxido de hidrogênio (0,25 - 1,0 mM) levou a uma diminuição da fluorescência de forma dependente do tempo e da concentração do oxidante, permitindo estudos cinéticos de oxidação (abordagem de pseudo primeira ordem). Todos os experimentos cinéticos de fluorescência seguiram o perfil de exponenciais simples, a partir dos quais os valores de k_{obs} correspondentes foram calculados. O gráfico de k_{obs} versus a concentração de peróxido de hidrogênio gerou uma reta (Figura 5C), cuja inclinação permitiu a determinação da constante de velocidade de segunda ordem da reação entre peróxido de hidrogênio e os tióis redox ativos da PDI como $k = (17,3 \pm 1,3) \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7,4, 25 °C. Ressalta-se que não foram observadas nenhuma evidência de exponencial dupla, indicando que ambos os tióis reativos PDI (Cys⁵³ e Cys³⁹⁷) são oxidados por peróxido de hidrogênio com constantes de velocidades semelhantes.

Consequentemente, o valor da constante de velocidade de segunda ordem determinada aqui para a PDI nativa ($17,3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) é aproximadamente o dobro da determinado para a reação entre peróxido de hidrogênio e o domínio a da PDI mutada (1 tiol redox ativo) ($9,2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (KARALA et al., 2009).

Figura 5. Cinética de oxidação da PDI por peróxido de hidrogênio (A) Espectro de emissão ($\lambda_{ex} = 295$ nm) da PDI reduzida (5 μ M) antes (linha preta) e 15 minutos após a adição de peróxido de hidrogênio (320 μ M) (linha vermelha) e após 15 min de incubação da última amostra oxidada com 500 μ M de DTT (linha azul). (B) Cinética de oxidação da PDI reduzida (5 μ M) por peróxido de hidrogênio (320 μ M) e retorno da fluorescência por adição de DTT (500 μ M). A linha vermelha corresponde ao ajuste dos dados com equações exponenciais simples. (C) Determinação da constante de velocidade de segunda ordem da reação dos tióis redox ativos da PDI com peróxido de hidrogênio. As constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem (k_{obs}) foram determinadas pela mistura de PDI (5 μ M) com várias concentrações de peróxido de hidrogênio (0,25 - 1,0 mM) como em (B). Todas as incubações foram realizadas em tampão fosfato (100 mM) contendo DTPA (0,1 mM), pH final 7,4, a 25 °C. Os valores traçados no painel (C) são a média $\pm$ desvio padrão obtido a partir de 3 experimentos independentes.

4.1.2 Peroxinitrito oxida preferencialmente os ditióis da PDI

Após demonstrar a capacidade da fluorescência intrínseca da PDI para estudos cinéticos de oxidação (Figura 5), utilizamos a mesma abordagem para estudar a oxidação da PDI (5 μM) por peroxinitrito. Os experimentos foram realizados em um fluorímetro de fluxo interrompido e com concentrações iniciais baixas de peroxinitrito (2,5 - 10,0 μM) devido a maior reatividade deste oxidante em comparação ao peróxido de hidrogênio (FERRER-SUETA; RADI, 2009; FERRER-SUETA et al., 2011).

Na escala de tempo do experimento ($\sim 8\text{s}$), a PDI não foi oxidada na ausência de peroxinitrito (controle) mas, foi oxidada de forma dependente da concentração na presença de peroxinitrito, como mostra a diminuição da fluorescência da PDI (Figura 6A). Esta diminuição da fluorescência foi proporcional às concentrações de peroxinitrito, uma vez que as concentrações de oxidante variaram de sub-estequiométricos (2,5 – 7,5 μM) até estequiométrico (10 μM) em relação aos tióis redox ativos da PDI (5 μM PDI = 10 μM tióis ativos).

De forma relevante, a diminuição da fluorescência da PDI na presença de peroxinitrito (10 μM) foi a mesma que a do excesso de peróxido de hidrogênio e duas vezes a do peroxinitrito (5 μM) (Figuras 6A e 6B). Após a oxidação PDI por peroxinitrito sub-estequiométrico e estequiométrico, a fluorescência inicial da PDI foi recuperada pela adição de DTT como é o caso do peróxido de hidrogênio em excesso (Figura 5 e Figura 6B). Em contraste, uma maior concentração de peroxinitrito, como 20 μM , causou um aumento significativo na diminuição geral da fluorescência da PDI, que não foi recuperada totalmente após a adição de DTT (Fig. 6B e 6C).

Até este ponto, os resultados sugerem que os ditióis da PDI são os alvos preferenciais do peroxinitrito em um processo que é revertido por DTT até a concentração estequiométrica do oxidante em relação aos tióis redox ativos da PDI. O aumento da concentração relativa de peroxinitrito sobre os tióis reativos da PDI resulta não apenas na sua oxidação, mas também nas modificações da PDI que não são revertidas por DTT. Para confirmar isso, realizamos experimentos de proteólise limitada com tripsina em condições de oxidação e redução seguidas da análise por SDS-PAGE (Figura 7). Um trabalho realizado por WANG et al., (2012) mostrou que, após a oxidação dos ditióis da PDI, a proteína adota uma conformação mais aberta, tornando-a mais suscetível à proteólise. De fato, a PDI reduzida (10 μ M) é bastante resistente à digestão com tripsina (Figura 7, comparar os poços 1 e 2). Se PDI reduzida for tratada com uma concentração estequiométrica de peroxinitrito em relação aos tióis redox ativos da PDI (20 μ M), o grau de digestão aumenta (Figura 7, comparar os poços 5 e 6), e essa susceptibilidade aumentada é quase completamente revertida pela adição de DTT na proteína oxidada antes da adição de tripsina (Figura 7, comparar os poços 2, 5-7). As concentrações de peroxinitrito superiores a 20 μ M dão origem a uma digestão aumentada e apenas uma recuperação parcial após a adição de DTT, como se observou nos experimentos realizados com peroxinitrito (200 μ M) (Figura 7, poços 11-13). Em contraste, quando a PDI reduzida é adicionada ao peroxinitrito decomposto (200 μ M) (adição reversa), o padrão de digestão se assemelha ao da enzima reduzida (Figura 7, poços 3 e 4).

Os resultados acima (Figura 6A - C e Figura 7) confirmam que os tióis redox ativos da PDI são os alvos preferenciais de peroxinitrito em concentrações sub-estequiométricas e estequiométrica, mas quando em excesso o oxidante também reage com outros resíduos da PDI devido a reatividade complexa do peroxinitrito

que oxida as biomoléculas por mecanismos de um e dois elétrons como citado anteriormente (AUGUSTO et al., 2002; FERRER-SUETA; RADI, 2009; RADI, 2013).

Deste modo, para evitar o excesso de peroxinitrito sobre os tióis reativos da PDI, a constante de velocidade de segunda ordem entre peroxinitrito e PDI foi determinada pela abordagem da velocidade inicial (OGUSUCU et al., 2007; CARVALHO et al., 2017). Foi possível utilizar esta abordagem porque a diminuição da fluorescência da PDI pode ser convertida para a concentração de PDI cujos tióis redox ativos foram oxidados (Figura 6A - 6C). Os valores da velocidade inicial foram calculados por várias repetições dos experimentos mostrados na Figura 6A e o gráfico dos valores obtidos versus a concentração de peroxinitrito originou uma reta (Figura 6D). Através do valor da inclinação da reta dividido pela concentração de PDI foi possível calcular a constante de velocidade de segunda ordem aparente da reação entre os tióis redox ativos da PDI e peroxinitrito como $k = (6,9 \pm 0,2) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7,4 e 25 °C.

Figura 6. Peroxinitrito oxida preferencialmente as cisteínas redox ativas da PDI. (A) Cinética representativa da oxidação da PDI reduzida (5 μ M) por peroxinitrito (2,5 - 10 μ M). (B) Variação da fluorescência intrínseca da PDI após oxidação por peróxido de hidrogênio (500 μ M) ou por peroxinitrito (5, 10 e 20 μ M) e redução da PDI oxidada por DTT. Para monitorar a variação da fluorescência após a redução da PDI oxidada, as amostras de PDI reduzida foram pré misturadas com peroxinitrito (15 min) e em seguida misturadas com DTT em um fluorímetro de fluxo interrompido. (C) Cinética representativa da oxidação da PDI reduzida (5 μ M) por peroxinitrito 10 μ M (curva preta) ou peroxinitrito 20 μ M (curva azul) e redução das amostras oxidadas por DTT (500 μ M). Os experimentos foram realizados conforme descrito em (B). (D) Determinação da constante de velocidade de segunda ordem da reação dos tióis redox ativos da PDI com peroxinitrito. As velocidades iniciais foram determinadas por experimentos similares aos mostrados no painel (A). Os valores plotados são a média $\pm$ desvio padrão obtidos de pelo menos 3 experimentos independentes. Todas as incubações foram realizadas em tampão fosfato (100 mM) contendo DTPA (0,1 mM), pH final 7,4, a 25 °C. As análises foram realizadas conforme descrito nos procedimentos experimentais.

Figura 7. Proteólise limitada por SDS-PAGE. Gel representativo da proteólise limitada da PDI (10 μ M) resultante da digestão pela tripsina antes ou depois do tratamento com as concentrações específicas de peroxinitrito ou DTT (500 μ M). As faixas marcadas com R correspondem a 200 μ M de peroxinitrito decomposto (adição reversa). Todas as incubações foram realizadas em tampão fosfato (100 mM) contendo DTPA (0,1 mM), pH final 7,4, a 25 ° C. As análises foram realizadas conforme descrito nos procedimentos experimentais.

4.2 ASPECTOS MECANÍSTICOS DA REAÇÃO ENTRE PDI E PEROXINITRITO.

4.2.1 Peroxinitrito preferencialmente oxida os tióis redox ativos da PDI, mas também se decompõe para radicais.

Para obter mais informações mecanísticas sobre a reação, experimentos adicionais foram realizados. Inicialmente, examinamos a reação entre peroxinitrito e PDI reduzida ou PDI previamente alquilada seguindo a decomposição do peroxinitrito por absorvância a 310 nm em um espectrofotômetro de fluxo interrompido. É importante ressaltar que a preferência por estudar a absorção do peroxinitrito e não a fluorescência da proteína foi devido ao processo de alquilação que pode causar mudanças desconhecidas na fluorescência da PDI. Para isso, devido à baixa absorção molar de peroxinitrito neste comprimento de onda, foram

utilizadas concentrações relativamente altas tanto de peroxinitrito (30 μM) como de PDI reduzida e PDI alquilada (30 μM).

Como esperado, o peroxinitrito na ausência de PDI se decompõe a pH 7,4 (traço vermelho) devido à sua homólise catalisada por ácido ($k = 0,35 \text{ s}^{-1}$) (UPPU; PRYOR, 1996), mas foi consumido mais rapidamente na presença de PDI (traço azul) (Figura 8A). Em contraste, a PDI previamente alquilada com iodoacetamida (traço preto) não afetou a decomposição do peroxinitrito catalisada por ácido (traço vermelho), indicando ainda que os tióis redox ativos da PDI são os alvos preferenciais do peroxinitrito.

Para confirmar a constante de velocidade de oxidação da PDI por peroxinitrito, experimentos como o anterior foram realizados na presença de concentrações variadas de PDI (7,5 μM – 60 μM). Após os cálculos das velocidades iniciais para cada concentração de PDI, o gráfico dos valores obtidos versus a concentração de PDI originou uma reta (Figura 8B). Em seguida, por meio do valor da inclinação da reta dividido pela concentração inicial de peroxinitrito. O valor obtido ($k = (3,50 \pm 0,04) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7,4 e 25 °C) foi próximo daquele obtido por medidas da velocidade inicial de decaimento da fluorescência do PDI.

Em seguida, determinamos a concentração de tióis da PDI por tratamento com excesso de DTDP (0,5 mM) (RIENER; KADA; GRUBER, 2002) antes e após a reação com diferentes concentrações de peroxinitrito para determinar a estequiometria da reação. Inicialmente, a PDI reduzida continha $5,02 \pm 0,2$ tióis/proteína, o que é próximo dos esperados 7,0 tióis / proteína. Em seguida, os tióis da PDI (10 μM) foram oxidados por diferentes concentrações do oxidante e os tióis remanescentes determinados (Figura 8C). Após ajustar os resultados obtidos a duas linhas retas, observamos que a linha mais íngreme tinha uma inclinação de

1,1, um valor que não é o esperado para a estequiometria da reação entre peroxinitrito e tióis (1,0: 2,0) (Equações (4.2.1 - (4.2.4)) (TRUJILLO et al., 2004; OGUSUCU et al., 2007).

Estes resultados não foram surpreendentes porque a constante de velocidade de segunda ordem determinada para a reação entre os tióis reativos da PDI e peroxinitrito (Figura 6D) não são suficientemente maiores para superar completamente a decomposição de peroxinitrito em radicais hidroxila e dióxido de nitrogênio (Equação (4.2.3)) e, portanto, há uma competição entre a reação do peroxinitrito com os ditióis da PDI e a própria decomposição do peroxinitrito catalisada pela protonação.

Essa observação foi confirmada por simulações cinéticas usando o software GEPASI v3.30 (<http://www.gepasi.org>)(MENDES, 1997). Para realização destas simulações, levamos em consideração a química conhecida do peroxinitrito e dos tióis (Equação (4.2.2) – (4.2.4)), as constantes de velocidades determinadas experimentalmente e utilizamos a condição estequiométrica do experimento de quantificação dos tióis da PDI (10 μM) com peroxinitrito (20 μM) (Figura 8D).

Nessas condições, a simulação mostrou que 57% do peroxinitrito reage com os ditióis da PDI por um mecanismo de dois elétrons (Equação (4.2.2) e (4.2.4)) e 43% se decompõe para nitrato e radicais (Equação (4.2.3)). De fato, a simulação mostrou que o peroxinitrito (20 μM) consome 22,8 μM dos tióis da PDI por um mecanismo de dois elétrons (Figura 8D), o qual é um pouco inferior ao valor determinado experimentalmente (24,0 $\pm$ 0,8 μM) (Figura 8C). Deve ser notado que o valor da constante de velocidade de segunda ordem da Equação (4.2.4) é desconhecido, mas foi considerada rápida na simulação (10⁷ s⁻¹), uma vez que os tióis reativos da PDI (Cys⁵³ e Cys³⁹⁷) estão localizados próximos de outros resíduos de cisteínas

(Cys⁵⁶ e Cys⁴⁰⁰, respectivamente). Também é importante enfatizar que nas Equações (4.2.2) e (4.2.3), representamos apenas um dos domínios redox ativos da PDI para melhor compreensão, mas a enzima contém dois (Cys⁵³-Cys⁵⁶ e Cys³⁹⁷-Cys⁴⁰⁰) (HATAHET; RUDDOCK, 2009), que em nosso estudo aparentemente se comportam de forma semelhante em relação à oxidação.

Figura 8. Peroxinitrito oxida preferencialmente os tióis redox ativo da PDI, mas também decompõe para radicais. (A) Decomposição do peroxinitrito monitorado por sua absorbância a 310 nm na ausência de PDI (linha vermelha) e na presença de PDI (30 μM) (linha azul) ou na presença de PDI previamente alquilada (30 μM) (linha preta). (B) Determinação da constante de velocidade de segunda ordem da reação dos tióis redox ativos da PDI com peroxinitrito. As velocidades iniciais foram determinadas por experimentos similares aos mostrados no painel (A) (C) Diminuição da concentração total de tiol da PDI (10 μM) após a adição de concentrações específicas de peroxinitrito. (D) Simulação cinética da reação entre os tióis reativos de PDI (10 μM) com peroxinitrito (20 μM) usando o software Gepasi (<http://www.gepasi.org>) e as equações mostradas no texto. Para comparar com os valores experimentais no painel (D), todos os tióis detectáveis da PDI foram utilizados no gráfico da simulação, embora apenas os tióis ativos da PDI são oxidados diretamente pelo peroxinitrito (Equação (4.4.2)). Todas as incubações foram realizadas em tampão fosfato (100 mM) contendo DTPA (0,1 mM), pH final 7,4, a 25 °C. As análises foram realizadas como descrito nos procedimentos experimentais.

4.2.2 Caracterização dos produtos de oxidação da PDI por peroxinitrito em condição estequiométrica

Para corroborar com os resultados descritos acima, realizamos a análise por LC-MS/MS dos produtos de oxidação da PDI por peroxinitrito em concentração estequiométrica aos tióis redox ativos da proteína. Para isso, PDI (10 μ M) foi tratada ou não com peroxinitrito (20 μ M) e após 5 min de incubação, os tióis remanescentes foram bloqueados com iodoacetamida (55 mM) em condições desnaturantes. Após a remoção dos reagentes em excesso, as amostras foram digeridas com tripsina e submetidas a análise por nano-ESI-Q-TOF-MS/MS como *Resultados* S procedimentos experimentais (MEDINAS et al., 2010; PAVIANI et al., 2015).

As digestões trípticas das amostras de PDI não tratadas com peroxinitrito (controle) apresentaram, principalmente, peptídeos não modificados, com exceção dos resíduos de Met que estavam oxidados como esperado devido ao manuseio da amostra, os Trp¹²⁸ e Trp⁴⁰⁷ hidroxilados e tióis alquilados (C_R) na Cys³¹² e em ambos domínios redox ativos (Cys⁵³, Cys⁵⁶, Cys³⁹⁷, Cys⁴⁰⁰) (Tabela 1). O pico do peptídeo referente ao motivo redox ativo a se apresentou com massa monoisotópica de 1941,8906 Da (m/z de 648,3051) com três cargas que é referente a massa do peptídeo que se estende do resíduo 43 ao 57 com as Cys⁵³ e Cys⁵⁶ alquiladas (⁴³YLLVEFYAPWC_RGHC_RK⁵⁷) (Figura 9A), e o pico do peptídeo referente ao motivo redox ativo a' se apresentou com massa monoisotópica de 1912,8389 Da (m/z de 638,6209) com três cargas que corresponde a massa do peptídeo que se estende do resíduo 387 ao 401 com as Cys³⁹⁷ e Cys⁴⁰⁰ alquiladas (³⁸⁷NVFVEFYAPWC_RGHC_RK⁴⁰¹) (Figura 9B), e se apresentou também com uma massa monoisotópica de 2040,9339 Da (m/z de 511,2407) com quatro cargas que é

referente ao mesmo peptídeo com um *missed cleavage*

($^{386}\text{KNVFVEFYAPWC}_R\text{GHC}_R\text{K}^{401}$) (Tabela 1).

Figura 9 Análise por Nano-ESI-Q-TOF-MS/MS dos peptídeo alquilados dos motivos redox ativos a e a' obtidos a partir da digestão triptica de PDI reduzida (10 μM) não tratada com peroxinitrito. (A) O sequenciamento do pico com m/z de 648,3051 foi realizado por MS/MS e corresponde ao peptídeo alquilado $^{43}\text{YLLVEFYAPWC}_R\text{GHC}_R\text{K}^{57}$ (massa monoisotópica 1941,8906 Da) com 3 cargas referente ao motivo redox ativo a da PDI. (B) O sequenciamento do pico com m/z de 638,6209 foi realizado por MS/MS e corresponde ao peptídeo alquilado $^{387}\text{NVFVEFYAPWC}_R\text{GHC}_R\text{K}^{401}$ (massa monoisotópica 1912,8389 Da) com 3 cargas referente ao motivo redox ativo a' da PDI. Os insetos em ambas as figuras (A e B) exibem os espectros de MS dos peptídeos com três cargas (lado direito) e os fragmentos dos peptídeos com as séries y e b (lado direito) identificados no MS/MS (em vermelho). As amostras de PDI reduzida foram incubadas na ausência de peroxinitrito em seguida alquiladas, digeridas com tripsina e submetidas à análise por ESI-Q-TOF-MS/MS como descrito nos procedimentos experimentais.

Tabela 1. Caracterização por ESI-Q-TOF-MSMS dos peptídeos modificados da PDI não tratada com peroxinitrito (controle)^a.

Peptídeos ^b	Massa teórica (M+H)	m/z (z)	Massa Experimental	Íon score ^c	Tempo de retenção	Aminoácidos modificados ^d
⁴³ YLLVEFYAPWCGHCK ⁵⁷	1942,8985	648,3051 (3H ⁺)	1941,8934	94	43,65	C ⁵³ e C ⁵⁶ + 57 (CAM)
¹²¹ EADDIVNWLK ¹³⁰	1218,6007	609,8028 (2H ⁺)	1217,591	61	41,06	W ¹²⁸ + 16 (OH)
³⁰¹ ILEFFGLKKEECPAVR ³¹⁶	1936,0367	484,7656 (4H ⁺)	1935,0335	76	33,94	C ³¹² + 57 (CAM)
³¹⁷ LITLEEEMTK ³²⁶	1222,6241	611,8131 (2H ⁺)	1221,6116	71	25,26	M ³²⁴ + 16 (O)
³⁵¹ IKPHLMSQELPEDWDKQPVK ³⁷⁰	2434,2441	609,3145 (4H ⁺)	2433,2288	84	26,59	M ³⁵⁷ + 16 (O)
³⁸⁶ KNVFVEFYAPWCGHCK ⁴⁰¹	2041,9418	511,2407 (4H ⁺)	2040,9336	76	36,83	C ³⁹⁷ e C ⁴⁰⁰ + 57 (CAM)
³⁸⁷ NVFVEFYAPWCGHCK ⁴⁰¹	1913,8468	638,6209 (3H ⁺)	1912,8408	73	41,22	C ³⁹⁷ e C ⁴⁰⁰ + 57 (CAM)
⁴⁰² QLAPIWDK ⁴⁰⁹	986,5312	493,7659 (2H ⁺)	985,5172	60	29,83	W ⁴⁰⁷ + 16 (OH)
⁴²⁵ MDSTANEVEAVK ⁴³⁶	1309,5946	655,2982 (2H ⁺)	1308,5818	112	19,22	M ⁴²⁵ + 16 (O)

^a PDI reduzida (10 µM) foi incubada com veículo em tampão fosfato (100 mM) pH 7,4 e DTPA (0,1 mM) a 25 °C por 5 min. As amostras foram alquiladas em tampão desnaturante, digeridas com tripsina e submetidas a LC-MS/MS como descrito nos procedimentos experimentais.

^b Apenas os peptídeos modificados estão mostrados nesta coluna, através da análise pelo MASCOT a % de cobertura da sequência da proteína foi em média de 85 %.

^c Íon score é -10 log (P) onde P é a probabilidade da marca observada ser um evento aleatório. Em média, íon score individual >61 indica extensa identidade ou homologia (p < 0.01).

^d CAM refere-se a carbamidometil.

As digestão trípica de PDI tratada com peroxinitrito estequiométrico apresentaram os mesmos peptídeos que continham o Met oxidado e os resíduos de Trp hidroxilados do controle (Tabela 1). Além disso, foram detectados três novos picos intensos: (1) um pico com massa monoisotópica de 1825,8320 (m/z de 609,6186) com três cargas, correspondente ao peptídeo do motivo redox ativo a com as Cys⁵³ e Cys⁵⁶ com ligação dissulfeto (⁴³YLLVEFYAPWCGHCK⁵⁷ - 2H). (Figura 10A); (2) um pico com massa monoisotópica de 1796,7804 Da (m/z de 599,9350) com três cargas, correspondente ao peptídeo do motivo redox ativo – a' com as Cys³⁸⁷ e Cys⁴⁰⁰ com ligação dissulfeto (³⁸⁷NVFVEFYAPWCGHCK⁴⁰¹ - 2H) (Figura 10B); e (3) um pico com massa monoisotópica de 1924,8753 Da (m/z de 482,2266) com quatro cargas, correspondente ao mesmo peptídeo anterior com um *missed cleavage* (³⁸⁶KNVFVEFYAPWCGHCK⁴⁰¹ - 2H) (Tabela 2). Portanto, foi possível identificar peptídeos correspondentes aos dois motivos redox ativo da PDI oxidados por peroxinitrito aos dissulfetos correspondentes (Figura 10, Tabela 2).

Embora a formação de dissulfeto tenha sido a maior modificação observada na PDI tratada com peroxinitrito em condições estequiométricas, também foram detectados diferentes espectros dos peptídeos contendo o dissulfeto com uma modificação adicional. De fato, peptídeos dissulfetos com resíduos de Trp hidroxilados (Trp⁵² e Trp³⁹⁶) e com resíduo de Tyr nitrado (Tyr³⁹³) foram identificados (Tabela 2).

Figura 10 Análise por Nano-ESI-Q-TOF-MSMS dos peptídeo oxidados a dissulfeto dos motivos redox ativos a e a' obtido a partir de digestões tripticas de PDI reduzida (10 μM) tratada com peroxinitrito (20 μM). (A) O sequenciamento do pico com m/z de 609,6186 foi realizado por MS/MS e corresponde ao peptídeo ⁴³YLLVEFYAPWCGHCK⁵⁷ - 2H (massa monoisotópica 1825,8320 Da) com 3 cargas referente ao motivo redox ativo a oxidado da PDI. (B) O sequenciamento do pico com m/z de 599,9350 foi realizado por MS/MS e corresponde ao peptídeo ³⁸⁷NVFVEFYAPWCGHCK⁴⁰¹ - 2H (massa monoisotópica 1796,7804 Da) com 3 cargas referente ao motivo redox ativo a' da PDI. Os insetos acima em ambas as figuras (A e B) exibem os espectros de MS dos peptídeos com três cargas (lado direito) e os fragmentos dos peptídeos com as séries y e b (lado direito) identificados no MSMS (em vermelho). As amostras de PDI reduzida foram incubadas com peroxinitrito, em condições estequiométricas, em seguida, alquiladas, digeridas com tripsina e submetidas à análise por ESI-Q-TOF-MSMS como descrito nos procedimentos experimentais.

Tabela 2. Caracterização por ESI-Q-TOF-MSMS das modificações oxidativas da PDI promovida por peroxinitrito em condições estequiométrica^a.

Peptídeos ^b	Massa teórica (M+H)	m/z (z)	Massa Experimental	Íon score ^c	Tempo de retenção	Aminoácidos modificados ^d
⁴³ YLLVEFYAPWCGHCK ⁵⁷	1942,8985	648,3067 (3H ⁺)	1941,8983	97	43,96	C ⁵³ e C ⁵⁶ + 57 (CAM)
⁴³ YLLVEFYAPWCGHCK ⁵⁷	1826,8399	609,6186 (3H ⁺)	1825,8340	78	44,70	(C ⁵³ - C ⁵⁶) - 2H
⁴³ YLLVEFYAPWCGHCK ⁵⁷	1842,8348	614,9501 (3H ⁺)	1841,8284	52	38,14	(C ⁵³ - C ⁵⁶) - 2H e W ⁵² + 16 (OH)
³⁸⁶ KNVFVEFYAPWCGHCK ⁴⁰¹	2041,9418	511,2407 (4H ⁺)	2040,9444	109	36,50	C ³⁹⁷ e C ⁴⁰⁰ + 57 (CAM)
³⁸⁶ KNVFVEFYAPWCGHCK ⁴⁰¹	1925,8832	482,2266 (4H ⁺)	1924,8771	45	38,62	(C ³⁹⁷ - C ⁴⁰⁰) - 2H
³⁸⁶ KNVFVEFYAPWCGHCK ⁴⁰¹	1941,8781	486,2262 (4H ⁺)	1940,8758	39	31,68	(C ³⁹⁷ - C ⁴⁰⁰) - 2H W ³⁹⁶ + 16 (OH)
³⁸⁷ NVFVEFYAPWCGHCK ⁴⁰¹	1913,8468	638,6226 (3H ⁺)	1912,8460	77	41,23	C ³⁹⁷ e C ⁴⁰⁰ + 57 (CAM)
³⁸⁷ NVFVEFYAPWCGHCK ⁴⁰¹	1797,7883	599,935 (3H ⁺)	1796,7832	58	43,56	(C ³⁹⁷ - C ⁴⁰⁰) - 2H
³⁸⁷ NVFVEFYAPWCGHCK ⁴⁰¹	1842,7733	614,9319 (3H ⁺)	1841,7739	47	42,52	(C ³⁹⁷ - C ⁴⁰⁰) - 2H Y ³⁹³ + 45 (NO ₂)

^a PDI reduzida (10 µM) foi incubada com peroxinitrito (20 µM) em tampão fosfato (100mM) pH 7,4 e DTPA (0,1 mM) a 25 °C por 5 min. As amostras foram alquiladas em tampão desnaturante, digeridas com tripsina e submetidas a LC-MS/MS como descrito nos procedimentos experimentais.

^b Apenas os peptídeos modificados estão mostrados nesta coluna com exceção dos peptídeos que foram detectados modificados no controle, através da análise pelo MASCOT a % de cobertura da sequência da proteína foi em média de 84 %.

^c Íon score é -10 log (P) onde P é a probabilidade da marca observada ser um evento aleatório. Em média, íon score individual >59 indica extensa identidade ou homologia (p < 0.01).

^d CAM refere-se a carbamidometil.

É importante notar que a digestão trípica da PDI oxidada por peroxinitrito em condições estequiométricas também mostrou espectros relativamente intensos de ambos os sítios redox ativo alquilados. Para estimar o rendimento relativo da oxidação e alquilação dos tióis, o procedimento experimental e a análise de MS foram repetidos independentemente. A área do pico no MS de cada peptídeo correspondente aos locais redox ativo da PDI de cada experimento foi calculada com base na proporção entre o *extracted ion chromatogram* (XIC) para cada peptídeo e o *total ion chromatogram* (TIC) de cada amostra. Em seguida, foi calculado a média das área dos picos de cada peptídeo e os resultados são mostrados na Figura 11.

No caso do peptídeo referente ao domínio PDI a', a formação do dissulfeto representa 80 a 54% dos ditióis, dependendo se calculamos a formação do dissulfeto com base no peptídeo alquilado do controle ou usando a soma do dissulfeto mais o peptídeo alquilado da PDI oxidada (Figura 11A). No caso do domínio a, a situação foi mais complexa porque a intensidade de MS dos peptídeos trípticos é aproximadamente 10 vezes inferior à do domínio a'. Nesse caso, a formação do dissulfeto representa cerca de 12% do ditióis, seja comparando-o com o peptídeo alquilado do controle ou com a soma do dissulfeto mais o peptídeo alquilado da PDI oxidada (Figura 11B).

Outros possíveis produtos de oxidação dos tióis da PDI, tais como derivados sulfênicos, sulfínicos e sulfônicos, não foram detectados em nossas condições experimentais. Para excluir a presença de derivados sulfênicos, foram realizados experimentos em paralelo com a adição de dimedona (5,5-dimetil-1,3-ciclohexanodiona) (ELLIS; POOLE, 1997; REISZ et al., 2013) imediatamente após a

reação de PDI com peroxinitrito seguido de digestão e análise de MS (dados não mostrados).

Figura 11. Estimativa relativa do rendimento dos peptídeos alquilados e dissulfetos encontrados nas digestões trípticas de PDI não tratada (controle) ou PDI tratada com peroxinitrito 20 μM . (A) Os peptídeos correspondentes do domínio $-a$ da PDI. (B) Os peptídeos correspondentes do domínio $-a'$ da PDI. Os valores apresentados são a média de 3 experimentos independentes. As incubações e análises foram realizadas conforme descrito nos procedimentos experimentais e no texto.

A dificuldade na detecção de uma fração considerável dos tióis do domínio a oxidado à dissulfeto da PDI (Figura 11A) podem enfraquecer as nossas conclusões anteriores de que o peroxinitrito estequiométrico irá preferencialmente oxidar os tióis redox ativos da PDI e promover a oxidação não específica e irreversível na PDI. No entanto, a hidroxilação do Trp⁵² e Trp³⁹⁶ e a nitração da Tyr³⁹³ nos locais ativos foram detectadas como previsto (ver, por exemplo, Figura 12, Tabela 2). Além disso, a simulação cinética da oxidação do tiol por dois elétrons (57%) (Figura 8D) foi razoavelmente semelhante com a estimativa a partir dos experimentos de MS para o domínio a' da PDI (Figura 11B). Portanto, a discrepância entre o valor previsto (57%) e o valor estimado obtido a partir da análise de MS para o domínio a da PDI (Figura 11A) é provavelmente devido às dificuldades na detecção dos peptídeos trípticos do

domínio a da PDI por LC-MS/MS como relatado em diferentes estudos (KAETZEL et al., 2004; KOZAROVA et al., 2007; GONZÁLEZ-PERILLI et al., 2017). Estes peptídeos são ricos em aminoácidos altamente hidrofóbicos e essa propriedade, junto a outros fatores, resulta em uma menor probabilidade de detecção do peptídeo por LC-MS/MS (CHAMBERS et al., 2012; DOST et al., 2012).

4.3 OXIDAÇÃO DA PDI POR EXCESSO DE PEROXINITRITO

4.3.1 Excesso de peroxinitrito promove nitração, inativação e agregação da PDI.

A oxidação dos grupos tióis reativos da PDI é parte da função biológica da enzima e é reversível *in vivo*. Mas nos interessam também as modificações oxidativas irreversíveis, as quais podem alterar a estrutura e função fisiológica das proteínas. Assim, investigamos as modificações da PDI (10 μ M) tratadas com excesso de peroxinitrito por SDS-PAGE e *western blotting* (usando um anticorpo anti nitrotirosina) (Figura 12A - C). Os experimentos de SDS-PAGE mostraram que o peroxinitrito promove agregação da PDI dependente da concentração de peroxinitrito que tende a atingir um limite em 100 μ M (Figuras 12A e 12C). Em paralelo, os monómeros e os agregados da PDI mostraram-se nitrados após tratamento com concentrações acima de 40 μ M de peroxinitrito (Figura 12B). A nitração de proteínas não metálicas, como a PDI, por peroxinitrito é mediada pelos radicais produzidos a partir de sua homólise. (Equação (4.2.3)) (SANTOS; BONINI; AUGUSTO, 2000; AUGUSTO et al., 2002; FERRER-SUETA; RADI, 2009; RADI, 2013). Espera-se, portanto, que estes radicais produzam radicais derivados de PDI e de fato, experimentos de EPR utilizando o DBNBS como captador de spin demonstraram a

formação de radicais derivados de PDI em incubações de PDI tratadas com excesso de peroxinitrito (Figura 12D).

Na ausência de PDI, o sinal de EPR detectado (espectro superior) foi devido à oxidação DNBBS por peroxinitrito (LOPES DE MENEZES; AUGUSTO, 2001). Na presença de PDI, o sinal de EPR imobilizado (espectro inferior) pode ser atribuído aos radicais adutos DNBBS/ $\bullet$ Tyr-PDI e/ou DNBBS/ $\bullet$ Trp-PDI, uma vez que esses adutos não podem ser distinguidos pelos parâmetros de seus espectros de EPR (IQBAL et al., 2014). Finalmente, mostramos que a oxidação, nitração e agregação de PDI por tratamento com excesso de peroxinitrito leva à inativação da atividade insulina-redutase da enzima (Figura 12E). É importante ressaltar que nenhuma das alterações da PDI promovidas por peroxinitrito foi detectada na presença de peroxinitrito previamente decomposto (250 μ M) (adição reversa (R)) (Figura 12). Para caracterizar os principais produtos estáveis formados por oxidação da PDI por excesso de peroxinitrito, PDI reduzida (10 μ M) foi tratada com excesso de peroxinitrito (200 μ M) e incubado 5 min a 25°C. Em seguida, os tióis remanescentes foram bloqueados com iodoacetamida (55 mM) em meio desnaturante. Após a remoção de nitrato, nitrito e excesso de iodoacetamida, as amostras foram digeridas com tripsina e submetidas à análise de nano-ESI-Q-TOF-MS/MS como descrito nos procedimentos experimentais (MEDINAS et al., 2010; PAVIANI et al., 2015).

Figura 12. Excesso de peroxinitrito promove oxidação, nitração, inativação e agregação da PDI. (A) Análise por SDS-PAGE da PDI (10 µM) tratada com as concentrações especificadas de peroxinitrito (PN). Após 5 min de incubação, as amostras (8,4 µg de proteína) foram analisadas por SDS-PAGE e reveladas com azul de Coomassie. (B) *Western blotting* da PDI (10 µM) tratada com as concentrações especificadas de peroxinitrito como em (A). Após as incubações, as amostras (8,4 µg de proteína) foram analisadas por SDS-PAGE e marcadas com um anticorpo anti-nitrotirosina. (C) A porcentagem da PDI agregada após o tratamento com as concentrações especificadas de peroxinitrito. Os géis semelhantes aos mostrados em (A) foram escaneados e a intensidade relativa das bandas correspondente a PDI (a aproximadamente 55 kDa) foram quantificadas por densitometria e a porcentagem da PDI agregada foi calculada pela razão PDI agregada/PDI total x 100 para cada tratamento. (D) Espectros de EPR dos adutos radicais de DNBBS produzidos pela decomposição de peroxinitrito (360 µM) na presença de DNBBS (10 mM) e na ausência (traço superior) ou presença de PDI (60 µM) (traço inferior). $2a_N$ representa a distância em G entre os picos externos que corresponde aproximadamente ao dobro do valor da constante de desdobramento hiperfino do aduto radical no átomo de nitrogênio. (E) Inativação da PDI após tratamento com as concentrações especificadas de peroxinitrito. Após 5 min de incubação, as alíquotas foram removidas e a inativação da PDI foi monitorada pelo aumento do tempo (Lag-phases) necessário para que a precipitação da insulina alcançasse um valor de 0,1 a 540 nm. Todas as incubações foram realizadas em tampão fosfato (100 mM) contendo DTPA (0,1 mM), pH final 7,4, a 25 °C. As análises foram realizadas como descrito nos procedimentos experimentais. Os valores apresentados nos painéis (C) e (E) são a média ± desvio padrão obtido a partir de 3 experimentos independentes; *** p < 0,001, ** p < 0,01; * P < 0,05.

Estes resultados mostraram que os peptídeos trípticos da PDI contendo ambas as cisteínas redox ativas foram oxidados aos peptídeos dissulfetos respectivos como esperado, além de hidroxilados e/ou nitrados (Tabela 3). É importante notar que a intensidade dos peptídeos que contêm dissulfetos do domínio a da PDI foram detectados com um espectro de intensidade 10 vezes inferior à do domínio a' (Figura 13). Estes resultados reforçam os resultados obtidos para PDI tratada com 20 μ M de peroxinitrito (Figura 11), confirmando que é inerentemente difícil detectar o peptídeo tríptico contendo os ditíóis do domínio a da PDI por LC-MS/MS.

Para determinar se o excesso de peroxinitrito reage preferencialmente com resíduos específicos da PDI, estimamos os rendimentos dos peptídeos modificados e não modificados da PDI não tratada e tratada com peroxinitrito (200 μ M) em três experimentos independentes (a Tabela 3 mostra um destes experimentos). A área do pico do MS de cada peptídeo tríptico modificado foi calculada pela proporção entre o *extracted ion chromatogram* (XIC) para cada peptídeo e o *total ion chromatogram* (TIC) para cada amostra (Figura 13). Estes resultados mostraram que os peptídeos com as Cys alquiladas referentes aos sítios redox do domínio a e a' estavam praticamente ausentes na amostra tratada com peroxinitrito (cerca de 98% destes peptídeos estavam oxidados a dissulfetos) como já esperado, além disso a maioria dos peptídeos nitrados e/ou hidroxilados estão próximos aos tióis redox ativos da PDI (Figura 14).

Como observado na figura 13, a PDI não tratada (controle) não possui peptídeos modificados, exceto pelas Cys alquiladas dos motivos redox ativo. Para buscar os resíduos na PDI que reagem preferencialmente com peroxinitrito, analisamos o desaparecimento dos peptídeos não modificados na amostra de PDI tratada com peroxinitrito em comparação aos peptídeos da PDI não tratada. Os peptídeos

trípticos consumidos em maior proporção foram o $^{58}\text{ALAPEYAK}^{65}$ e o $^{453}\text{TVIDYNGER}^{461}$, cerca de 75 e 33 % destes peptídeos não foram detectados na amostra tratada com peroxinitrito, respectivamente (Figura 13). Em contrapartida, os mesmos peptídeos foram detectados nitrados nas amostras tratadas com excesso de peroxinitrito (Tabela 3 e Apêndice B). Todos os peptídeos modificados (Figura 13 e Tabela 3) foram caracterizados por MS/MS e estão apresentados individualmente nos apêndices (Apêndices B1-14).

Figura 13. Estimativa dos peptídeos não modificados e modificados obtidos da digestão tripticas de PDI (10 μ M) não tratada e tratada com peroxinitrito (200 μ M) como especificado. Os resíduos modificados estão especificados nos peptídeos com as notações Cr (Cys alquilada); Cd (Cys dissulfeto); W(OH), Trp hidroxilado; e Y(NO₂), tirosina nitrada. Os valores são a média $\pm$ desvio padrão obtido a partir de 3 experimentos independentes. As incubações e análises foram realizadas conforme descrito nos procedimentos experimentais e no texto.

Figura 14. Resíduos da PDI encontrados hidroxilados e nitrados pelo excesso de peroxinitrito. Os resíduos aromáticos encontrados nitrados e/ou hidroxilados por excesso de peroxinitrito sobre os tióis redox ativos da PDI estão representados em vermelho, e os não modificados estão representados em azul. Os resíduos de Cys oxidados dos domínios a e a' estão representados em amarelo. A estrutura da PDI humana foi adaptada do PDB 4EL1 e está representada pelos domínios a, b, b' e a'.

Tabela 3. Caracterização por ESI-Q-TOF-MSMS das modificações oxidativas da PDI promovida por excesso de peroxinitrito^a.

Peptídeos ^b	Massa teórica (M+H)	m/z (z)	Massa Experimental	Íon score ^c	Tempo de retenção	Aminoácidos modificados
⁴³ YLLVEFYAPWCGHCK ⁵⁷	1942.8985	648.301 (3H ⁺)	1941.8811	75	43.55	(C ⁵³ - C ⁵⁶) - 2H
⁴³ YLLVEFYAPWCGHCK ⁵⁷	1871.825	624.6102 (3H ⁺)	1870.8088	62	47.55	(C ⁵³ - C ⁵⁶) - 2H e Y ⁴³ + 45 (NO ₂)
⁴³ YLLVEFYAPWCGHCK ⁵⁷	1871.825	624.6083 (3H ⁺)	1870.8031	48	48.99	(C ⁵³ - C ⁵⁶) - 2H e Y ⁴⁹ + 45 (NO ₂)
⁴³ YLLVEFYAPWCGHCK ⁵⁷	1842.8348	614.9465 (3H ⁺)	1841.8177	52	38.68	C ⁵³ - C ⁵⁶) - 2H e W ⁵² + 16 (OH)
⁴³ YLLVEFYAPWCGHCK ⁵⁷	1871.825	624.6091 (3H ⁺)	1870.8053	37	45.78	C ⁵³ - C ⁵⁶) - 2H e W ⁵² + 45 (NO ₂)
⁵⁸ ALAPEYAK ⁶⁵	907.4526	454.2268 (2H ⁺)	906.4391	50	23.68	Y ⁶³ + 45 (NO ₂)
⁸² VDATEESDLAQYGV ⁹⁷	1825.8205	609.2753 (3H ⁺)	1824.8041	107	38.02	Y ⁹⁴ + 45 (NO ₂)
¹²¹ EADDIVNWLK ¹³⁰	1247.5909	624.2952 (2H ⁺)	1246.5759	56	41.61	W ¹²⁸ + 45 (NO ₂)
¹⁹⁶ YQLDKDGVVLFK ²⁰⁷	1469.7641	490.5897 (3H ⁺)	1468.7474	93	33.50	Y ¹⁹⁶ + 45 (NO ₂)
³²⁷ YKPESEELTAER ³³⁸	1496.6869	499.5638 (3H ⁺)	1495.6694	67	22.56	Y ³²⁷ + 45 (NO ₂)
³⁸⁷ NVFVEFYAPWCGHCK ⁴⁰¹	1797.7883	599.9281 (3H ⁺)	1796.7624	41	44.58	(C ³⁹⁷ - C ⁴⁰⁰) - 2H
³⁸⁷ NVFVEFYAPWCGHCK ⁴⁰¹	1842.7733	614.9267 (3H ⁺)	1841.7583	58	47.89	(C ³⁹⁷ - C ⁴⁰⁰) - 2H e Y ³⁹³ + 45 (NO ₂)
³⁸⁷ NVFVEFYAPWCGHCK ⁴⁰¹	1813.7832	605.2646 (3H ⁺)	1812.7721	54	36.24	(C ³⁹⁷ - C ⁴⁰⁰) - 2H e W ³⁹⁶ + 16 (OH)
³⁸⁷ NVFVEFYAPWCGHCK ⁴⁰¹	1842.7733	614.9271 (3H ⁺)	1841.7594	53	44.43	(C ³⁹⁷ - C ⁴⁰⁰) - 2H e W ³⁹⁶ + 45 (NO ₂)
⁴⁰² QLAPIWDK ⁴⁰⁹	1015.5213	508.2596 (2H ⁺)	1014.5046	44	30.33	W ⁴⁰⁷ + 45 (NO ₂)
⁴⁵³ TVIDYNGER ⁴⁶¹	1111.5021	556.2491 (2H ⁺)	1110.4836	48	26.17	Y ⁴⁵⁷ + 45 (NO ₂)

^a PDI reduzida (10 µM) foi incubada com peroxinitrito (200 µM) em tampão fosfato (100mM) pH 7,4 e DTPA (0,1 mM) a 25 °C por 5 min. As amostras foram alquiladas em tampão desnaturante, digeridas com tripsina e submetidas a LC-MS/MS como descrito nos procedimentos experimentais.

^b Apenas os peptídeos modificados estão mostrados nesta coluna com exceção dos peptídeos que foram detectados modificados no controle e dos peptídeos do domínio a' com *missed cleavages*, através da análise pelo MASCOT a % de cobertura da sequência da proteína foi em média de 81 %.

^c Íon score é -10 log (P) onde P é a probabilidade da marca observada ser um evento aleatório. Em média, íon score individual >56 indica extensa identidade ou homologia (p < 0.01).

5 DISCUSSÃO

A PDI está envolvida em uma ampla variedade de funções celulares e o aumento da sua expressão é considerado uma defesa celular para restabelecer a proteostase celular em diversas condições de estresse oxidativo. Apesar desta função crucial, a PDI pode tornar-se disfuncional devido as modificações pós-traducionais atípicas e/ou excessivas causadas por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (SANTOS et al., 2009; PARAKH; ATKIN, 2015). No entanto, a cinética e os produtos dessas reações ainda não foram totalmente caracterizados.

Neste trabalho, mostramos que a diminuição da fluorescência intrínseca da PDI após a oxidação dos seus ditióis é apropriada para determinar as constantes de velocidade de segunda ordem da reação da enzima com peróxido de hidrogênio (Figura 5) e peroxinitrito (Figura 6). Por outro lado, diferente do comportamento observado durante a oxidação da PDI por GSSG (TOWNSEND et al., 2009; WANG et al., 2012), a diminuição da fluorescência não foi acompanhada por um deslocamento no comprimento máximo de emissão quando a PDI foi oxidada por peróxido de hidrogênio e peroxinitrito (ver, por exemplo, a Figura 5). Esta diferença é provavelmente devido ao fato de que a glutationilação dos tióis redox ativos da PDI interfere no ambiente do triptofano localizados nestes sítios ativos (Trp⁵² e Trp³⁹⁶) ao contrário das ligações dissulfetos formadas pelo peróxido de hidrogênio ou peroxinitrito (Figura 10 e Tabela 2). O ponto crucial para selecionar a abordagem cinética adequada para determinação das constantes de velocidade de segunda ordem foi estabelecer as condições em que os ditióis da PDI foram os principais alvos do oxidante através da reversão após adição de DTT (Figuras 5 e 6). Com base nestes experimentos, foi possível aplicar a abordagem de pseudo-primeira para determinar a constante de velocidade de segunda ordem da reação entre os

ditióis da PDI com peróxido de hidrogênio ($k = 17,3 \pm 1,3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7,4, 25 °C) (Figura 5) mas isso não foi possível com peroxinitrito. Mesmo com pequeno excesso do oxidante em relação aos tióis redox ativos da PDI, resíduos adicionais da PDI foram oxidados por peroxinitrito, alterando a fluorescência intrínseca da proteína (Figura 6B e C). Portanto, a constante de velocidade de segunda ordem da reação entre os tióis reativos da PDI com peroxinitrito foi determinada pela abordagem da velocidade inicial usando baixas concentrações do oxidante ($k = (6,9 \pm 0,2 \times 10^4) \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7,4 e 25 °C) (Figura 6D).

Nossos estudos cinéticos indicaram que ambas as cisteínas reativas da PDI (Cys⁵³ e Cys³⁹⁷) reagem de maneira indistinguível com peróxido de hidrogênio, já que a cinética da reação foi ajustada em uma exponencial simples (Figura 5). Por outro lado, pelo fato da cinética da reação entre os ditióis da PDI e peroxinitrito não ter sido estudada em condições de pseudo-primeira ordem, fica difícil fazer a mesma inferência somente a partir dos estudos cinéticos. Todavia, o fato de que peroxinitrito estequiométrico aos tióis reativos da PDI promove a variação da fluorescência da PDI na mesma extensão do que excesso de peróxido de hidrogênio (Figura 6 B), indica que os tióis reativos da PDI também reagem com peroxinitrito com velocidades similares como o fazem com peróxido de hidrogênio.

As constantes de velocidade de segunda ordem determinadas acima foram expressas em relação a concentração de PDI, mas se elas são expressas em relação aos tióis ativos dos domínios a e a' da PDI, as constantes se tornam $8,65 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e $3,45 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para peróxido de hidrogênio e peroxinitrito, respectivamente.

Neste ponto, podemos concluir que a diminuição da fluorescência da PDI pode ser útil na determinação da cinética da reação dos ditióis da PDI com outros peróxidos de importância biológica, incluindo os hidroperóxidos derivados de lipídios,

aminoácidos e outros derivados de biomoléculas (GENARO-MATTOS et al., 2015; DAVIES, 2016; CARVALHO et al., 2017).

Embora ambos os resíduos de cisteínas redox ativos da PDI tenham baixo pKa, as constantes de velocidade de segunda ordem de cada motivo redox com peróxido de hidrogênio ($k = 8,65 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) ou peroxinitrito ($k = 3,45 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) são consideravelmente inferiores aos determinados para outros resíduos de cisteínas de baixo pKa de outras proteínas, como aqueles presentes nas peroxirredoxinas (k no intervalo de 10^5 a $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (HALL; KARPLUS; POOLE, 2009; HUGO et al., 2009; NAGY et al., 2011). Os resultados obtidos com PDI constituem outro exemplo que demonstra que o baixo pKa dos resíduos de cisteínas em proteínas não é o único fator que controla sua reatividade frente aos peróxidos (FERRER-SUETA et al., 2011). De qualquer forma, peróxido de hidrogênio e peroxinitrito reagem aproximadamente dez vezes mais rapidamente com ambas as cisteínas redox ativas da PDI (Cys⁵³ e Cys³⁹⁷) do que com os resíduos de cisteínas de proteínas às quais não foram atribuídas funções redox importantes, como a albumina de soro bovino ($k = 1,1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ e $2,8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente, a pH 7,4, 37 °C) (RADI et al., 1991). Este fato e a alta abundância de PDI no RE e outros locais celulares indicam que a oxidação dos ditióis da PDI por peróxido de hidrogênio (KARALA et al., 2009) ou por peroxinitrito pode se tornar fisiologicamente significativa.

A oxidação da PDI por peroxinitrito tornar-se particularmente relevante porque não se limita à oxidação dos ditióis da PDI em dissulfetos, que é funcional e reversível por agentes redutores biológicos, mas também pode levar a modificações que não são reparadas *in vivo* (Figuras 6, 13 e 12). Desta forma, demonstramos que embora os ditióis da PDI sejam os principais alvos do peroxinitrito (Figuras 5-7), concentrações estequiométricas do oxidante em relação aos tióis redox ativos da

PDI causaram modificações adicionais em resíduos próximos aos dissulfetos (Tabela 2). Como já relatado, a oxidação para dissulfeto pode ser revertida por redutores biológicos, mas os resíduos de triptofano oxidados (Trp⁵² e Trp³⁹⁶) e o resíduo tirosina nitrado (Tyr³⁹³) não são reparados, e podem ter consequências ainda desconhecidas *in vivo*. Aparentemente, as concentrações de peroxinitrito até 40 μM não promoveram uma inativação estatisticamente significativa da atividade redutase da PDI (Figura 12E). Deve ser notado que a fração de peroxinitrito que se decompõe a radicais depende das concentrações relativas do oxidante e de seu alvo. Simulação cinética indicou que na reação de 10 μM PDI com 20 μM peroxinitrito, 43% do oxidante decai para radicais, produzindo o rendimento total de 5,2 μM de radicais (2,6 μM de cada, radical hidroxila e dióxido de nitrogênio) (Figura 8D). No entanto, quando simulamos a mesma reação utilizando concentração de PDI próxima às encontradas no RE (500 μM), verificamos que 99% do oxidante (20 μM) reagirá com os ditióis da PDI e 1% decairá para nitrato e radicais, produzindo um rendimento total 0,12 μM de radicais (Apêndice A). Outras situações podem ser simuladas, como a presença do fisiologicamente ubíquo CO_2 , o qual competirá com a PDI pelo peroxinitrito e formará além do radical dióxido de nitrogênio e o ânion radical carbonato (AUGUSTO et al., 2002). Simulando a reação de 500 μM PDI com 20 μM peroxinitrito em presença de concentrações fisiológicas de CO_2 (1,3 mM), verificamos que 50,2% do peroxinitrito reagirá com os ditióis da PDI e uma fração similar reagirá com o CO_2 (49,25%) produzindo radicais carbonato e dióxido de nitrogênio (3,45 μM de cada) (Apêndice A). Assim, em presença de CO_2 a oxidação da PDI por peroxinitrito deve resultar em diminuição da oxidação dos ditióis a dissulfetos e aumento das oxidações e nitrações irreversíveis da enzima.

Uma vez que os fluxos de peroxinitrito sob condições fisiológicas devem ser baixos (FERRER-SUETA; RADI, 2009), a PDI pode atuar como uma rota de detoxificação para o peroxinitrito em ambientes ricos em PDI, como o RE. Contudo, presume-se que uma pequena fração de PDI sofrerá modificações oxidativas diferentes da formação de dissulfetos. Portanto, a catálise de ciclos repetitivos de detoxificação do peroxinitrito pode resultar em PDI disfuncional.

Pode-se argumentar que o peroxinitrito não seja produzido no RE devido à falta de uma fonte do ânion radical superóxido, uma vez que os principais candidatos, Ero1 e Nox, reduzem o oxigênio molecular principalmente a peróxido de hidrogênio (HATAHET; RUDDOCK, 2009). No entanto, o peroxinitrito pode se difundir por distâncias consideráveis ambientes biológicos (WINTERBOURN, 2008) atingindo eventualmente o RE. Por outro lado, a PDI é encontrada em outros compartimentos celulares como no citossol, superfície celular e matriz extracelular (nestes ambientes a PDI é denominada PDI peri/epicelular ou PecPDI) (LAURINDO; PESCATORE; FERNANDES, 2012; PARAKH; ATKIN, 2015; TANAKA et al., 2016; SOARES MORETTI; MARTINS LAURINDO, 2017). O citossol e o ambiente extracelular, em particular, possuem fontes enzimáticas de ânion superóxido e óxido nítrico, e desta forma podem favorecer o encontro de peroxinitrito com a PecPDI. Nessas circunstâncias, os baixos níveis de PecPDI, em comparação a PDI do RE que é encontrada na ordem de mM, e o esperado maior fluxo de peroxinitrito provavelmente resultarão em modificações irreversíveis que inativam a PDI.

Deve ser notado que a função clássica da PDI no RE está relacionada com o enovelamento oxidativo devido ao ambiente redox favorável à formação de pontes dissulfeto. Além do ambiente mais oxidante do RE (razão GSH/GSSG de 3-5:1,

enquanto no citossol é de 100:1), nele estão presentes proteínas redox como a Ero1, a qual colabora com a função da PDI no enovelamento oxidativo de proteínas nascentes no RE (WILKINSON; GILBERT, 2004). Por outro lado, diferente da PDI do RE a PecPDI parece funcionar prioritariamente como uma redutase de tióis proteicos. Por exemplo, já foi relatado que a PDI reduzida forma um complexo com integrinas em células endoteliais e aumenta o número de tióis reduzidos destas proteínas que passam a ter maior afinidade por seus ligantes (SWIATKOWSKA et al., 2008). Similarmente, a PDI reduzida localizada na superfície de neutrófilos foi considerada ter um papel fundamental na adesão destas células mediada por integrinas durante a inflamação vascular (HAHM et al., 2013). Outro estudo sugere que PDI reduzida é responsável por ativar o Fator Tecidual (também chamado de tromboplastina, tendo um papel fundamental no processo de coagulação sanguínea) por isomerização de um dissulfeto intramolecular, desencadeando a formação de fibrina que seria o passo inicial para o processo de coagulação após lesão vascular (REINHARDT et al., 2008). Nessas situações, a oxidação reversível dos ditióis promovida por peroxinitrito pode inativar temporariamente a PecPDI. Por outro lado, as oxidações irreversíveis poderiam gerar consequências mais graves.

De fato, o excesso de peroxinitrito sobre os tióis redox ativos da PDI promoveu nitração, agregação e inativação da PDI de maneira dependente da concentração, provavelmente intermediados através de radicais derivados de PDI (Figura 12) (AUGUSTO et al., 2002; FERRER-SUETA; RADI, 2009; RADI, 2013). Esses radicais foram radicais PDI-tirosil e/ou PDI-triptofanil como indicado pelos parâmetros de EPR do radical aduto de DNBBS (Figura 12D). Não surpreendentemente, a análise por MS e MS/MS dos produtos de oxidação da PDI (10 μ M) tratada com peroxinitrito (200 μ M) mostrou que a PDI foi nitrada em Tyr⁴³,

Tyr⁴⁹, Tyr⁶³, Tyr⁹⁴, Tyr³²⁷, Tyr³⁹³, Tyr⁴⁵⁷, Trp¹²⁸ e Trp³⁹⁶ e hidroxilada em Trp⁵² e Trp³⁹⁶ (Figura 13 e 14; Tabela 3). Estes resultados são consistentes com a reatividade já conhecida do peroxinitrito (Equações (4.2.1- 4.2.4)) (Figura 4 e 15). O peroxinitrito oxida os tióis em uma estequiometria de 1:2 (OGUSUCU et al., 2007; TRUJILLO; FERRER-SUETA; RADI, 2008) e sofre uma decomposição mais lenta quando protonado, para radicais hidroxila e dióxido de nitrogênio que podem oxidar, nitrar e hidroxilar resíduos de aminoácidos aromáticos (AUGUSTO et al., 2002; BONINI; FERNANDES; AUGUSTO, 2004; FERRER-SUETA; RADI, 2009). No entanto, é importante ressaltar que as cadeias laterais de todos os aminoácidos, bem como as ligações peptídicas, são alvos do radical hidroxila que é extremamente reativo (DAVIES; DEAN, 1997; WINTERBOURN, 2008). Todavia, todos os outros possíveis produtos não foram pesquisados durante a análise por MS e MS/MS. Além disso, não tentamos caracterizar os produtos da PDI presentes em seus agregados (Figura 12A-C), pois essas análises requerem ferramentas que ainda estão em desenvolvimento (ANNIBAL et al., 2016). A caracterização desses produtos ajudará a elucidar a cadeia de eventos que levam à agregação da PDI.

Um fato interessante foi a observação de que a maioria dos resíduos da PDI que se encontraram nitrados e/ou hidroxilados por excesso de peroxinitrito estão próximos dos sítios redox ativos (Figuras 13 e 14; Tabela 3). Esta preferência poderia sugerir uma possível interação do peroxinitrito com os sítios redox ativos da PDI. Tal possibilidade é difícil de conciliar com o fato de que o peroxinitrito é uma molécula pequena e instável no pH fisiológico. Provavelmente, a preferência foi definida pela acessibilidade dos resíduos do sítio ativo ao solvente como indicado por uma série de estudos que mostram que quando o oxidante está presente na fase

aquosa, os resíduos mais expostos ao solvente são mais rapidamente oxidados (DAVIES, 2005).

Outro fato importante foi a intensidade relativamente baixa do espectro de MS dos peptídeos trípticos, tanto os peptídeos alquilados como os dissulfetos, que contêm o ditiol no domínio a em comparação com o domínio a' da PDI (Figura 11 e 13). Nós atribuímos esses resultados às propriedades intrínsecas dos peptídeos do domínio a, que tornam difícil suas detecções por LC-MS/MS (ver Resultados). Dificuldades semelhantes foram relatadas em outros estudos (KAETZEL et al., 2004; KOZAROVA et al., 2007; GONZÁLEZ-PERILLI et al., 2017), alguns dos quais inferiram sobre diferenças no comportamento dos domínios a e a' da PDI. Esta inferência pode ser prematura e deve ser confirmada por suporte experimental adicional. De fato, serão necessários mais estudos para esclarecer os papéis dos domínios individuais da PDI nas funções fisiológicas da enzima (SOARES MORETTI; MARTINS LAURINDO, 2017). Em nossos estudos, empregamos metodologias diversas que, em conjunto, indicam que os domínios a e a' da PDI se comportam de forma semelhante na oxidação mediada pelo peroxinitrito e todos os nossos dados são consistentes com o mecanismo proposto na Figura 15.

Figura 15. Representação esquemática do mecanismo de reação entre PDI e peroxinitrito. Os resíduos de cisteínas redox ativos da PDI são os alvo preferenciais do peroxinitrito que também promove hidroxilação e nitração da PDI através dos radicais produzidos a partir da decomposição de peroxinitrito catalisada por próton. Estes radicais são produzidos em rendimentos que dependem das concentrações relativas de PDI e peroxinitrito. A figura mostra a situação nas condições experimentais testadas (10 μM de PDI reagindo com 20 ou 200 μM de peroxinitrito). O excesso de peroxinitrito sobre os tióis redox ativos da PDI decai principalmente através do processo catalisado por próton para radicais hidroxila e dióxido de nitrogênio, que por sua vez, promove novas modificações na PDI.

6 CONCLUSÃO

Nossos estudos demonstraram que o decréscimo da fluorescência intrínseca da PDI quando ocorre a oxidação de seus tióis ativos oferece uma abordagem adequada para estudar a cinética da reação da enzima com H_2O_2 e peroxinitrito. Portanto, pode ser útil para estudar a reatividade da PDI com outros oxidantes biológicos de interesse. Isso é importante porque o conhecimento da cinética das reações de oxidantes é crucial para a compreensão de seus papéis fisiológicos (WINTERBOURN; HAMPTON, 2008; TOLEDO; AUGUSTO, 2012).

Demonstramos que os tióis reativos da PDI (Cys^{53} e Cys^{397}) são os principais alvos do peroxinitrito, sendo oxidados aos derivados sulfênicos correspondentes que, subsequentemente, reagem com os tióis vizinhos (Cys^{56} e Cys^{400}), produzindo dissulfetos (Figura 15). Demonstramos também que ambos os resíduos de cisteína redox ativos da PDI reagem com peroxinitrito com velocidades consideráveis, constituindo uma eventual rota de detoxificação para este oxidante em ambientes ricos em PDI, como o RE.

Embora considerável, a constante de velocidade da reação de peroxinitrito com os tióis da PDI não é suficiente para impedir que, mesmo em concentrações estequiométricas, parte do oxidante decomponha a radicais, promovendo dano irreversível à PDI. Por isso, ciclos repetitivos de catálise de detoxificação de peroxinitrito por PDI podem resultar no acúmulo de modificações não reparáveis na enzima, perturbando a proteostase celular.

Evidentemente, frente a excesso de peroxinitrito a PDI sofre oxidação, nitração inespecífica, inativação e até agregação. É difícil imaginar situações fisiológicas nas quais fluxos de peroxinitrito possam exceder a concentração de PDI no RE, mas isso poderia ocorrer em outros compartimentos celulares onde a PDI já

foi detectada, como matriz extracelular e citoplasma. Mesmo a oxidação dos ditióis à dissulfetos pode ser prejudicial a processos fisiológicos que requeiram PDI em seu estado reduzido. Devemos notar que a PDI já foi detectada nitrada em pacientes humanos e em modelos animais (CASONI et al., 2005; VATTEMI et al., 2011; MARSHALL et al., 2013).

Uma vez que a PDI tem sido implicada tanto na sinalização (LAURINDO; PESCATORE; FERNANDES, 2012; PESCATORE et al., 2012; TANAKA et al., 2016) quanto em eventos danosos (KIM et al., 2000; RABEK; BOYLSTON; PAPACONSTANTINO, 2003; UEHARA et al., 2006; VATTEMI et al., 2011; MARSHALL et al., 2013), sua interação com peroxinitrito pode contribuir para o mecanismo patogênico de vários estados patológicos.

7 REFERÊNCIAS

- ANNIBAL, A.; COLOMBO, G.; MILZANI, A.; DALLE-DONNE, I.; FEDOROVA, M.; HOFFMANN, R. Identification of dityrosine cross-linked sites in oxidized human serum albumin. **Journal of Chromatography B**, Analytical tools and protocols in oxidative stress. v. 1019, p. 147–155, 15 abr. 2016.
- AUGUSTO, O.; BONINI, M. G.; AMANSO, A. M.; LINARES, E.; SANTOS, C. C. X.; DE MENEZES, S. L. Nitrogen Dioxide and Carbonate Radical Anion: Two Emerging Radicals in Biology. **Free radical biology & medicine**, v. 32, n. 9, p. 841–859, 1 maio 2002.
- BECKMAN, J. S.; CHEN, J.; ISCHIROPOULO, H.; CROW, J. P. Oxidative Chemistry of Peroxynitrite. **Methods in enzymology**, v. 233, n. 23, p. 229–240, 1994.
- 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, n. 2, p. 344–351, 20 jan. 2004.
- BONINI, M. G.; RADI, R.; FERRER-SUETA, G.; FERREIRA, A. M.; AUGUSTO, O. Direct EPR Detection of the Carbonate Radical Anion Produced from Peroxynitrite and Carbon Dioxide. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 16, p. 10802–10806, 16 abr. 1999.
- BROWN, G. C.; BORUTAITE, V. Inhibition of Mitochondrial Respiratory Complex I by Nitric Oxide, Peroxynitrite and S-Nitrosothiols. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1658, n. 1–2, p. 44–49, 23 jul. 2004.
- CARBONE, D. L.; DOORN, J. A.; KIEBLER, Z.; PETERSEN, D. R. Cysteine Modification by Lipid Peroxidation Products Inhibits Protein Disulfide Isomerase. **Chemical Research in Toxicology**, v. 18, n. 8, p. 1324–1331, ago. 2005.
- CARVALHO, L. A. C.; TRUZZI, D. R.; FALLANI, T. S.; ALVES, S. V.; TOLEDO, J. C.; AUGUSTO, O.; NETTO, L. E. S.; MEOTTI, F. C. Urate Hydroperoxide Oxidizes Human Peroxiredoxin 1 and Peroxiredoxin 2. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 21, p. 8705–8715, 26 maio 2017.
- CASONI, F.; BASSO, M.; MASSIGNAN, T.; GIANAZZA, E.; CHERONI, C.; SALMONA, M.; BENDOTTI, C.; BONETTO, V. Protein Nitration in a Mouse Model of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis: Possible Multifunctional Role in the Pathogenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 16, p. 16295–16304, 22 abr. 2005.
- CHAMBERS, M. C.; MACLEAN, B.; BURKE, R.; AMODEI, D.; RUDERMAN, D. L.; NEUMANN, S.; GATTO, L.; FISCHER, B.; PRATT, B.; EGERTSON, J.; HOFF, K.; KESSNER, D.; TASMAN, N.; SHULMAN, N.; FREWEN, B.; BAKER, T. A.; BRUSNIAK, M.-Y.; PAULSE, C.; CREASY, D.; FLASHNER, L.; KANI, K.; MOULDING, C.; SEYMOUR, S. L.; NUWAYSIR, L. M.; LEFEBVRE, B.; KUHLMANN, F.; ROARK, J.; RAINER, P.; DETLEV, S.; HEMENWAY, T.; HUHMER, A.; LANGRIDGE, J.; CONNOLLY, B.; CHADICK, T.; HOLLY, K.; ECKELS, J.; DEUTSCH, E. W.; MORITZ, R. L.; KATZ, J. E.; AGUS, D. B.; MACCOSS, M.; TABB, D. L.; MALLICK, P. A Cross-Platform Toolkit for Mass Spectrometry and Proteomics. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 10, p. 918–920, out. 2012.

- DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; COLOMBO, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A. Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. **Clinical chemistry**, v. 52, n. 4, p. 601–623, abr. 2006.
- DAVIES, M. J. The Oxidative Environment and Protein Damage. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1703, n. 2, p. 93–109, 17 jan. 2005.
- DAVIES, M. J. Protein oxidation and peroxidation. **Biochemical Journal**, v. 473, n. Pt 7, p. 805–825, 1 abr. 2016.
- DAVIES, M. J.; DEAN, R. T. **Radical-mediated protein oxidation: From chemistry to medicine**. Oxford/New York: Oxford University Press, 1997.
- DAVIES, M. J.; FU, S.; WANG, H.; DEAN, R. T. Stable Markers of Oxidant Damage to Proteins and Their Application in the Study of Human Disease. **Free radical biology & medicine**, v. 27, n. 11–12, p. 1151–1163, dez. 1999.
- DAVIES, M. J.; HAWKINS, C. L. EPR Spin Trapping of Protein Radicals. **Free radical biology & medicine**, v. 36, n. 9, p. 1072–1086, 1 maio 2004.
- DEGENDORFER, G.; CHUANG, C. Y.; KAWASAKI, H.; HAMMER, A.; MALLE, E.; YAMAKURA, F.; DAVIES, M. J. Peroxynitrite-Mediated Oxidation of Plasma Fibronectin. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 97, p. 602–615, ago. 2016.
- DENICOLA, A.; FREEMAN, B. A.; TRUJILLO, M.; RADI, R. Peroxynitrite Reaction with Carbon Dioxide/Bicarbonate: Kinetics and Influence on Peroxynitrite-Mediated Oxidations. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 333, n. 1, p. 49–58, 1 set. 1996.
- DENICOLA, A.; SOUZA, J. M.; RADI, R. Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 7, p. 3566–3571, 31 mar. 1998.
- DICKHOUT, J. G.; HOSSAIN, G. S.; POZZA, L. M.; ZHOU, J.; LHOTÁK, S.; AUSTIN, R. C. Peroxynitrite Causes Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Human Vascular Endothelium: Implications in Atherogenesis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, n. 12, p. 2623–2629, dez. 2005.
- DOST, B.; BANDEIRA, N.; LI, X.; SHEN, Z.; BRIGGS, S. P.; BAFNA, V. Accurate Mass Spectrometry Based Protein Quantification via Shared Peptides. **Journal of Computational Biology: A Journal of Computational Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 4, p. 337–348, abr. 2012.
- EGWIM, I. O.; GRUBER, H. J. Spectrophotometric Measurement of Mercaptans with 4,4'-dithiodipyridine. **Analytical Biochemistry**, v. 288, n. 2, p. 188–194, 15 jan. 2001.
- ELLIS, H. R.; POOLE, L. B. Novel Application of 7-Chloro-4-Nitrobenzo-2-Oxa-1,3-Diazole to Identify Cysteine Sulfenic Acid in the AhpC Component of Alkyl Hydroperoxide Reductase. **Biochemistry**, v. 36, n. 48, p. 15013–15018, 2 dez. 1997.
- ExPASy - ProtParam tool**. Disponível em: <<http://web.expasy.org/protparam/>>. Acesso em: 20 jun. 2017.

- FERRER-SUETA, G.; MANTA, B.; BOTTI, H.; RADI, R.; TRUJILLO, M.; DENICOLA, A. Factors Affecting Protein Thiol Reactivity and Specificity in Peroxide Reduction. **Chemical Research in Toxicology**, v. 24, n. 4, p. 434–450, 18 abr. 2011.
- FERRER-SUETA, G.; RADI, R. Chemical Biology of Peroxynitrite: Kinetics, Diffusion, and Radicals. **ACS chemical biology**, v. 4, n. 3, p. 161–177, 20 mar. 2009.
- FOMENKO, D. E.; KOC, A.; AGISHEVA, N.; JACOBSEN, M.; KAYA, A.; MALINOUSKI, M.; RUTHERFORD, J. C.; SIU, K.-L.; JIN, D.-Y.; WINGE, D. R.; GLADYSHEV, V. N. Thiol Peroxidases Mediate Specific Genome-Wide Regulation of Gene Expression in Response to Hydrogen Peroxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 7, p. 2729–2734, 15 fev. 2011.
- GENARO-MATTOS, T. C.; QUEIROZ, R. F.; CUNHA, D.; APPOLINARIO, P. P.; DI MASCIIO, P.; NANTES, I. L.; AUGUSTO, O.; MIYAMOTO, S. Cytochrome c Reacts with Cholesterol Hydroperoxides to Produce Lipid- and Protein-Derived Radicals. **Biochemistry**, v. 54, n. 18, p. 2841–2850, 12 maio 2015.
- GONZÁLEZ-PERILLI, L.; MASTROGIOVANNI, M.; DE CASTRO FERNANDES, D.; RUBBO, H.; LAURINDO, F.; TROSTCHANSKY, A. Nitroarachidonic Acid (NO₂AA) Inhibits Protein Disulfide Isomerase (PDI) through Reversible Covalent Adduct Formation with Critical Cysteines. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1861, n. 5 Pt A, p. 1131–1139, maio 2017.
- HAHM, E.; LI, J.; KIM, K.; HUH, S.; ROGELJ, S.; CHO, J. Extracellular Protein Disulfide Isomerase Regulates Ligand-Binding Activity of α M β 2 Integrin and Neutrophil Recruitment during Vascular Inflammation. **Blood**, v. 121, n. 19, p. 3789–3800, S1-15, 9 maio 2013.
- HALL, A.; KARPLUS, P. A.; POOLE, L. B. Typical 2-Cys Peroxiredoxins: Structures, mechanisms and functions. **The FEBS journal**, v. 276, n. 9, p. 2469–2477, maio 2009.
- HATAHET, F.; RUDDOCK, L. W. Protein Disulfide Isomerase: A Critical Evaluation of Its Function in Disulfide Bond Formation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 11, p. 2807–2850, nov. 2009.
- HUGO, M.; TURELL, L.; MANTA, B.; BOTTI, H.; MONTEIRO, G.; NETTO, L. E. S.; ALVAREZ, B.; RADI, R.; TRUJILLO, M. Thiol and Sulfenic Acid Oxidation of AhpE, the One-Cysteine Peroxiredoxin from Mycobacterium Tuberculosis: Kinetics, Acidity Constants, and Conformational Dynamics. **Biochemistry**, v. 48, n. 40, p. 9416–9426, 13 out. 2009.
- IQBAL, A.; PAVIANI, V.; MORETTI, A. I.; LAURINDO, F. R. M.; AUGUSTO, O. Oxidation, Inactivation and Aggregation of Protein Disulfide Isomerase Promoted by the Bicarbonate-Dependent Peroxidase Activity of Human Superoxide Dismutase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 557, p. 72–81, 1 set. 2014.
- KAETZEL, R. S.; STAPELS, M. D.; BAROFSKY, D. F.; REED, D. J. Alkylation of Protein Disulfide Isomerase by the Episulfonium Ion Derived from the Glutathione Conjugate of 1,2-Dichloroethane and Mass Spectrometric Characterization of the Adducts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 423, n. 1, p. 136–147, 1 mar. 2004.
- KARALA, A.-R.; LAPPI, A.-K.; SAARANEN, M. J.; RUDDOCK, L. W. Efficient Peroxide-Mediated Oxidative Refolding of a Protein at Physiological pH and Implications for Oxidative Folding in the Endoplasmic Reticulum. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 5, p. 963–970, maio 2009.

- KARALA, A.-R.; PSARRAKOS, P.; RUDDOCK, L. W.; KLAPPA, P. Protein Disulfide Isomerases from *C. Elegans* Are Equally Efficient at Thiol-Disulfide Exchange in Simple Peptide-Based Systems but Show Differences in Reactivity towards Protein Substrates. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 9, n. 11, p. 1815–1823, nov. 2007.
- KAUR, H.; LEUNG, K. H. W.; PERKINS, M. J. A Water-Soluble, Nitroso-Aromatic Spin-Trap. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 3, p. 142–143, 1 jan. 1981.
- KIM, H. T.; RUSSELL, R. L.; RAINA, A. K.; HARRIS, P. L.; SIEDLAK, S. L.; ZHU, X.; PETERSEN, R. B.; SHIMOHAMA, S.; SMITH, M. A.; PERRY, G. Protein Disulfide Isomerase in Alzheimer Disease. **Antioxidants & redox signaling**, v. 2, n. 3, p. 485–489, 2000.
- KIM, J.; LEE, H.; LEE, J. H.; KWON, D. Y.; GENOVESIO, A.; FENISTEIN, D.; OGIER, A.; BRONDANI, V.; GRAILHE, R. Dimerization, Oligomerization, and Aggregation of Human Amyotrophic Lateral Sclerosis Cu/Zn-Superoxide Dismutase 1 Mutant Forms in Live Cells. **The Journal of biological chemistry**, 1 abr. 2014.
- KISSNER, R.; NAUSER, T.; BUGNON, P.; LYE, P. G.; KOPPENOL, W. H. 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, n. 11, p. 1285–1292, nov. 1997.
- KOZAROVA, A.; SLISKOVIC, I.; MUTUS, B.; SIMON, E. S.; ANDREWS, P. C.; VACRATIS, P. O. Identification of Redox Sensitive Thiols of Protein Disulfide Isomerase Using Isotope Coded Affinity Technology and Mass Spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 18, n. 2, p. 260–269, fev. 2007.
- LAPPI, A.-K.; RUDDOCK, L. W. Reexamination of the Role of Interplay between Glutathione and Protein Disulfide Isomerase. **Journal of Molecular Biology**, v. 409, n. 2, p. 238–249, 3 jun. 2011.
- LAURINDO, F. R. M.; PESCATORE, L. A.; FERNANDES, D. de C. Protein Disulfide Isomerase in Redox Cell Signaling and Homeostasis. **Free radical biology & medicine**, v. 52, n. 9, p. 1954–1969, 1 maio 2012.
- LINTON, S.; DAVIES, M. J.; DEAN, R. T. Protein oxidation and ageing. **Experimental Gerontology, Molecule Aging**. v. 36, n. 9, p. 1503–1518, 1 set. 2001.
- LOBACHEV, V. L.; RUDAKOV, E. S. The Chemistry of Peroxynitrite. Reaction Mechanisms and Kinetics. **Russian Chemical Reviews**, v. 75, n. 5, p. 375, 2006.
- LOPES DE MENEZES, S.; AUGUSTO, O. EPR Detection of Glutathionyl and Protein-Tyrosyl Radicals during the Interaction of Peroxynitrite with Macrophages (J774). **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 43, p. 39879–39884, 26 out. 2001.
- MARLA, S. S.; LEE, J.; GROVES, J. T. Peroxynitrite rapidly permeates phospholipid membranes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 26, p. 14243–14248, 23 dez. 1997.
- MARSHALL, A.; LUTFEALI, R.; RAVAL, A.; CHAKRAVARTI, D. N.; CHAKRAVARTI, B. Differential Hepatic Protein Tyrosine Nitration of Mouse due to Aging - Effect on Mitochondrial Energy Metabolism, Quality Control Machinery of the Endoplasmic Reticulum and Metabolism of Drugs. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 430, n. 1, p. 231–235, 4 jan. 2013.
- MEDINAS, D. B.; GOZZO, F. C.; SANTOS, L. F. A.; IGLESIAS, A. H.; AUGUSTO, O. A ditryptophan cross-link is responsible for the covalent dimerization of human superoxide dismutase 1 during its

bicarbonate-dependent peroxidase activity. **Free radical biology & medicine**, v. 49, n. 6, p. 1046–1053, 15 set. 2010.

MENDES, P. Biochemistry by Numbers: Simulation of Biochemical Pathways with Gepasi 3. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, n. 9, p. 361–363, set. 1997.

NAGY, P.; KARTON, A.; BETZ, A.; PESKIN, A. V.; PACE, P.; O'REILLY, R. J.; HAMPTON, M. B.; RADOM, L.; WINTERBOURN, C. C. Model for the Exceptional Reactivity of Peroxiredoxins 2 and 3 with Hydrogen Peroxide: A Kinetic and Computational Study. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 20, p. 18048–18055, 20 maio 2011.

NILES, J. C.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Peroxynitrite-Induced Oxidation and Nitration Products of Guanine and 8-Oxoguanine: Structures and Mechanisms of Product Formation. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v. 14, n. 2, p. 109–121, mar. 2006.

OGUSUCU, R.; RETTORI, D.; MUNHOZ, D. C.; NETTO, L. E. S.; AUGUSTO, O. Reactions of Yeast Thioredoxin Peroxidases I and II with Hydrogen Peroxide and Peroxynitrite: Rate Constants by Competitive Kinetics. **Free radical biology & medicine**, v. 42, n. 3, p. 326–334, 1 fev. 2007.

PARAKH, S.; ATKIN, J. D. Novel Roles for Protein Disulphide Isomerase in Disease States: A Double Edged Sword? **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 3, p. 30, 2015.

PAVIANI, V.; QUEIROZ, R. F.; MARQUES, E. F.; DI MASCIO, P.; AUGUSTO, O. Production of Lysozyme and Lysozyme-Superoxide Dismutase Dimers Bound by a Dityryptophan Cross-Link in Carbonate Radical-Treated Lysozyme. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 89, p. 72–82, dez. 2015.

PAXINO, E.; CHEN, Q.; WEISSE, M.; GIASSEN, B. I.; NORRIS, E. H.; RUETER, S. M.; TROJANOWSKI, J. Q.; LEE, V. M.; ISCHIROPOULOS, H. Induction of Alpha-Synuclein Aggregation by Intracellular Nitritative Insult. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 21, n. 20, p. 8053–8061, 15 out. 2001.

PESCATORE, L. A.; BONATTO, D.; FORTI, F. L.; SADOK, A.; KOVACIC, H.; LAURINDO, F. R. M. Protein Disulfide Isomerase Is Required for Platelet-Derived Growth Factor-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Migration, Nox1 NADPH Oxidase Expression, and RhoGTPase Activation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 35, p. 29290–29300, 24 ago. 2012.

QUIJANO, C.; ALVAREZ, B.; GATTI, R. M.; AUGUSTO, O.; RADI, R. Pathways of Peroxynitrite Oxidation of Thiol Groups. **The Biochemical journal**, v. 322 (Pt 1), p. 167–173, 15 fev. 1997.

RABEK, J. P.; BOYLSTON, W. H.; PAPAConstantinou, J. Carbonylation of ER Chaperone Proteins in Aged Mouse Liver. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 305, n. 3, p. 566–572, 6 jun. 2003.

RADI, R. Peroxynitrite, a Stealthy Biological Oxidant. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 37, p. 26464–26472, 13 set. 2013.

RADI, R.; BECKMAN, J. S.; BUSH, K. M.; FREEMAN, B. A. Peroxynitrite Oxidation of Sulfhydryls. The Cytotoxic Potential of Superoxide and Nitric Oxide. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 7, p. 4244–4250, 5 mar. 1991.

REINHARDT, C.; VON, B.; MANUKYAN, D.; GRAHL, L.; LORENZ, M.; ALTMANN, B.; DLUGAI, S.; HESS, S.; KONRAD, I.; ORSCHIEDT, L.; MACKMAN, N.; RUDDOCK, L.; MASSBERG, S.; ENGELMANN, B. Protein

disulfide isomerase acts as an injury response signal that enhances fibrin generation via tissue factor activation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 3, p. 1110–1122, 2008.

REISZ, J. A.; BECHTOLD, E.; KING, S. B.; POOLE, L. B.; FURDUI, C. M. Thiol-Blocking Electrophiles Interfere with Labeling and Detection of Protein Sulfenic Acids. **The FEBS journal**, v. 280, n. 23, p. 6150–6161, dez. 2013.

Referências

RHEE, S. G.; WOO, H. A.; KIL, I. S.; BAE, S. H. Peroxiredoxin Functions as a Peroxidase and a Regulator and Sensor of Local Peroxides. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 7, p. 4403–4410, 10 fev. 2012.

RIENER, C. K.; KADA, G.; GRUBER, H. J. Quick Measurement of Protein Sulfhydryls with Ellman's Reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 373, n. 4–5, p. 266–276, jul. 2002.

RUDDOCK, L. W. Low-Molecular-Weight Oxidants Involved in Disulfide Bond Formation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 16, n. 10, p. 1129–1138, 15 maio 2012.

SAARANEN, M. J.; KARALA, A.-R.; LAPPI, A.-K.; RUDDOCK, L. W. The Role of Dehydroascorbate in Disulfide Bond Formation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 12, n. 1, p. 15–25, jan. 2010.

SANTOS, C. X.; BONINI, M. G.; AUGUSTO, O. Role of the Carbonate Radical Anion in Tyrosine Nitration and Hydroxylation by Peroxynitrite. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 377, n. 1, p. 146–152, 1 maio 2000.

SANTOS, C. X. C.; TANAKA, L. Y.; WOSNIAK, J.; LAURINDO, F. R. M. Mechanisms and Implications of Reactive Oxygen Species Generation during the Unfolded Protein Response: Roles of Endoplasmic Reticulum Oxidoreductases, Mitochondrial Electron Transport, and NADPH Oxidase. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 10, p. 2409–2427, out. 2009.

SEVIER, C. S.; KAISER, C. A. Formation and Transfer of Disulphide Bonds in Living Cells. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 3, n. 11, p. 836–847, nov. 2002.

SOARES MORETTI, A. I.; MARTINS LAURINDO, F. R. Protein disulfide isomerases: Redox connections in and out of the endoplasmic reticulum. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, The Chemistry of Redox Signaling. v. 617, p. 106–119, 1 mar. 2017.

STADTMAN, E. R. Protein Oxidation in Aging and Age-Related Diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 928, p. 22–38, abr. 2001.

SWIATKOWSKA, M.; SZYMAŃSKI, J.; PADULA, G.; CIERNIEWSKI, C. S. Interaction and Functional Association of Protein Disulfide Isomerase with $\alpha V\beta 3$ Integrin on Endothelial Cells. **FEBS Journal**, v. 275, n. 8, p. 1813–1823, 1 abr. 2008.

SZABÓ, C.; ISCHIROPOULOS, H.; RADI, R. Peroxynitrite: Biochemistry, Pathophysiology and Development of Therapeutics. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 6, n. 8, p. 662–680, ago. 2007.

TANAKA, L. Y.; ARAÚJO, H. A.; HIRONAKA, G. K.; ARAUJO, T. L. S.; TAKIMURA, C. K.; RODRIGUEZ, A. I.; CASAGRANDE, A. S.; GUTIERREZ, P. S.; LEMOS-NETO, P. A.; LAURINDO, F. R. M. Peri/Epicellular Protein Disulfide Isomerase Sustains Vascular Lumen Caliber Through an Anticonstrictive Remodeling Effect. **Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)**, v. 67, n. 3, p. 613–622, mar. 2016.

- TAVENDER, T. J.; SHEPPARD, A. M.; BULLEID, N. J. Peroxiredoxin IV Is an Endoplasmic Reticulum-Localized Enzyme Forming Oligomeric Complexes in Human Cells. **The Biochemical Journal**, v. 411, n. 1, p. 191–199, 1 abr. 2008.
- TOLEDO, J. C., Jr; AUGUSTO, O. Connecting the Chemical and Biological Properties of Nitric Oxide. **Chemical research in toxicology**, v. 25, n. 5, p. 975–989, 21 maio 2012. *Referências*
- TOWNSEND, D. M.; MANEVICH, Y.; HE, L.; XIONG, Y.; BOWERS, R. R.; HUTCHENS, S.; TEW, K. D. Nitrosative Stress-Induced S-Glutathionylation of Protein Disulfide Isomerase Leads to Activation of the Unfolded Protein Response. **Cancer Research**, v. 69, n. 19, p. 7626–7634, 1 out. 2009.
- TRUJILLO, M.; BUDDE, H.; PIÑEYRO, M. D.; STEHR, M.; ROBELLO, C.; FLOHÉ, L.; RADI, R. Trypanosoma Brucei and Trypanosoma Cruzi Tryparedoxin Peroxidases Catalytically Detoxify Peroxynitrite via Oxidation of Fast Reacting Thiols. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 33, p. 34175–34182, 13 ago. 2004.
- UEHARA, T.; NAKAMURA, T.; YAO, D.; SHI, Z.-Q.; GU, Z.; MA, Y.; MASLIAH, E.; NOMURA, Y.; LIPTON, S. A. S-Nitrosylated Protein-Disulphide Isomerase Links Protein Misfolding to Neurodegeneration. **Nature**, v. 441, n. 7092, p. 513–517, 25 maio 2006.
- UPPU, R. M.; PRYOR, W. A. Synthesis of Peroxynitrite in a Two-Phase System Using Isoamyl Nitrite and Hydrogen Peroxide. **Analytical Biochemistry**, v. 236, n. 2, p. 242–249, 1 maio 1996.
- VATTEMI, G.; MECHREF, Y.; MARINI, M.; TONIN, P.; MINUZ, P.; GRIGOLI, L.; GUGLIELMI, V.; KLOUCKOVA, I.; CHIAMULERA, C.; MENEGUZZI, A.; DI CHIO, M.; TEDESCO, V.; LOVATO, L.; DEGAN, M.; ARCARO, G.; LECHI, A.; NOVOTNY, M. V.; TOMELLERI, G. Increased Protein Nitration in Mitochondrial Diseases: Evidence for Vessel Wall Involvement. **Molecular & cellular proteomics: MCP**, v. 10, n. 4, p. M110.002964, abr. 2011.
- WALKER, A. K.; FARG, M. A.; BYE, C. R.; MCLEAN, C. A.; HORNE, M. K.; ATKIN, J. D. Protein Disulphide Isomerase Protects against Protein Aggregation and Is S-Nitrosylated in Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Brain: a journal of neurology**, v. 133, n. Pt 1, p. 105–116, jan. 2010.
- WANG, C.; YU, J.; HUO, L.; WANG, L.; FENG, W.; WANG, C. Human Protein-Disulfide Isomerase Is a Redox-Regulated Chaperone Activated by Oxidation of Domain A'. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 2, p. 1139–1149, 6 jan. 2012.
- WATANABE, M. M.; LAURINDO, F. R. M.; FERNANDES, D. C. Methods of measuring protein disulfide isomerase activity: a critical overview. **Frontiers in Chemistry**, v. 2, n. 73, p. 1–6, 3 set. 2014.
- WILKINSON, B.; GILBERT, H. F. Protein Disulfide Isomerase. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1699, n. 1–2, p. 35–44, 1 jun. 2004.
- WINTERBOURN, C. C. Reconciling the Chemistry and Biology of Reactive Oxygen Species. **Nature chemical biology**, v. 4, n. 5, p. 278–286, maio 2008.
- WINTERBOURN, C. C.; HAMPTON, M. B. Thiol Chemistry and Specificity in Redox Signaling. **Free radical biology & medicine**, v. 45, n. 5, p. 549–561, 1 set. 2008.
- XIE, Z.; DONG, Y.; ZHANG, M.; CUI, M.-Z.; COHEN, R. A.; RIEK, U.; NEUMANN, D.; SCHLATTNER, U.; ZOU, M.-H. Activation of Protein Kinase C Zeta by Peroxynitrite Regulates LKB1-Dependent AMP-Activated Protein Kinase in Cultured Endothelial Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 10, p. 6366–6375, 10 mar. 2006.

ZITO, E.; MELO, E. P.; YANG, Y.; WAHLANDER, Å.; NEUBERT, T. A.; RON, D. Oxidative Protein Folding by an Endoplasmic Reticulum-Localized Peroxiredoxin. **Molecular Cell**, v. 40, n. 5, p. 787–797, 10 dez. 2010.

APÊNDICES

Apêndice A – Simulação cinética da reação entre PDI e peroxinitrito em condições fisiológicas

Figura A1. Simulação cinética da reação entre PDI e peroxinitrito na ausência e presença de CO₂. A simulação cinética foi realizada com o software Gepasi (<http://www.gepasi.org>) usando as equações mostradas no texto (Equações 2-4). A concentração de tióis foi considerada como o total de tióis detectáveis da PDI (5,02 tióis/proteína), mas apenas os tióis reativos da PDI reagem rapidamente com peroxinitrito. (A) Simulação cinética da reação entre PDI (500 μM) e peroxinitrito (20 μM). Nessas condições, a simulação prevê que 99% de peroxinitrito (linha preta) reagirão com os motivos redox ativos da PDI, gerando 19,8 μM de dissulfetos (linha azul). Os 1% restantes de peroxinitrito decairão para nitrato e radicais, gerando um rendimento total de 0,12 μM de radicais (0,06 μM de cada, radical hidroxila e dióxido de nitrogênio), que são pouco visíveis (linha verde). (B) Simulação cinética da reação entre PDI (500 μM) e peroxinitrito (20 μM) na presença de 1,3 mM de CO₂. Nessas condições, a simulação prevê que 50,25% de peroxinitrito reagirão com os motivos redox ativos da PDI, gerando 10,05 μM de dissulfetos (linha azul). 49,25% de peroxinitrito reagirão com CO₂ gerando 6,90 μM de radicais (3,45 μM de cada, ânion radical carbonato e radical dióxido de nitrogênio) (linha rosa). Os 0,5% restantes de peroxinitrito decairão para nitrato e radicais, gerando um rendimento total de 0,06 μM de radicais (0,03 μM de cada radical hidroxila e dióxido de nitrogênio), que são pouco visíveis (linha verde).

Apêndice B – Espectros de MS e MS/MS dos produtos de oxidação da PDI promovidos por excesso de peroxinitrito.

Figura B1. Análise por Nano-ESI-Q-TOF-MS/MS do peptídeo correspondente ao peptídeo do motivo redox ativo a da PDI obtidos a partir de digestões trípticas de PDI reduzida (10 μM) tratada com peroxinitrito (200 μM). O sequenciamento do pico com m/z de 624,6102 foi realizado por MS/MS e corresponde ao peptídeo ⁴³YLLVEFYAPWCGHCK⁵⁷ - 2H nitrado (Y⁴³ + 45 Da) (massa monoisotópica 1870,8171 Da) com três cargas referente ao motivo redox ativo a da PDI. Os insetos acima exibem os espectros de MS do peptídeo com três cargas (lado direito) e os fragmentos dos peptídeos com as séries y e b (lado direito) identificados no MS/MS (em vermelho). As amostras de PDI reduzida foram incubadas com peroxinitrito, em excesso, em seguida, alquiladas, digeridas com tripsina e submetidas à análise por ESI-Q-TOF-MS/MS como descrito nos procedimentos experimentais.

Figura B2. Análise por Nano-ESI-Q-TOF-MS/MS do peptídeo correspondente ao peptídeo do motivo redox ativo a da PDI obtidos a partir de digestões tríplicas de PDI reduzida (10 μM) tratada com peroxinitrito (200 μM). O sequenciamento do pico com m/z de 624,6083 foi realizado por MS/MS e corresponde ao peptídeo ⁴³YLLVEFYAPWCGHCK⁵⁷ - 2H nitrado (Y⁴⁹ + 45 Da) (massa monoisotópica 1870,8171 Da) com três cargas referente ao motivo redox ativo a da PDI. Os insetos acima exibem os espectros de MS do peptídeo com três cargas (lado direito) e os fragmentos dos peptídeos com as séries y e b (lado direito) identificados no MS/MS (em vermelho). As amostras de PDI reduzida foram incubadas com peroxinitrito, em excesso, em seguida, alquiladas, digeridas com tripsina e submetidas à análise por ESI-Q-TOF-MS/MS como descrito nos procedimentos experimentais.

Figura B3. Análise por Nano-ESI-Q-TOF-MSMS do peptídeo correspondente ao peptídeo do motivo redox ativo a da PDI obtidos a partir de digestões tripticas de PDI reduzida (10 μ M) tratada com peroxinitrito (200 μ M). O sequenciamento do pico com m/z de 614,9465 foi realizado por MS/MS e corresponde ao peptídeo 43 YLLVEFYAPWCGHCK 57 - 2H hidroxilado ($W^{52} + 16$ Da) (massa monoisotópica 1841,8269 Da) com três cargas referente ao motivo redox ativo a da PDI. Os insetos acima exibem os espectros de MS do peptídeo com três cargas (lado direito) e os fragmentos dos peptídeos com as séries y e b (lado direito) identificados no MS/MS (em vermelho). As amostras de PDI reduzida foram incubadas com peroxinitrito, em excesso, em seguida, alquiladas, digeridas com tripsina e submetidas à análise por ESI-Q-TOF-MSMS como descrito nos procedimentos experimentais.

Figura B4. Análise por Nano-ESI-Q-TOF-MSMS do peptídeo correspondente ao peptídeo do motivo redox ativo a da PDI obtidos a partir de digestões tripticas de PDI reduzida (10 μM) tratada com peroxinitrito (200 μM). O sequenciamento do pico com m/z de 624,6091 foi realizado por MS/MS e corresponde ao peptídeo ⁴³YLLVEFYAPWCGHCK⁵⁷- 2H nitrado (W⁵² + 45 Da) (massa monoisotópica 1870,8171 Da) com três cargas referente ao motivo redox ativo a da PDI. Os insetos acima exibem os espectros de MS do peptídeo com três cargas (lado direito) e os fragmentos dos peptídeos com as séries y e b (lado direito) identificados no MS/MS (em vermelho). As amostras de PDI reduzida foram incubadas com peroxinitrito, em excesso, em seguida, alquiladas, digeridas com tripsina e submetidas à análise por ESI-Q-TOF-MSMS como descrito nos procedimentos experimentais.

Figura B5. Análise por Nano-ESI-Q-TOF-MSMS do peptídeo correspondente ao resíduo 58 – 65 da PDI obtidos a partir de digestões tripticas de PDI reduzida (10 μM) tratada com peroxinitrito (200 μM). O sequenciamento do pico com m/z de 454.2268 foi realizado por MS/MS e corresponde ao peptídeo $^{58}\text{ALAPEYAK}^{65}$ nitrado ($\text{Y}^{63} + 45 \text{ Da}$) (massa monoisotópica 906,4447 Da) com duas cargas referente ao resíduo 58 – 65 localizado no domínio a da PDI. Os insetos acima exibem os espectros de MS do peptídeo com duas cargas (lado direito) e os fragmentos dos peptídeos com as séries y e b (lado direito) identificados no MS/MS (em vermelho). As amostras de PDI reduzida foram incubadas com peroxinitrito, em excesso, em seguida, alquiladas, digeridas com tripsina e submetidas à análise por ESI-Q-TOF-MSMS como descrito nos procedimentos experimentais.

Figura B6. Análise por Nano-ESI-Q-TOF-MSMS do peptídeo correspondente ao resíduo 82 – 97 da PDI obtidos a partir de digestões tripticas de PDI reduzida (10 μM) tratada com peroxinitrito (200 μM). O sequenciamento do pico com m/z de 609,2753 foi realizado por MS/MS e corresponde ao peptídeo $^{82}VDATEESDLAQQYGVR^{97}$ nitrado ($Y^{94} + 45$ Da) (massa monoisotópica 1824,8126 Da) com três cargas referente ao resíduo 82 – 97 localizado no domínio a da PDI. Os insetos acima exibem os espectros de MS do peptídeo com três cargas (lado direito) e os fragmentos dos peptídeos com as séries y e b (lado direito) identificados no MS/MS (em vermelho). As amostras de PDI reduzida foram incubadas com peroxinitrito, em excesso, em seguida, alquiladas, digeridas com tripsina e submetidas à análise por ESI-Q-TOF-MSMS como descrito nos procedimentos experimentais.

Figura B7. Análise por Nano-ESI-Q-TOF-MSMS do peptídeo correspondente ao resíduo 121 – 130 da PDI obtidos a partir de digestões tripticas de PDI reduzida (10 μ M) tratada com peroxinitrito (200 μ M). O sequenciamento do pico com m/z de 624,2952 foi realizado por MS/MS e corresponde ao peptídeo ¹²¹EADDIVNWLK¹³⁰ nitrado ($W^{128} + 45$ Da) (massa monoisotópica 1246,5830 Da) com duas cargas referente ao resíduo 121 – 130 localizado no domínio a da PDI. Os insetos acima exibem os espectros de MS do peptídeo com duas cargas (lado direito) e os fragmentos dos peptídeos com as séries y e b (lado direito) identificados no MS/MS (em vermelho). As amostras de PDI reduzida foram incubadas com peroxinitrito, em excesso, em seguida, alquiladas, digeridas com tripsina e submetidas à análise por ESI-Q-TOF-MSMS como descrito nos procedimentos experimentais.

Figura B8. Análise por Nano-ESI-Q-TOF-MSMS do peptídeo correspondente ao resíduo 196 – 207 da PDI obtidos a partir de digestões tripticas de PDI reduzida (10 μM) tratada com peroxinitrito (200 μM). O sequenciamento do pico com m/z de 490,5897 foi realizado por MS/MS e corresponde ao peptídeo ¹⁹⁶YQLDKDGVVLFK²⁰⁷ nitrado (Y¹⁹⁶ + 45 Da) (massa monoisotópica 1468,7562 Da) com três cargas referente ao resíduo 196 – 207 localizado no domínio b da PDI. Os insetos acima exibem os espectros de MS do peptídeo com três cargas (lado direito) e os fragmentos dos peptídeos com as séries y e b (lado direito) identificados no MS/MS (em vermelho). As amostras de PDI reduzida foram incubadas com peroxinitrito, em excesso, em seguida, alquiladas, digeridas com tripsina e submetidas à análise por ESI-Q-TOF-MSMS como descrito nos procedimentos experimentais.

Figura B9. Análise por Nano-ESI-Q-TOF-MSMS do peptídeo correspondente ao resíduo 327 – 338 da PDI obtidos a partir de digestões tripticas de PDI reduzida (10 μM) tratada com peroxinitrito (200 μM). O sequenciamento do pico com m/z de 499,5638 foi realizado por MS/MS e corresponde ao peptídeo ³²⁷YKPESEELTAER³³⁸ nitrado (Y³²⁷ + 45 Da) (massa monoisotópica 1495,6790 Da) com três cargas referente ao resíduo 327 – 338 localizado no domínio b' da PDI. Os insetos acima exibem os espectros de MS do peptídeo com três cargas (lado direito) e os fragmentos dos peptídeos com as séries y e b (lado direito) identificados no MS/MS (em vermelho). As amostras de PDI reduzida foram incubadas com peroxinitrito, em excesso, em seguida, alquiladas, digeridas com tripsina e submetidas à análise por ESI-Q-TOF-MSMS como descrito nos procedimentos experimentais.

Figura B10. Análise por Nano-ESI-Q-TOF-MS/MS do peptídeo correspondente ao peptídeo do motivo redox ativo a' da PDI obtidos a partir de digestões tripticas de PDI reduzida (10 μ M) tratada com peroxinitrito (200 μ M). O sequenciamento do pico com m/z de 614,9267 foi realizado por MS/MS e corresponde ao peptídeo 387 NVFVEFYAPWCGHCK 401 - 2H nitrado ($Y^{393} + 45$ Da) (massa monoisotópica 1841,7654 Da) com três cargas referente ao motivo redox ativo a' da PDI. Os insetos acima exibem os espectros de MS do peptídeo com três cargas (lado direito) e os fragmentos dos peptídeos com as séries y e b (lado direito) identificados no MS/MS (em vermelho). As amostras de PDI reduzida foram incubadas com peroxinitrito, em excesso, em seguida, alquiladas, digeridas com tripsina e submetidas à análise por ESI-Q-TOF-MS/MS como descrito nos procedimentos experimentais.

Figura B11. Análise por Nano-ESI-Q-TOF-MS/MS do peptídeo correspondente ao peptídeo do motivo redox ativo a' da PDI obtidos a partir de digestões trípticas de PDI reduzida (10 μ M) tratada com peroxinitrito (200 μ M). O sequenciamento do pico com m/z de 605,2646 foi realizado por MS/MS e corresponde ao peptídeo ³⁸⁷NVFVEFYAPWC⁴⁰¹- 2H hidroxilado (W³⁹⁶ + 16 Da) (massa monoisotópica 1812,7753 Da) com três cargas referente ao motivo redox ativo a' da PDI. Os insetos acima exibem os espectros de MS do peptídeo com três cargas (lado direito) e os fragmentos dos peptídeos com as séries y e b (lado direito) identificados no MS/MS (em vermelho). As amostras de PDI reduzida foram incubadas com peroxinitrito, em excesso, em seguida, alquiladas, digeridas com tripsina e submetidas à análise por ESI-Q-TOF-MS/MS como descrito nos procedimentos experimentais.

Figura B12. Análise por Nano-ESI-Q-TOF-MS/MS do peptídeo correspondente ao peptídeo do motivo redox ativo a' da PDI obtidos a partir de digestões trípticas de PDI reduzida (10 μ M) tratada com peroxinitrito (200 μ M). O sequenciamento do pico com m/z de 614,9271 foi realizado por MS/MS e corresponde ao peptídeo $^{387}NVFVEFYAPWCGHCK^{401}$ - 2H nitrado ($W^{396} + 45$ Da) (massa monoisotópica 1841,7654 Da) com três cargas referente ao motivo redox ativo a' da PDI. Os insetos acima exibem os espectros de MS do peptídeo com três cargas (lado direito) e os fragmentos dos peptídeos com as séries y e b (lado direito) identificados no MS/MS (em vermelho). As amostras de PDI reduzida foram incubadas com peroxinitrito, em excesso, em seguida, alquiladas, digeridas com tripsina e submetidas à análise por ESI-Q-TOF-MS/MS como descrito nos procedimentos experimentais.

Figura B13. Análise por Nano-ESI-Q-TOF-MSMS do peptídeo correspondente ao resíduo 402 – 409 da PDI obtidos a partir de digestões tripticas de PDI reduzida (10 µM) tratada com peroxinitrito (200 µM). O sequenciamento do pico com m/z de 508,2596 foi realizado por MS/MS e corresponde ao peptídeo ⁴⁰²QLAPIWDK⁴⁰⁹ nitrado (W⁴⁰⁷ + 45 Da) (massa monoisotópica 1014,5134 Da) com duas cargas referente ao resíduo 402 – 409 localizado no domínio a' da PDI. Os insetos acima exibem os espectros de MS do peptídeo com duas cargas (lado direito) e os fragmentos dos peptídeos com as séries y e b (lado direito) identificados no MS/MS (em vermelho). As amostras de PDI reduzida foram incubadas com peroxinitrito, em excesso, em seguida, alquiladas, digeridas com tripsina e submetidas à análise por ESI-Q-TOF-MSMS como descrito nos procedimentos experimentais.

Figura B14. Análise por Nano-ESI-Q-TOF-MSMS do peptídeo correspondente ao resíduo 453 – 461 da PDI obtidos a partir de digestões tripticas de PDI reduzida (10 μ M) tratada com peroxinitrito (200 μ M). O sequenciamento do pico com m/z de 556,2491 foi realizado por MS/MS e corresponde ao peptídeo $^{453}\text{TVIDYNGER}^{461}$ nitrado ($W^{457} + 45$ Da) (massa monoisotópica 1110,4942 Da) com duas cargas referente ao resíduo 453 – 461 localizado no domínio a' da PDI. Os insetos acima exibem os espectros de MS do peptídeo com duas cargas (lado direito) e os fragmentos dos peptídeos com as séries y e b (lado direito) identificados no MS/MS (em vermelho). As amostras de PDI reduzida foram incubadas com peroxinitrito, em excesso, em seguida, alquiladas, digeridas com tripsina e submetidas à análise por ESI-Q-TOF-MSMS como descrito nos procedimentos experimentais.