Universidade de São Paulo
Instituto de Química

**EFEITOS DO TEMPOL SOBRE A INTERAÇÃO ENTRE
PEROXINITRITO/CO₂ COM ALBUMINA E MACRÓFAGOS**

Inibição da nitração de tirosinas e da oxidação de cisteínas e
amplificação da nitrosação de cisteínas.

Denise de Castro Fernandes
Dissertação de Mestrado

Orientadora: Prof. Dra. Ohara Augusto

2004

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Fernandes, Denise de Castro
F363e Efeitos do tempol sobre a interação entre peroxinitrito/CO₂
com albumina e macrófagos : inibição da nitração de tirosinas
e da oxidação de cisteínas e amplificação da nitrosação de
cisteínas / Denise de Castro Fernandes. -- São Paulo, 2004.
48p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Augusto, Ohara

I. Radical livre : Bioquímica 2. Albumina : Bioquímica
I. T. II. Augusto, Ohara, orientador.

574.192 CDD

*“Efeitos do tempol sobre a interação entre
peroxinitrito/CO₂ com albumina e macrófagos.
Inibição da nitração de tirosina e da oxidação de cisteínas e
amplificação da nitrosação de cisteínas”*

DENISE DE CASTRO FERNANDES

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à
obtenção do grau de Mestre em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovada por:

Proa. Dra. OHARA AUGUSTO
IQ – USP
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dra. DULCINÉIA SAES PARRA ABDALLA
FCF - USP

Prof. Dr. LUIS EDUARDO SOARES NETTO
IB - USP

SÃO PAULO
19 DE FEVEREIRO DE 2004.

Aqui inicio meus agradecimentos...

*Graças a Deus, que me conduziu em todos os momentos, especialmente nos mais difíceis,
concluiu mais uma etapa de minha vida, com bravura e orgulho*

*Reitero e admiro a sabedoria de minha orientadora e agradeço a oportunidade de trabalho,
bem como as lições de inestimável valor, que me fizeram desenvolver científica e pessoalmente*

Aos meus pais, Alaide e Artur, pela confiança, apoio irrestrito e amor desde sempre

Do carinho que recebi em muitos momentos, Rodrigo, o seu foi especial e fundamental

*E não esquecerei de agradecer meus irmãos, Vitinho e Ricardo
pelas caronas, muitas risadas e companheirismo*

Colegas e amigos de laboratório,

*Marcelo, Berê, Celinho, Daniel, Angélica, Henrique, Edlaine, Lia, Sandra, Eduardo, obrigada pela
companhia nos cafés, almoços, pelas conversas divertidas, discussões proveitosas e exemplos de
vida*

*Início do desenvolvimento deste trabalho, Danilo,
e col.aboração na finalização do mesmo, Andréa;
a ambos, meus sinceros agradecimentos*

Muito obrigada aos professores e colegas de outros laboratórios

Prof. Hugo Armelin, Paula, Érico, Ivan, Alê, Maria,

Prof. Luis Netto, Camila, Dani, Zé Renato, Bruno, Simone, Gisele

Profª. Dulcinéia, Edimar, Kátia, Isabela,

Profª. Suely Lopes, Rita, Michelle, Cris, Sandra,

obrigada pela atenção, prontidão em ajudar, reagentes e muitas dicas

Em especial agradeço aos velhos e novos amigos deste Instituto,

Silvia, Remo, André, Rodrigo (Peta), Ricardo, Sheila, pelos bons conselhos e ótimo astral.

*Nesta estrada há muitos anos estão comigo amigas muito especiais, Aninha, Cris e Marcinha
que com conversas francas, confiança e muita alegria sempre me apoiaram
e sem a menor dúvida, contribuíram para que eu chegasse até aqui*

Ternura algumas vezes se resume num olhar, sem necessidade de palavras!...

Obrigada ao sexto elemento da família!

*O trabalho está completo graças ao apoio dos funcionários do Instituto de Química
bem como dos funcionários da Biblioteca, obrigada a todos vocês!*

*Sentimento de missão cumprida, agradeço aos que porventura esqueci
e desejo muita boa sorte aos que iniciam esta jornada científica!*

Aos meus pais, Artur e Alaide
e meus irmãos, Vitor e Ricardo,
pelo apoio e carinho.

Ao Rodrigo, pela amorosa presença.

Índice

ABREVIATURAS	viii
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Óxido nítrico e oxidantes dele derivados	1
1.2 Formação de peroxinitrito em sistemas biológicos	2
1.3 Reações do peroxinitrito com biomoléculas	4
1.4 Redirecionamento da reatividade do peroxinitrito pelo tempol	6
1.5 Nitrosação em sistemas biológicos	7
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1 Materiais	12
3.2 Métodos	13
Preparação da albumina e tratamento com peroxinitrito	13
Quantificação de tióis oxidados	13
Quantificação de nitrotirosina	13
Quantificação de nitrosotiol (Método Saville)	14
EPR e captação de spin	14
Cultivo de macrófagos J774 e tratamento com peroxinitrito	14
Quantificação de nitrosotiol pelo analisador de óxido nítrico	15
Quantificação de nitrotirosina por imunoblotting	16
Imunocitoquímica	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1 Efeitos do tempol sobre a interação da BSA com peroxinitrito/CO ₂	18
4.1.1 Produtos estáveis da BSA	18
4.1.2 Produtos radiculares da BSA	23
4.1.3 Consumo do tempol	27
4.1.4 Conclusão parcial	27

4.2 Efeitos do tempo sobre a interação de macrófagos em cultura com peroxinitrito/ CO ₂	30
4.2.1 Produtos estáveis das proteínas de macrófagos.....	30
4.2.2 Conclusão parcial.....	32
5. CONCLUSÃO GERAL.....	38
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
CURRICULUM VITAE.....	47

Abreviaturas

BSA	albumina sérica bovina
dBSA	albumina sérica bovina desnaturada
DBNBS	3,5-dibromo-4-nitrosobenzeno sulfonato
DME	Dulbecco's modified eagle's medium
DMPO	5,5-dimetilpirrolina-N-óxido
DTNB	5,5'-ditio-bis (ácido 2-nitrobenzóico)
DTPA	N,N,N',N''-penta-acetato-dietileno-triamina
EPR	ressonância paramagnética eletrônica
INF-γ	interferon gama
iNOs	óxido nítrico sintase indutível
LPS	Lipopolissacarídeo
NEM	N-eltimaleimida
NP-40	etil-fenil-polietileno glicol (detergente não iônico)
PBN	α -fenil-N- <i>tér</i> cio butil nitrona
PBS	salina tamponada com fosfato
PBSmod	PBS modificado
Peroxinitrito	soma das formas de ácido peroxinitroso (ONOOH) e ânion peroxinitrito (ONOO ⁻)
PMA	12-miristato 13-acetato de forbol
SDS	dodecil-sulfato de sódio
SOD	superóxido dismutase
TBS	salina tamponada com TRIS
Tempol	4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxila
TRIS	tris [hidroxi-metil]amino-metano

¹ Nomes recomendados pela IUPAC: oxoperoxinitrato (-1) (ONOO⁻); hidrogênio oxiperoxinitrato (ONOOH).

Lista de Figuras e Tabelas

Fig. 1		03
Fig. 2		05
Fig. 3		08
Fig. 4		20
Fig. 5		24
Fig. 6		25
Fig. 7		26
Fig. 8		28
Fig. 9		31
Fig. 10		33
Fig. 11		34
Fig. 12		35
Tab. 1		20

Resumo

O tempol (TP) tem se mostrado um eficiente protetor em modelos inflamatórios. Os mecanismo de proteção contra espécies reativas de oxigênio foi bastante estudado mas sua interação com espécies reativas de nitrogênio ainda permanece pouco explorada. Recentemente, propusemos que o TP re-direciona a nitração de fenol mediada por peroxinitrito (PN)/CO₂ para nitrosação, pela sua reação com o radical CO₃^{•-}. O produto desta reação, o cátion oxamônio, oxidaria PN para O₂ e [•]NO. Este último produziria uma espécie nitrosante (N₂O₃) pela reação com o radical derivado do PN, [•]NO₂ [Bonini e col. (2002) *Chem. Res. Tox.* **15**: 506]. Para examinar se este mecanismo poderia operar *in vivo*, estudamos os efeitos do TP na reatividade do PN/CO₂ frente a albumina (BSA) e macrófagos. Os efeitos do TP se apresentaram dependentes de sua concentração e da concentração de Cys. Apesar do TP não se mostrar catalítico, ele inibiu a oxidação de Cys (20-50%) e nitração de Tyr (70-90%) da BSA e aumentou a nitrosação de Cys (200-400%). No caso dos macrófagos tratados com PN/CO₂, o tempol também inibiu a nitração (90%) e aumentou a nitrosação (300%). Assim, em condições fisiológicas, concentrações sub-estequiométricas de TP seriam capazes de redirecionar a reatividade dos radicais derivados PN, de oxidação de Cys proteica e nitração de Tyr para nitrosação de Cys. Desta forma, o TP poderia inibir a injúria em inflamações.

Abstract

Tempol has been shown to protect animals from oxidative stress conditions. Tempol's protective mechanisms against reactive oxygen species have been extensively studied but its interactions with reactive nitrogen species remain little explored. Recently, we proposed that tempol diverts peroxynitrite/CO₂ mediated phenol nitration to nitrosation by reacting with CO₃^{•-} to produce tempol oxammonium cation that oxidizes peroxynitrite to O₂ and •NO. The latter produces a nitrosating species by reacting with peroxynitrite-derived •NO₂ [Bonini *et al.* (2002) *Chem. Res. Toxicol.* **15**: 506]. To examine whether this mechanism operates in biological environments, we studied the effects of tempol on peroxynitrite/CO₂ reactivity towards a protein, BSA, and cells, macrophages. Tempol's effects were dependent on its own and BSA-cys concentration. Although not a true catalyst, it inhibited BSA-cys oxidation (20-50%) and BSA-tyr nitration (70-90%) while increasing BSA-cys nitrosation (200-400%). In the case of macrophages treated with peroxynitrite/CO₂, tempol also inhibited protein-tyr nitration (90%) and increased protein-cys nitrosation (300%). Then, under physiological conditions, a substoichiometric amount of tempol is able to divert peroxynitrite-derived radicals reactivity from protein-cys oxidation and protein-tyr nitration to protein-cys nitrosation. This may be the mechanism by which tempol inhibits injury in inflammatory conditions.

1. Introdução

1.1 Óxido nítrico e oxidantes dele derivados

Com a caracterização por McCord e Fridovich no final da década de 60 de uma enzima específica que dismutava o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) a enzima superóxido dismutase (SOD) [para revisão, ver McCord e col., 1971], tornou-se evidente que sistemas biológicos produzem radicais livres durante seu metabolismo normal. Durante muito tempo, associou-se a geração de espécies reativas de oxigênio (radicais livres e oxidantes) à injúria celular e tissular. Apenas no início da década de 90, com a descoberta da síntese do radical livre óxido nítrico ($^{\bullet}NO$) por células de mamíferos [Ignarro, 1990; Moncada e col., 1991], esse paradigma foi modificado. Atualmente está bem estabelecido que espécies reativas de oxigênio e nitrogênio participam também da homeostase celular [Finkel e Holbrook, 2000; Klatt e Lamas, 2000].

O radical livre $^{\bullet}NO$ é formado a partir de L-arginina em células de mamíferos pela enzima $^{\bullet}NO$ sintase, que se apresenta em três isoformas, endotelial, neuronal e indutível. O $^{\bullet}NO$ difunde-se livremente pelas membranas celulares devido ao seu caráter hidrofóbico, tamanho e neutralidade [Subczynski e col., 1996]. O $^{\bullet}NO$ é um radical livre pouco reativo mas, como todo radical livre, reage rapidamente com espécies paramagnéticas, como O_2 , $O_2^{\bullet-}$ e metais de transição (eq. 1-2).

Na maioria dos ambientes biológicos, como a concentração estacionária de $^{\bullet}NO$ é estimada ser da ordem de nM e sua reação com O_2 depende em segunda ordem da concentração de $^{\bullet}NO$ (eq. 1), essa reação deve ser secundária. A formação de peroxinitrito (eq. 2) apresenta constante de velocidade da ordem do limite de difusão, portanto, depende do encontro das duas espécies radicalares, $^{\bullet}NO$ e $O_2^{\bullet-}$ e dar-se-á quando a concentração de $^{\bullet}NO$

for suficientemente alta para competir com a SOD pelo ânion radical $O_2^{\bullet-}$. Já a reação de $^{\bullet}NO$ com metais, especialmente grupos heme ou centros ferro-enxofre, depende da natureza dos mesmos, apresentando constantes de associação entre $10^3 - 10^7 M^{-1} s^{-1}$ [Sharma e col., 1987]. Em suma, estas reações (relativas entre si) ocorrerão em sistemas biológicos dependendo da concentração de $^{\bullet}NO$, $O_2^{\bullet-}$, SOD e grupos heme.

1.2 Formação do peroxinitrito em sistemas biológicos

A formação de peroxinitrito em sistemas biológicos depende do encontro dos radicais $^{\bullet}NO$ com $O_2^{\bullet-}$ (eq. 2) (Figura 1). O ânion radical $O_2^{\bullet-}$ é produzido continuamente durante o vazamento de elétrons na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, principalmente no Complexo I (NADPH ubiquinona oxidorreductase) e Complexo III (Ubiquinol-citocromo c oxidorreductase) [Boveris e Cadenas, 1982]. Cerca de 0,1 % a 0,01 % do oxigênio consumido forma $O_2^{\bullet-}$ ao invés de ser reduzido à H_2O [Kowaltowski, A. J., comunicação]. Esse fluxo de produção de $O_2^{\bullet-}$ nas células pode ser aumentado por falhas no fluxo normal de elétrons na cadeia respiratória, variações nas tensões de oxigênio e ativação de alguma enzima produtora do ânion radical superóxido. Este é o caso da enzima NADPH oxidase, que é montada durante o *burst* respiratório em fagócitos e macrófagos e passa a produzir $O_2^{\bullet-}$ em concentrações estacionárias da ordem de μM . Por exemplo, em neutrófilos estimulados com acetato de forbol-miristato (PMA), a concentração de estado estacionária estimada de $O_2^{\bullet-}$ foi de $3 \mu M$ [Britigan e col., 1986, Suzaki e col., 1994]. O ânion radical $O_2^{\bullet-}$ reage rapidamente com outros radicais livres (como o $^{\bullet}NO$), e centros ferro-enxofre. A sua reatividade depende do solvente e do pH, principalmente em ambientes aquosos. O pKa da protonação do ânion radical $O_2^{\bullet-}$ é 4,8. Apesar de em pH fisiológicos a proporção de $O_2^{\bullet-}$ ser cerca de 500 vezes maior que a forma protonada, o $HO_2^{\bullet}$ é mais reativo por não apresentar carga, o que facilita a passagem por membranas, ao contrário do ânion radical $O_2^{\bullet-}$ que atravessa membranas por canais aniônicos [Fridovich, 1995].

A principal reação envolvendo o ânion radical $O_2^{\bullet-}$ é a dismutação para H_2O_2 e O_2 pela enzima SOD, cuja constante de velocidade é de $2 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$. Vale notar que a constante de

Figura 1: Representação esquemática da possível produção de peroxinitrito em sistemas biológicos. São apresentadas as reações não balanceadas e sem a indicação de intermediários.

velocidade entre o ânion radical $O_2^{\bullet -}$ e $^{\bullet}NO$ é pelo menos três vezes maior (eq. 2). Isto significa que em condições fisiológicas (10 μM SOD) [Michelson e col., 1977], uma concentração de 2 μM de $^{\bullet}NO$ já é capaz de reagir com 50% do superóxido produzido [Radi e col., 2000]. E concentrações desta ordem são encontradas em situações inflamatórias quando a concentração de $^{\bullet}NO$ passa da ordem de nM para ordem de μM [Moncada e col., 1991]. Portanto, a possibilidade de formação de peroxinitrito em sítios inflamatórios é grande, e, tomando-se em conta a reatividade e difusão das duas espécies precursoras do peroxinitrito, $O_2^{\bullet -}$ e $^{\bullet}NO$, presume-se que a sua formação dar-se-á nos sítios de geração de $O_2^{\bullet -}$.

Outras fontes de peroxinitrito *in vivo* seriam em sítios ativos de determinadas enzimas. Por exemplo, propõe-se que a enzima xantina oxidase poderia produzir peroxinitrito quando incubada com NO_2^- [Godber e col., 2000; Millar, 2002;]. Outra candidata seria a própria enzima $^{\bullet}NO$ sintase que, dependendo das concentrações de L-arginina e O_2 , promoveria a formação de peroxinitrito em baixos fluxos [Xia e col., 1996; Xia e Zweier, 1997].

1.3. Reações do peroxinitrito com biomoléculas

A reatividade do peroxinitrito com biomoléculas *in vitro* está bem estabelecida, caracterizando-se por reações diretas (envolvendo dois elétrons) ou reações envolvendo radicais derivados do peroxinitrito (oxidações por um elétron) (Figura 2) [Bonini e Augusto, 2001]. Apesar de ser relativamente estável em meio alcalino, o peroxinitrito sofre decomposição quando protonado ($pK_a = 6,6$, $t_{1/2} = 4,1$ segundos a pH 7,4, 25°C) isomerizando-se em NO_3^- e H^+ (70 %) e produzindo os radicais $^{\bullet}OH$ e $^{\bullet}NO_2$ (30 %). Outra via possível *in vivo* é a reação direta do peroxinitrito com biomoléculas, por exemplo, heme-proteínas e tiol-proteínas. Entretanto, em fluidos biológicos, onde a concentração do par HCO_3^-/CO_2 é da ordem de 25 mM, o peroxinitrito reage preferencialmente com CO_2 ($k = 2,6 \times 10^4 M^{-1} \cdot s^{-1}$) [Lymar e Hurst, 1996; Bonini e Augusto, 1999]. O aduto putativo nitrosoperoxicarboxilato ($ONOOOCO_2^-$) se decompõe gerando 65 % de CO_2 e NO_3^- e 35 % dos radicais $CO_3^{\bullet -}$ e $^{\bullet}NO_2$ (Figura 2). A formação concomitante de $CO_3^{\bullet -}$ e $^{\bullet}NO_2$ favorece fortemente a nitração de resíduos de tirosina [Santos e col., 2000]

Figura 2: Representação esquemática das possíveis vias de oxidação de biomoléculas (BM) por peroxinitrito na presença e na ausência de CO₂. As constantes de velocidade apresentadas correspondem a 25°C e pH 7,4. A concentração de CO₂ foi considerada de 1 mM. Os radicais derivados do peroxinitrito podem formar biomoléculas nitradas (BMNO₂) e/ou biomoléculas oxidadas (BMox). Note que o peroxinitrito pode oxidar biomoléculas por dois elétrons também.

Um dos principais alvos do peroxinitrito em células é a glutathiona (GSH), devido à alta constante de velocidade de segunda ordem entre ambos ($k = 6,6 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, a 37°C) [Quijano e col., 1997] e principalmente, à alta concentração intracelular de GSH (c.a. 5 - 10 mM). Já foi demonstrado que o tratamento de macrófagos J774 com peroxinitrito exógeno gera preferencialmente radicais glutathionila ($\text{GS}^\bullet$), além de radicais proteicos tirosila, ambos detectados por EPR [Lopes de Menezes e Augusto, 2001]. Por este trabalho, além de trabalhos de outros grupos, sabe-se que o peroxinitrito protonado e o radical $^\bullet\text{NO}_2$ permeiam livremente membranas biológicas [Khairutdinov e col., 2000; Marla e col., 1997] enquanto que o peroxinitrito e o $\text{CO}_3^{\bullet-}$ não. Já foi demonstrado que o peroxinitrito poderia atravessar membranas por meio de canais aniônicos ($\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$) como ocorre com o radical ânion superóxido [Denicola e col., 1998]. Entretanto, em presença de CO_2 a maior parte do peroxinitrito gera os radicais $\text{CO}_3^{\bullet-}$ e $^\bullet\text{NO}_2$ (Figura 2). O $^\bullet\text{NO}_2$ atravessa membranas facilmente graças a seu caráter hidrofóbico e pequeno tamanho; em contrapartida, o $\text{CO}_3^{\bullet-}$ poderia eventualmente atravessar membranas por canais aniônicos. Isso todavia, não deve ocorrer devido a sua alta reatividade. Portanto, se o peroxinitrito for adicionado exogenamente ou produzido *in vivo* fora das células, apenas o radical $^\bullet\text{NO}_2$ atingiria alvos intracelulares, especialmente GSH, como demonstrado para macrófagos [Lopes de Menezes e Augusto, 2001] ou hemoglobina, no caso de eritrócitos [Augusto e col., 2002c]. Por sua vez, sendo o peroxinitrito formado endogenamente, os alvos intracelulares seriam novamente tióis (GSH principalmente), heme-proteínas ou CO_2 [Augusto e col., 2002a, b].

1.4. Redirecionamento da reatividade do peroxinitrito pelo tempol

O nitróxido 4-hidróxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxila (tempol) (Figura 3) é um radical livre estável de baixo peso molecular que difunde facilmente por membranas e apresenta propriedades antioxidantes. Estas propriedades são atribuídas à sua atividade mimética da SOD, à terminação de reações radicalares em cadeia, à detoxificação de complexos heme-ferril e à oxidação de metais reduzidos (Fe^{2+} e Cu^+) que são potenciais efetores da formação de espécies reativas de oxigênio [Offer e col., 2000]. O nitróxido tempol tem se mostrado um

eficiente supressor de nitração de proteínas em modelos de inflamação *in vivo*, onde as concentrações de $\cdot\text{NO}$ encontram-se aumentadas, tais como falência múltipla dos órgãos [Cuzzocrea e col., 2001], isquemia transiente cerebral [Cuzzocrea e col., 2000a], indução de inflamação por carrigenina [Cuzzocrea e col., 2000b], e colite induzida por ácido dinitrotobenzenosulfônico [Cuzzocrea e col., 2000c].

Estudos recentes *in vitro* sobre a interação entre o tempol e peroxinitrito demonstraram que o nitróxido é um eficiente inibidor catalítico da nitração de fenol por peroxinitrito além de favorecer a nitrosação do mesmo [Bonini e col., 2002; Carrol e col., 2000]. O nosso grupo propôs que o tempol reage eficientemente com os radicais derivados do peroxinitrito, especialmente com o $\text{CO}_3^{\cdot-}$ (eq. 3, Figura 3, via 3) [Bonini e col., 2002]. O mecanismo geral proposto é equacionado abaixo (eq. 3 - 5).

O tempol seria oxidado pelo radical $\text{CO}_3^{\cdot-}$ (eq. 4), e seu produto oxidaria o peroxinitrito (eq. 4) que regeneraria o tempol, e formaria o radical $\cdot\text{NO}$. Este, por sua vez, reagiria com o $\cdot\text{NO}_2$ produzido pela decomposição do peroxinitrito (Figura 2 e 3, via 3) formando o agente nitrosante N_2O_3 (eq. 5). Portanto, a proteção conferida pelo tempol em modelos de inflamação poderia ocorrer não só pela atividade mimética da SOD, que previne a formação de peroxinitrito, mas também, pela decomposição catalítica do peroxinitrito para o agente nitrosante N_2O_3 (Figura 3, via 1).

1.5. Nitrosação em sistemas biológicos

A oxidação do $\cdot\text{NO}$ em sistemas biológicos (eq. 6 - 7) pode gerar uma série de modificações em biomoléculas, como por exemplo, a formação de 3-nitrotirosina mediada por $\cdot\text{NO}_2$ ou nitrosação de cisteína (CysS-NO) via N_2O_3 . A nitrosação de proteínas *in vivo* tem sido

Figura 3: Representação esquemática das possíveis vias de oxidação de proteínas durante o tratamento de proteínas por peroxinitrito/CO₂ em ausência e presença de tempol. Os radicais derivados do peroxinitrito/CO₂ oxidam tióis e nitram tirosinas em proteínas (via 2). Em presença de tempol (TP-N-O•), espera-se que a disponibilidade dos radicais derivados do peroxinitrito diminua e aumente a concentração de N₂O₃ ocasionando inibição de nitração de tirosinas e de oxidação de tióis e aumento de nitrosação de cisteínas (via 3). Além disso, o tempol pode agir na inibição da formação de peroxinitrito, como mimético da enzima SOD (via 1). *Inserção:* Estrutura química do nitróxido tempol.

relacionada a vários eventos de sinalização, entre eles inibição de apoptose [Mannick e col., 1999] e regulação de receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) [Lipton e col., 1993, para uma revisão, ver Nelson e col., 2003]. Esta nomenclatura surgiu para diferenciar a nitrosação da nitrosilação, que é a complexação do *NO a metais, como no caso do Fe(II) da desoxihemoglobina formando nitrosil-hemoglobina [Mannick e Schonhff, 2002]. Teoricamente, vários resíduos de uma proteína podem ser nitrosados: cisteínas, tirosinas, lisinas, argininas e triptofano. Entretanto, até hoje foram encontrados apenas resíduos de cisteínas nitrosados em biomoléculas. Aparentemente, a maior prevalência da reatividade dos tióis sobre outros centros nucleofílicos explicariam a propensão da formação de nitrosotiol. Realmente, os principais sítios atacado pelo *NO são proteínas contendo metais ou tióis estrategicamente localizados nos sítios alostéricos ou sítios ativos: proteínas sinalizadoras, canais iônicos, receptores, enzimas, e fatores de transcrição que contém metais de transição ou tióis [Stamler, 1994].

Classicamente, a nitrosação de cisteínas em proteínas ocorre pela reação entre o agente nitrosante N_2O_3 com o tiolato do resíduo de cisteína, via *NO com geração de nitrito (eq. 8). Uma proteína ou peptídeo pode também nitrosar outro resíduo de cisteína por transnitrosação (eq. 9). Além destes dois mecanismos, recentemente foi proposta nitrosação de proteínas através da oxidação do tiol pelo radical *NO_2 (eq. 10) com posterior recombinação do *NO ao radical tiila (eq. 11) [Schrammel e col., 2003].

Uma vez formado, o nitrosotiol pode ser decomposto por várias vias. Estes compostos, *in vitro*, são sensíveis à luz, que provoca cisão homolítica (eq. 12), ao pH, à temperatura e à presença de metais. Neste último caso, há liberação do radical *NO , com oxidação do metal e regeneração do tiol (eq. 13). Este mecanismo inclusive é sugerido como potencializador da

nitrosilação da guanilato ciclase solúvel por nitrosotióis. A enzima possui um cobre (Cu^+) ligado próximo ao grupo heme, de função atualmente desconhecida, e especula-se que seja para promover a liberação do $\cdot\text{NO}$ de biomoléculas, como GSNO por exemplo, e ativar a guanilato ciclase [Ignarro, 2002].

Além de metais, a liberação do $\cdot\text{NO}$ se dá em presença de redutores celulares, como ascorbato ou NADH. Pode ocorrer a denitrosação de determinada biomolécula em presença de outros tióis, por transnitrosação (eq. 9), que pode gerar nitrosotióis menos estáveis. Dentre alguns nitrosocompostos estudados, sabe-se que proteínas nitrosadas são mais estáveis que peptídeos nitrosados (por exemplo, atualmente pode-se escrever a seguinte ordem de estabilidade $\text{BSA-CysNO} > \text{GSNO} > \text{CysNO}$ [Singh e col., 1996]). Ainda, o nitrosotiol pode ser decomposto pela formação de ponte dissulfeto com outro tiol livre próximo. Por causa de todas estas reações possíveis dos nitrosocompostos, experimentos de identificação e quantificação de nitrosotióis são realizados sempre com muito cuidado com as amostras, sendo tratadas imediatamente com quelantes de metais e reagentes alquilantes específicos de tióis livres.

2. Objetivos

A partir do mecanismo proposto para o redirecionamento da reatividade do peroxinitrito pelo tempol frente a compostos aromáticos [Bonini e col., 2002; Carrol e col., 2000] objetivou-se examinar se esse mecanismo poderia operar em condições biológicas, com proteínas e células em cultura. Desta forma, foram analisados os efeitos do tempol sobre a interação de albumina sérica bovina e de macrófagos murinos J774 com peroxinitrito/CO₂.

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

A água utilizada em todos os experimentos foi destilada e purificada em sistema Nanopure Millipore e tratada com Chelex-100 (Sigma).

Todos os reagentes foram comprados da Aldrich, Merck, Sigma ou Fisher e eram de grau analítico ou superior.

Peroxinitrito foi sintetizado em um reator do tipo *quenched flow* a partir de NaNO_2 (0,6 M) e H_2O_2 (0,7 M), com adição sequencial de NaOH (1,2 M). A solução obtida foi tratada com MgO_2 para retirada do excesso de H_2O_2 . A concentração de peroxinitrito foi determinada espectrofotometricamente a 302 nm ($\epsilon_{302\text{nm}} = 1670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [Koppenol *et al.*, 1996]. A concentração de nitrito, contaminante da síntese de peroxinitrito, foi medida a 354 nm ($\epsilon = 24,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [Koppenol *et al.*, 1996] e mantida sempre abaixo de 30% da concentração de peroxinitrito, para minimizar reações secundárias entre nitrito e os radicais derivados do peroxinitrito.

As concentrações de CO_2 foram calculadas a partir da concentração de bicarbonato utilizada através da equação de Henderson-Hasselbalch, considerando-se $\text{pK}_a_{\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2} = 6,4$ [Dean, J. A., 1979].

A concentração de proteína em extratos celulares foi determinada pelo teste de Biureto (reagente BioRad) utilizando-se albumina bovina como proteína padrão.

O captador de spin DMPO foi purificado por destilação a vácuo e sua concentração determinada espectrofotometricamente ($\epsilon_{234\text{nm}} = 7700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, em etanol). O captador de spin DBNBS foi sintetizado conforme protocolo descrito anteriormente [Kaur e col., 1981].

3.2. Métodos

Preparação da Albumina e Albumina Desnaturada e Tratamento com Peroxinitrito

Albumina bovina nativa (BSA) (fração V, Merck) utilizada nos experimentos foi reduzida com β -mercaptoetanol (10 vezes mais concentrado que a proteína) por 2h em tampão fosfato (50 mM) pH 7,4 a 0°C, e o excesso de redutor foi retirado por diálise em tampão fosfato (50 mM) pH 7,4 (4 x 3L). Albumina desnaturada (dBSA) (10 mg/mL) foi reduzida com DTT (100 mM) por 2h em tampão fosfato (50 mM) pH 7,4 a 0°C e dialisada em HCl 0,1 M (6 x 3L), conforme procedimento adaptado de Simon e col., 1996.

Albumina nativa ou desnaturada (3 mg/mL) em tampão fosfato (50 mM) pH 7,2 contendo NaHCO_3 (25 mM) foi tratada com peroxinitrito (1 mM) à temperatura ambiente (pH final 7,4), em ausência e presença de tempol (25 – 100 μM). Após 5 minutos, aliquotou-se parte da solução para dosagem de tióis livres e 3-nitrotirosina (ver abaixo) e outra parte foi tratada com N-etilmaleimida (excesso de 10 vezes em relação à concentração de tiol livre inicial) por 10 minutos à temperatura ambiente para dosagem de nitrosotiol (ver abaixo). Para análise dos produtos de decomposição do peroxinitrito adicionou-se peroxinitrito à solução contendo todos os reagentes com exceção da proteína e após 2 minutos adicionou-se a mesma.

Quantificação de Tióis Oxidados

Quantificou-se os tióis livres após incubação por 10 minutos à temperatura ambiente de 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzóico) (1 mM) à amostra diluída em tampão glicina (100 mM) pH 8,5, pela absorvância do ânion tionitrobenzoato a 412 nm ($\epsilon = 1,36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [Quijano e col., 1997]. A concentração de tióis oxidados na albumina foi calculada pela diferença entre a concentração de tióis livres antes e depois do tratamento com peroxinitrito/ CO_2 .

Quantificação de Nitrotirosina

A concentração de nitrotirosina nas amostras foi quantificada espectrofotometricamente a 430 nm ($\epsilon = 4400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) após o pH da solução ter sido elevado pela adição de NaOH (concentração final c.a. 0,1 M).

Quantificação de Nitrosotiol pelo Método de Saville (para dosagem de dBSA)

A amostra de dBSA, que teve os tióis livres bloqueados com N-etilmaleimida conforme descrito acima, foi centrifugada (cerca de 7 - 8 vezes a 15000 g por 20 minutos) para eliminar o excesso de nitrito (proveniente da solução de peroxinitrito) utilizando-se filtros de corte de 5 kDa (Millipore). A solução de albumina foi separada em duas partes de igual volume, e a uma delas adicionou-se solução saturada de HgCl_2 (concentração final de c.a. 1,8 mM). Após incubação de 10 minutos à temperatura ambiente dosou-se nitrito nas duas amostras (tratada e não tratada com mercúrio) pelo método de Griess, pela adição dos reagentes Cloreto de N-(1-naftil)etilenodiamina (0,1 %) e Sulfanilamida (1 %) em H_3PO_4 (2,5 %). Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, mediu-se a absorbância a 540 nm e calculou-se a concentração de nitrito com base em uma curva de calibração feita em paralelo. A solução de nitrito padrão foi feita sempre no dia da análise. A concentração de nitrosotiol na amostra foi calculada pela diferença entre a amostra não tratada e a tratada com mercúrio. O limite de detecção obtido por esta metodologia foi de 1 μM de NO_2^- , portanto, para as outras amostras (BSA nativa e amostras de lisados de células) utilizou-se técnica de maior sensibilidade, baseada em reação quimiluminescente (ver abaixo).

EPR e Captação de Spin

Os espectros de EPR foram obtidos em um espectrômetro de banda X Bruker ER 200 D-SRC modernizado com instrumentação EMX e operando a 9,65 GHz e 100 KHz de modulação de campo. Os espectros foram registrados a temperatura ambiente em *flat cell* após vários tempos de incubação. O campo magnético foi calibrado com tempol ($g = 2,0056$).

Cultivo dos Macrófagos J774 e Tratamento com Peroxinitrito

Macrófagos murinos da linhagem J774 [Ralph e Nakanishi, 1975] foram cultivados em meio de cultura DMEM (Sigma) suplementado com NaHCO_3 (44 mM), arginina (800 μM), streptomicina (100 mg/mL), ampicilina (25 mg/mL) e soro fetal bovino (10 %) (CultiLab), em estufa a $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ e atmosfera contendo 5% de CO_2 . Após descongelamento as células foram utilizadas por até 2 meses.

Para a realização dos experimentos inicialmente mediu-se a viabilidade celular. Para isso, diluiu-se a suspensão de macrófagos em Azul de Tripán (Sigma) e aplicou-se no hemocítômetro [Patterson, 1979]. As células viáveis foram contadas pela exclusão do corante. Suspensões apresentando viabilidade maior que 80 % foram utilizadas nos experimentos. As células foram lavadas e ressuspensas em PBS modificado [Lopes de Menezes e Augusto, 2001] a fim de manter o pH ($7,4 \pm 0,2$) após o tratamento com peroxinitrito (que deve ser mantido em estoque em meio fortemente alcalino) sem haver excessiva lise celular. Este PBS modificado continha NaHCO_3 (20 mM) e o pH foi verificado antes e depois da adição do peroxinitrito. As suspensões (1×10^7 células/mL) foram tratadas com peroxinitrito (1 mM) em ausência ou presença de tempol (25 – 100 μM) e mantidas a temperatura ambiente por 5 minutos. As suspensões foram centrifugadas (200 g por 10 minutos), o sobrenadante foi retirado e as células foram ressuspensas em PBS contendo NEM (10 mM) e DTPA (1 mM). Após lise das células por *freezing-thawing* (congelamento das suspensões celulares em mistura de gelo seco/acetona e descongelamento em banho-maria a 37°C por três vezes) adicionou-se NP-40 (1 %) e centrifugou-se para retirada de debris celulares (1000 g por 10 minutos). O lisado foi retirado e mantido a -80°C por no máximo três dias para análise de nitrosotiol.

*Quantificação de Nitrosotiol pelo Analisador de *NO (para dosagem em BSA nativa e células)*

A quantificação de nitrosotiol em amostras proteicas (BSA nativa e lisados de macrófagos) foi obtida em um analisador de *NO SieversTM. Este método apresenta maior sensibilidade de detecção de nitrosotiol pelo método de Saville, descrito anteriormente. Ao contrário do limite de detecção ser da ordem de micromolar, como a maioria dos métodos espectrofotométricos (como no caso do método de Saville), por quimiluminescência quantifica-se nitrosotíóis da ordem de nanomolar. Basicamente, o analisador de *NO é composto por uma cela que contém a solução de análise e um detector de específico de *NO. As amostras são injetadas na solução de análise, que continuamente recebe o gás inerte N_2 . Apenas os gases contidos na amostra são arrastados até o detector de *NO, que contém O_3 . O ozônio reage especificamente com *NO gerando * NO_2 , que ao decair para * NO_2 produz energia térmica detectada na forma de miliVolts (mV).

Para dosarmos nitrosotiol por quimiluminescência seguimos o procedimento de Feelisch e col., 2002. A solução de análise foi composta por KI (45 mM), I_2 (10 mM), em HAc glacial, contendo anti-espumante (decanol) (c. a. 5 % v/v), mantida a 60°C. Esta solução foi utilizada para cerca de 20 injeções de amostra, ou apenas 3 injeções, conforme tratamento ou não das amostras com sulfanilamida; para controle durante os experimentos foram feitas injeções de solução padrão de nitrito. Para cada dia de experimento foi feita uma curva de calibração de $NaNO_2$ (10 nM – 2 μ M), cuja solução estoque (100 mM) foi feita no dia. As áreas referentes às concentrações de nitrito de cada injeção (400 μ L) foram calculadas pelo programa Liquid.exe (SieversTM).

Cada amostra foi separada em três alíquotas. A uma delas adicionou-se solução de sulfanilamida (concentração final 0,5%) em HCl (concentração final 0,05 M), pH final menor ou igual a 3,0 e incubou-se por 15 minutos a temperatura ambiente protegido de luz. À outra alíquota adicionou-se a mesma solução de sulfanilamida em HCl contendo $HgCl_2$ (concentração final 0,2%), e incubou-se por 30 minutos a temperatura ambiente, protegido de luz. A quantificação de nitrito nas amostras foi calculada pela diferença entre a injeção da amostra sem tratamento e a amostra tratada com sulfanilamida, que complexa o NO_2^- da solução. A quantificação de nitrosotiol nas amostras foi calculada pela diferença entre a injeção da amostra tratada com sulfanilamida e a amostra tratada com sulfanilamida/ Hg^{2+} , que promove a liberação de NO_2^- pela quebra da ligação S-NO.

Quantificação de Nitrotirosina por Immunoblotting

Aplicou-se 0,5 μ g de proteína através do sistema de filtração da Apelex (capacidade de 150 μ L/poço) em membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences) pré-hidratada em H_2O destilada por 30 minutos. A fixação das proteínas foi verificada pela marcação do corante Ponceau. A membrana foi bloqueada com solução de leite desnatado (5%) em TBS por 2 h, lavada em seguida por 2 minutos com tampão de lavagem (TBS contendo Tween 0,1% e leite desnatado 0,1 %), incubada com anticorpo primário por 2h (anti-nitrotirosina, policlonal, diluição 1/5000, Oxis), lavada por 2, 5, 5, 10 minutos com tampão de lavagem, incubada com anticorpo secundário por 1h (anti-IgG de ovelha conjugado com peroxidase, 1/5000, Calbiochem) e lavada por 2, 5, 5, 10 minutos com tampão de lavagem. As proteínas imuno-reativas foram

detectadas por quimiluminescência acentuada por luminol (kit ECL, Amersham Biosciences). O filme revelado foi analisado pelo programa ImageQuant V. 5,2 (Molecular Dynamics, 1999) para quantificar a marcação de nitrotirosina nas amostras comparando-se com o padrão positivo aplicado na mesma membrana, BSA nitrada. Este padrão foi obtido pelo tratamento de BSA (5 mg/mL) por peroxinitrito (1 mM) em presença de NaHCO₃ (25 mM), pH 7,4. A concentração de 3-nitrotirosina foi de 1,3 nitrotirosina/BSA. Nos procedimentos, aplicou-se usualmente na membrana 1 µg de BSA nitrada, que correspondia a 15,4 nmol de 3-nitrotirosina.

Imunocitoquímica

Após tratamento dos macrófagos com peroxinitrito como descrito anteriormente, a suspensão de células (2×10^4 células/mL) foi lavada com PBS, tratada com paraformaldeído 4% por 15 minutos e fixadas em lâmina. As lâminas foram tratadas com solução de bloqueio (BSA 3% e saponina 0,1% em PBS) por 40 minutos, em câmara úmida a 37°C, e após lavagens com PBS (2 vezes de 5 minutos) as lâminas foram incubadas com anticorpo policlonal anti-3-nitrotirosina (1/100, diluído em PBS, Oxis) por 1 hora, em câmara úmida a 37°C. Após lavagem com PBS (2 vezes de 5 minutos), as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de ovelha conjugado com rodamina (1/200, Calbiochem, diluído em PBS contendo marcador de material genético, DAPI 50 µM, Sigma) por 1 hora, em câmara úmida a 37°C. Após nova lavagem com PBS as lâminas foram tratadas com FluorSave (Calbiochem) e analisadas em microscópio Olympus BX-40 acoplado a sistema de imunofluorescência Olympus TH3 modelo BX-FLA.

A imunocitoquímica para revelação de proteínas nitrosadas nas células foi realizada seguindo o mesmo procedimento com as seguintes modificações: lavagens em PBS-BSA (PBS contendo 0,1% BSA, fração V, Merck), diluição do anticorpo primário anti-CysNO em PBS-BSA (1/100, A.G. Scientific), diluição do anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com FITC em PBS-BSA (1/300, Sigma).

4. Resultados e Discussão

4.1 Efeitos do tempol sobre a interação da BSA com peroxinitrito/CO₂

4.1.1 Produtos estáveis da BSA

Para avaliar como o tempol afeta a nitração e nitrosação de proteínas mediadas por peroxinitrito/CO₂, escolhemos a BSA como proteína modelo. Esta proteína tem sua estrutura tridimensional conhecida e apresenta 20 tirosinas e 1 cisteína livre (além de 17 pontes dissulfeto) [Peters, 1985]. Como em ambientes biológicos a reação entre peroxinitrito e CO₂ deve prevalecer em detrimento à reação direta entre o oxidante e biomoléculas e à sua homólise catalisada por H⁺ (Figura 2), otimizamos as concentrações de reagentes para favorecer a reação entre ONOO⁻ e CO₂. Para as concentrações de BSA (45 μM), ONOO⁻ (1 mM) e HCO₃⁻ (20 mM) utilizadas nos experimentos pode-se calcular a fração do peroxinitrito que reage com CO₂ pela expressão abaixo, utilizando as constantes da reação direta entre ONOO⁻ e BSA ($k_{\text{BSA/ONOO}^-} = 2,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) [Alvarez e col., 1999] e da decomposição ácida do ONOO⁻ ($k = 0,17 \text{ s}^{-1}$).

$$\begin{aligned} d[\text{ONOO}^-]/dt &= (k_{\text{ONOO}^-} + k_{\text{BSA/ONOO}^-} [\text{BSA}] + k_{\text{CO}_2/\text{ONOO}^-} [\text{CO}_2]) [\text{ONOO}^-] \\ &= (0,17 + 2,6 \times 10^3 \times 45 \times 10^{-6} + 2,6 \times 10^4 \times 2 \times 10^{-3}) [\text{ONOO}^-] \\ &= (0,17 + 0,117 + 520) [\text{ONOO}^-] \end{aligned}$$

Nas nossas condições experimentais, 99% do ONOO⁻ deve reagir com CO₂ para formar os radicais CO₃^{•-} e [•]NO₂. A concentração de CO₂ em pH 7,4 corresponde a cerca de 10% da concentração de HCO₃⁻. A concentração de radicais gerada (35% da concentração de ONOO⁻ para cada radical) seria de aproximadamente 700 μM em ausência de tempol. Com a adição do nitróxido, a concentração de radicais derivados do peroxinitrito que poderia oxidar a BSA seria menor, pois parte do peroxinitrito (c.a. 35%) deve reagir com tempol (eq. 4 e Figura 3). A concentração máxima de radicais derivados do peroxinitrito em presença de tempol seria,

no máximo, de 520 μM (75% da concentração total de radicais formada em ausência de tempol).

Para analisarmos os efeitos do tempol na oxidação da albumina pelos radicais derivados do peroxinitrito, $\text{CO}_3^{\cdot-}$ e $^{\cdot}\text{NO}_2$, quantificamos os produtos estáveis 3-nitrotirosina, tióis oxidados e nitrosotiol. Os radicais derivados do peroxinitrito, $\text{CO}_3^{\cdot-}$ e $^{\cdot}\text{NO}_2$, nitram eficientemente tirosinas e oxidam tióis [Augusto e col., 2002a e b] e, em presença de tempol, poderia haver formação de nitrosotiol (ver eq. 9 e Figura 3). De fato, o tratamento de BSA (45 μM , 855 μM tyr-BSA, < 40 μM cys-BSA) com peroxinitrito (1 mM) em presença de HCO_3^- (20 mM) nitrou cerca das 10 % da tirosinas da proteína (91 μM) e oxidou praticamente 100 % do tiol (22 μM). Além disso houve formação de nitrosotiol em concentração bem menor (0,6 μM) (Figura 4). Em presença de tempol (100 μM) observou-se um forte inibição da nitração (90 %) e da oxidação de tióis (50 %) e um aumento na nitroação (180 %) (Figura 4). Estes resultados iniciais corroboram o mecanismo proposto para o redirecionamento da reatividade do ONOO^- pelo tempol.

A fim de favorecer a competição entre os principais alvos proteicos (cisteína e tirosina) dos radicais $\text{CO}_3^{\cdot-}$ e $^{\cdot}\text{NO}_2$, a albumina foi desnaturada em condições redutoras para romper as pontes dissulfeto. Esta albumina (dBSA) apresentou de 7 a 13 moles de resíduos de cisteína livres por mol de proteína, dependendo da preparação. Com o aumento na concentração de tióis, parte do peroxinitrito poderia reagir diretamente com os tióis. Apesar das constantes de velocidade das reações dos vários resíduos da BSA com o peroxinitrito não serem conhecidas, podemos utilizar a constante de velocidade medida para a reação da cisteína 34 da BSA nativa com o ONOO^- [Alvarez e col., 1999] para estimar a porcentagem do peroxinitrito que reagiria diretamente com os tióis. O cálculo é mostrado abaixo para a BSA contendo 13 cys/BSA.

$$\begin{aligned} d[\text{ONOO}^-]/dt &= (k_{\text{ONOO}^-} + k_{\text{HSA/ONOO}^-} [-\text{cys}] + k_{\text{CO}_2/\text{ONOO}^-} \times [\text{CO}_2])[\text{ONOO}^-] \\ &= (0,17 + 2,6 \times 10^3 \times 600 \times 10^{-6} + 2,6 \times 10^4 \times 2 \times 10^{-3}) [\text{ONOO}^-] \\ &= (0,17 + 1,56 + 520) [\text{ONOO}^-] \end{aligned}$$

Novamente, mais de 99 % do peroxinitrito deve reagir preferencialmente com o CO_2 . Portanto, pode-se considerar que a concentração de radicais formados seria similar à concentração de

B I B L I O T E C A
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

Figura 4: Nitração, nitrosação e oxidação de tiol da BSA após tratamento com peroxinitrito/CO₂ em ausência ou presença de tempol. Albumina nativa (BSA) ou desnaturada (dBSA) foi tratada com peroxinitrito (1 mM) em ausência ou presença de tempol (100 μM), em tampão fosfato 50 mM, pH final 7,4, contendo HCO₃⁻ (20 mM). **(A)** Concentração de 3-nitrotirosina formada após a reação com peroxinitrito, medida por método espectrofotométrico em meio alcalino. **(B)** Concentração de nitrosotiol, medida pelo método de Saville (dBSA) e quimiluminescência (BSA). **(C)** Concentração de tióis oxidados, medida por método espectrofotométrico após reação com DTNB. Os detalhes experimentais para as quantificações de 3-nitrotirosina, nitrosotiol e oxidação de tióis estão descritos em Materiais e Métodos.

radicais derivados do ONOO^- no sistema da BSA nativa, ou seja *c.a.* 700 μM , em ausência de tempol.

A dBSA oxidada por $\text{ONOO}^-/\text{CO}_2$ apresentou nitração de cerca de 6 % dos resíduos proteicos, uma nitração menor que a medida para a BSA nativa (Figura 4A). Já a oxidação dos resíduos de cisteína aumentou proporcionalmente ao aumento da concentração de tiol livre (Figura 4C), provavelmente porque a constante de velocidade da reação de $^*\text{NO}_2$ com cisteína é cerca de 100 vezes maior do que aquela com tirosina (Tabela 1). Por sua vez, o ânion radical carbonato reage com resíduos de tirosina e cisteína com constantes de velocidades similares. Analisando-se os resultados obtidos com lotes diferentes de dBSA (concentrações de tióis variando entre 315 μM a 570 μM) observa-se que o aumento na concentração de resíduos de cisteína livres leva à maior oxidação dos mesmos com pouca alteração no rendimento de nitração (Figura 4). Esses resultados indicam que o principal alvo dos radicais derivados do ONOO^- são os resíduos de cisteína da proteína, tanto no caso da BSA nativa como no caso da dBSA.

A formação de nitrosotiol por $\text{ONOO}^-/\text{CO}_2$ em ausência de tempol mostrou-se dependente da concentração de tiol livre na albumina como pode ser observado na figura 4 (B) ao se comparar os dois lotes de dBSA (7 cys/BSA e 13 cys/BSA, produziram 1,6 e 3,6 μM de nitrosotiol, respectivamente). Esses dados sugerem um mecanismo de nitrosação dependente de radicais proteína-cisteinila. Uma possibilidade seria a recombinação desses radicais com $^*\text{NO}_2$ via nitrogênio ou oxigênio produzindo nitro ou nitroso derivados que produziriam proteína-cysNO (PSNO) numa seqüência de reações secundárias (eq. 14 – 16) [Balazy e col., 1998].

O tratamento da BSA desnaturada com $\text{ONOO}^-/\text{CO}_2$ em presença de tempol levou à inibição da nitração de resíduos de tirosina (*c.a.* 80%) e da oxidação de cisteína (*c.a.* 20%) e aumento da formação de nitrosotiol (200 - 350%) (Figura 4). Como esperado, os efeitos de inibição ou aumento da formação de produtos estáveis de oxidação da BSA e da dBSA em

Tabela 1: Constantes de velocidade dos radicais $\text{CO}_3^{\bullet-}$ e $^{\bullet}\text{NO}_2$ com possíveis aminoácidos alvo na albumina.

Reação	Constante de velocidade (pH)	Referência Bibliográfica
$\text{CO}_3^{\bullet-} + \text{Cys-SH}$	$4,6 \times 10^7$ (7,0)	Chen e col., 1973
$\text{CO}_3^{\bullet-} + \text{Tyr-OH}$	$4,5 \times 10^7$ (7,0)	Chen e col., 1973
$\text{CO}_3^{\bullet-} + \text{Trp-H}$	$7,0 \times 10^8$ (7,0)	Chen e col., 1973
$^{\bullet}\text{NO}_2 + \text{Cys-S}^-$	$5,0 \times 10^7$ (7,0)	Prutz e col., 1985
$^{\bullet}\text{NO}_2 + \text{Gly-Tyr-OH}$	$3,2 \times 10^5$ (7,5)	Prutz e col., 1985

presença de tempol foram dependentes da concentração do nitróxido, como mostrado na figura 5.

4.1.2 Produtos radicalares da BSA

A oxidação da albumina pelos radicais derivados do peroxinitrito gera radicais de proteína relativamente instáveis, não detectáveis por EPR direto [Bonini e col., 2001; Gatti e col., 1998]. Assim, para analisarmos o efeito do tempol sobre a formação de radicais proteicos realizamos estudos de EPR associado à técnica de captação de spin. Usamos os captadores de spin, DBNBS (Figura 6) e PBN (Figura 7), que formam adutos estáveis principalmente com radicais de carbono e radicais tiila, respectivamente. Em presença de DBNBS, a albumina nativa apresentou um espectro composto por dois sinais, um tripleto largo característico de nitróxidos imobilizados (figura 6A, marcado com •) consistente com a formação de um aduto proteico ($2a_{zz}^N = 60$ G) possivelmente DBNBS/Trp-BSA ($2a_{zz}^N = 58$ G, Silvester e col., 1998; $2a_{zz}^N = 59,6$ G, Pietraforte e col., 1997), e um tripleto móvel (Figura 6A, marcado com x) que deve ser um produto de oxidação do próprio captador [Kaur, 1996]. O espectro do radical DBNBS/C-proteína diminuiu *c.a.* 30 % em presença de tempol (figura 6B), inibição bem menor que a observada para o rendimento de 3-nitrotirosina (Figura 4A). Esses dados corroboram a identificação do radical aduto captado com o DBNBS/Trp-proteína, embora os parâmetros de EPR não permitam a exclusão de radical DBNBS/Tyr-proteína. Um espectro similar foi obtido em incubações de dBSA, mas em concentrações um pouco menores do que as observadas com BSA nativa (comparar figura 6C com 6A). Este resultado é consistente com a diminuição da oxidação/nitração de tirosinas (e/ou triptofano) observada com o aumento na concentração de resíduos de cisteína na dBSA, conforme exibido na figura 4 (comparar formação de 3-nitrotirosina para a BSA e dBSA). O tempol inibiu totalmente a detecção de radicais de carbono na dBSA oxidada por ONOO⁻/CO₂ como pode ser visto na figura 6D. No caso do captador de spin PBN obtivemos um espectro consistente com PBN/S-BSA ($2a_{zz}^N = 60$ G) (Figura 7A e 7C) [Gatti e col., 1994]. O espectro obtido para a BSA nativa foi 1,5 vezes menor que o obtido para a dBSA, consistente com a maior oxidação de tióis observada para a dBSA (Figura 4C). O sinal

Figura 5: Efeito da concentração de tempol na formação de 3-nitrotirosina, nitrosotiol e oxidação de tióis em incubações de BSA (desnaturada ou nativa) com peroxinitrito/ CO_2 . Albumina ($45 \mu\text{M}$; $12,6 \text{ SH/BSA}$), em tampão fosfato (50 mM) pH 7,4 contendo CO_2 (2 mM), foi tratada com peroxinitrito (1 mM), em presença de diferentes concentrações de tempol ($0 - 100 \mu\text{M}$). **(A)** Concentração de 3-nitrotirosina formada após a reação com peroxinitrito. **(B)** Concentração de tióis oxidados. **(C)** Concentração de nitrosotiol, calculada pelo acúmulo de nitrito em presença e ausência de mercúrio. **(D)** Concentração de nitrosotiol, calculada por quimiluminescência. Os quadros **(A)**, **(B)** e **(C)** referem-se aos resultados obtidos para a dBSA enquanto o quadro **(D)** refere-se à BSA nativa. As quantificações foram descritas detalhadamente em Materiais e Métodos.

Figura 6: Espectros de EPR dos radicais adutos de DNBBS obtidos em incubações de albumina com peroxinitrito/CO₂ na presença e ausência de tempol. Albumina (45 μM, 0,7 SH/BSA) ou dBSA (45 μM, 11 SH/BSA) em tampão fosfato (50 mM) pH 7,4 contendo CO₂ (2 mM) e DNBBS (10 mM) foi tratada com peroxinitrito (1 mM) e os espectros adquiridos após 1 minuto. **(A)** BSA em ausência de tempol; **(B)** mesmo que (A) em presença de tempol (10 μM), **(C)** BSA em ausência de tempol; **(D)** mesmo que (C) em presença de tempol (10 μM). Os espectros foram marcados para mostrar radical aduto (•) DNBBS/•C-Albumina. Condições instrumentais: potência de microondas, 20 mW; velocidade de varredura, 0,3 G/s; ganho, 8,9 x 10⁴; amplitude de modulação, 2,5 G.

Figura 7: Espectros de EPR dos radicais adutos de PBN obtidos em incubações de albumina nativa com peroxinitrito/CO₂ na presença e ausência de tempol. Albumina (45 μM, 0,7 SH/BSA) ou dBSA (45 μM, 11 SH/BSA) em tampão fosfato (50 mM) pH 7,4 contendo CO₂ (2 mM) e PBN (25 mM), foi tratada com peroxinitrito (1 mM) e os espectros foram adquiridos após 1 minuto. **(A)** BSA em ausência de tempol; **(B)** mesmo que (A) em presença de tempol (10 μM), **(C)** BSAd em ausência de tempol, **(D)** mesmo que (C) em presença de tempol (10 μM). Os espectros foram marcados para mostrar radical aduto (•) PBN/•S-BSA. Condições instrumentais: potência, 20 mW; velocidade de varredura, 0,3 G/s; ganho, 8,9 x 10⁴; amplitude de modulação, 2,5 G.

de PBN/*S-BSA foi inibido em presença de tempol em proporções similares à inibição da oxidação de resíduos de cisteína tanto na BSA como na dBSA (Figura 7 e Figura 4C) embora as concentrações de tempol utilizadas nos experimentos tenha sido diferentes, por razões experimentais (100 μ M tempol gera um espectro intenso que se sobrepõe aos espectros dos radicais proteicos).

4.1.3 Consumo de tempol

Pelo mecanismo proposto para o redirecionamento da reatividade do peroxinitrito pelo tempol, o nítróxido seria oxidado a cátion oxamônio (eq. 3) que oxidaria o ONOO⁻ remanescente (eq. 4) regenerando o tempol. Para analisarmos a concentração de tempol após a oxidação da proteína pelo peroxinitrito, acompanhamos a reação por EPR antes e depois da adição do oxidante.

A concentração de tempol manteve-se praticamente constante no caso da BSA mas não no caso da dBSA, após o tratamento com peroxinitrito (Figura 8). Nesse caso, 90% do tempol foi consumido, independentemente da concentração inicial, 10 μ M (dados não mostrados) ou 100 μ M (Figura 8). O produto final do tempol não foi a hidroxilamina correspondente porque a adição de excesso de ferricianeto (0,1 mM) ao final de experimento não recuperou o sinal de EPR (dados não mostrados). Provavelmente, ocorreu a formação de adutos de tempol com os radicais da BSA [Wright e English, 2003].

4.1.4 Conclusões parciais

O tempol apresentou-se como um eficiente sequestrador dos radicais derivados do peroxinitrito durante a oxidação da BSA como pode ser observado pelas quantificações dos produtos estáveis de oxidação (Figura 4 e Figura 5) e pelo acompanhamento da formação de radicais proteicos (Figuras 6 e 7). A nitrosação que observamos tanto para a BSA quanto para a dBSA teve rendimento inferior a 1% da concentração de radicais potencialmente gerados (520 μ M), valor muito menor ao obtido quando fenol foi usado como alvo; neste caso, o

Figura 8: Espectros de EPR de tempol obtidos em incubações de albumina tratada ou não com peroxinitrito. (A) Espectro obtido após 1 minuto da adição de tempol (100 μ M) em solução de dBSA (45 μ M, 11 SH/BSA) em tampão fosfato (50 mM) pH 7,4 contendo CO_2 (2 mM). **(B)** mesmo que (A), mas com adição posterior de peroxinitrito (1 mM) e o espectro foi obtido após 1 minuto. **(C)** e **(D)**, respectivamente, mesmo que **(A)** e **(B)**, em presença de BSA nativa. Condições instrumentais: potência, 20 mW; velocidade de varredura, 0,3 G/s; ganho, $8,9 \times 10^3$; amplitude de modulação, 1 G.

rendimento chegou a aproximadamente 30% da concentração inicial de peroxinitrito em pH 7,4 [Bonini e col., 2002]. Esta comparação indica que a formação do agente nitrosante foi inibida. Há várias reações que poderiam estar inibindo a nitrosação: reações envolvendo o tempol, o cátion oxamônio ou o agente nitrosante N_2O_3 .

O tempol pode reagir com o radical *NO_2 (eq. 17) com constante de velocidade de valor $7 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [Goldstein e col., 2003]. Entretanto, nossos dados mostram que a nitração de tirosina foi eficientemente inibida enquanto que a oxidação de cisteína não, o que sugere que o tempol reagiria mais rapidamente com o radical $CO_3^{\cdot-}$ do que com o radical *NO_2 , como foi proposto anteriormente [Bonini e col., 2002].

O consumo do tempol também pode ser decorrente da reação entre radicais proteicos e o próprio nitróxido. Os nitróxidos e seus derivados reagem com radicais de carbono com constantes de velocidade bastante altas ($10^6 - 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, Perkins, 1980). Como o consumo de tempol mostrou-se dependente da concentração de tióis, poderíamos sugerir que o tempol estaria sendo consumido também por radicais de proteína-cisteinila. De fato, estudo de interação entre o nitróxido 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxila (tempo) com radicais tiila ($R-S^{\cdot}$) e sulfenila ($R-SO^{\cdot}$) mostraram que ocorrem reações de recombinação entre estes radicais [Carloni e col., 1995]. Portanto, é bastante provável que a principal reação de consumo de tempol esteja sendo a recombinação do nitróxido com radicais proteína-cys $^{\cdot}$ (eq. 18 - 19).

Outra via de inibição da nitrosação poderia ser reações envolvendo o cátion oxamônio. Este pode reagir com grande variedade de alvos, inclusive com radicais proteicos [Samuni e Barenholz, 2003] o que desfavoreceria sua reação com o peroxinitrito remanescente (eq. 4). Como consequência o tempo seria consumido e diminuiria o rendimento da nitrosação. De fato, os dados de consumo de tempol por EPR para a dBSA demonstraram que apenas 10% da

concentração inicial de tempol estava presente após adição de peroxinitrito, indicando assim que mais de 90% do tempol se engajou em outras reações produzindo espécies diamagnéticas.

Finalmente, a nitrosação poderia ser inibida pelo consumo do agente nitrosante. O N_2O_3 , além de sofrer hidrólise ($k = 1600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, Licht e col., 1988) reage com o fosfato inorgânico do tampão ($\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$) (eq. 20) com constante de velocidade de segunda ordem de $6,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [Lewis e col., 1995]. Como a concentração de fosfato utilizada nos experimentos foi pelo menos 100 vezes maior que a concentração de tióis proteicos, espera-se que em ausência ou em concentração menores de fosfato a nitrosação apresente um rendimento maior.

4.2 Efeitos do tempo sobre a interação de macrófagos em cultura com peroxinitrito/ CO_2

4.2.1 Produtos estáveis das proteínas de macrófagos

O estudo dos efeitos do tempol sobre a interação do peroxinitrito/ CO_2 com células em cultura foi realizada com macrófagos murinos da linhagem J774. Os macrófagos foram tratados em suspensão (10^7 células/ mL), após terem sido mantidos em presença de HCO_3^- (20 mM) e tempol (0 - 100 μM) por cerca de 5 minutos a fim de favorecer a entrada dos reagentes nas células. De fato, pudemos observar um aumento na concentração intracelular de tempol nos lisados de macrófagos tratados com concentrações crescentes de nitróxido por EPR (Figura 9). Após este período de equilíbrio as células foram tratadas com peroxinitrito (1 mM) e lavadas. As células foram submetidas a procedimento de imunocitoquímica ou foram lisadas e o extrato celular analisado por dot blot e quimiluminescência.

A análise da formação de proteínas nitradas indicou uma concentração de cerca de 45 μmol de nitrotirosina/mg de proteína nos extratos celulares de macrófagos tratados com peroxinitrito/ CO_2 , calculada a partir da revelação de um padrão de albumina nitrada e quantificado espectrofotometricamente (ver em Materiais e Métodos). O tempol inibiu a

Figura 9: Espectros de EPR de tempol intracelular obtidos em lisados de macrófagos J774 tratados com peroxinitrito/CO₂ em presença de diferentes concentrações de tempol. A suspensão de células (1×10^7 células/ mL) em PBS modificado contendo NaHCO₃ (20 mM) foi tratada com peroxinitrito (1 mM) em presença de diferentes concentrações de tempol. **(A)** lisado dos macrófagos tratados com peroxinitrito; **(B)** mesmo que (A) em presença de tempol (25 μ M); **(C)** mesmo que (A) em presença de tempol (50 μ M); **(D)** mesmo que (A) em presença de tempol (100 μ M). Condições experimentais: potência, 20 mW; constante de tempo 167 ms; ganho, $6,4 \times 10^4$, amplitude de modulação, 1 G.

formação de proteínas nitradas de forma dependente de sua concentração, inibindo em até 70% a nitração quando 100 μ M de tempol foi empregado (Figura 10). O mesmo efeito inibitório foi verificado por imunocitoquímica. A marcação pelo anticorpo anti-3-nitrotirosina nos macrófagos tratados com peroxinitrito/ CO_2 foi fortemente inibida quando o mesmo tratamento foi realizado em presença de tempol (100 μ M) (Figura 11, A - F).

Um dos efeitos do redirecionamento da reatividade do peroxinitrito pelo tempol é o aumento na concentração de oxigênio liberado e nitrito formado (ver reações 4 e 8) [Bonini e col., 2002]. A mesma tendência foi observada na concentração de nitrito determinada nos lisados de macrófagos tratados com peroxinitrito/ CO_2 em presença de tempol (Figura 12, barras fechadas).

A quantificação de proteínas nitrosadas por quimiluminescência nos extratos de macrófagos tratados com peroxinitrito/ CO_2 foi de c.a. 70 pmol de RSNO/mg de proteína. Este valor é sete vezes maior que a concentração basal de proteína nitrosada medida pela mesma técnica em macrófagos murinos RAW, de 10 pmol de RSNO/mg de proteína [Gow e col., 2002]. Como discutido para a nitrosação da albumina por peroxinitrito/ CO_2 , deve ocorrer formação de nitrosotiol independente da formação do agente nitrosante N_2O_3 (ver reações 14 – 16). A concentração de proteínas nitrosadas nos lisados de macrófagos tratados com peroxinitrito/ CO_2 em presença de tempol aumentou aproximadamente 270% e este efeito foi dependente da concentração do nitróxido (Figura 12, barras abertas). Ainda, por imunocitoquímica verificou-se também um expressivo aumento na marcação de proteínas nitrosadas (proteína-CysSNO) quando tratadas em presença de tempol (Figura 11, G - L).

4.2.2 Conclusões parciais

Os principais alvos celulares do peroxinitrito/ CO_2 são glutathione e resíduos de cisteína e tirosila de proteínas [Augusto e col., 2002c; Lopes de Menezes e Augusto, 2001]. Estes alvos são oxidados pelos radicais derivados do peroxinitrito a radicais glutathionila, proteína-cisteinila e proteína-tirosila; este último pode gerar proteínas nitradas (nitrotirosina) por recombinação com o radical $^*\text{NO}_2$. Em presença de tempol, conforme os objetivos deste trabalho, fomos

Figura 10: Quantificação de 3-nitrotirosina em lisados de macrófagos J774 tratados com peroxinitrito/ CO_2 em presença de diferentes concentrações de tempol. A suspensão de células (1×10^7 células/ mL) em PBS modificado contendo NaHCO_3 (20 mM) foi tratada com peroxinitrito (1 mM) em presença de diferentes concentrações de tempol. Após lise das células, os extratos protéicos foram submetidos à imunomarcação com anticorpo anti-nitrotirosina e os filmes revelados quantificados pelo programa ImageQuant®, conforme descrito em Materiais e Métodos. *Inserção.* Acima: marcação de proteínas na membrana de nitrocelulose com corante Ponceau, abaixo: revelação da membrana com anticorpo anti-nitrotirosina (notar diferentes concentrações de tempol).

Figura 11: Imunocitoquímica de macrófagos J774 tratados com peroxinitrito/ CO_2 em presença de tempol. As suspensões de células (1×10^6 células/ mL) em PBS modificado pH 7,4 contendo NaHCO_3 (20 mM) foram tratadas com peroxinitrito (1 mM) em ausência (A - C, G - I) e presença de tempol (100 μM) (D - F, J - L) e depois submetidas a imunocitoquímica com anticorpo anti-nitrotirosina ou anti-nitrosocisteína conforme procedimento descrito em Materiais e Métodos. Marcação do anticorpo anti-nitrotirosina (A e D); anti-nitrosocisteína (G e J), marcação nuclear com DAPI (B, E, H, K); sobreposição da marcação nuclear e do anticorpo primário específico (C, F, I, L).

Figura 12: Quantificação de nitrito e nitrosotiol em lisados de macrófagos J774 tratados com peroxinitrito/CO₂ em presença de diferentes concentrações de tempol. A suspensão de células (1×10^7 células/ mL) em PBS modificado contendo NaHCO₃ (20 mM) foi tratada com peroxinitrito (1 mM) em presença de diferentes concentrações de tempol (0 – 100 μM). O excesso de nitrito foi retirado lavando-se as células e os macrófagos foram lisados. Como controle da concentração de nitrito intracelular, as células foram tratadas com peroxinitrito decomposto (dPN) nas mesmas condições acima, em ausência de tempol. As concentrações de nitrito intracelular e nitrosotiol foram determinadas por quimiluminescência, conforme descrito em Materiais e Métodos. Experimento representativo de três experimentos independentes.

verificar se ocorreria um redirecionamento da reatividade do peroxinitrito, de nitração de tirosinas para nitrosação de cisteínas. Para isso, analisamos qualitativamente os efeitos do tempol na nitração e nitrosação por imunocitoquímica (com uso de anticorpos comerciais anti-3-nitrotirosina e anti-CysNO) e quantitativamente por quimiluminescência (quantificação de nitrosotiol) e dot blot com seqüente densitometria (quantificação de nitrotirosina).

Estes resultados, tomados em conjunto, demonstraram que o tempol modifica a reatividade do peroxinitrito de mecanismos de nitração para nitrosação, não apenas para proteínas (albumina), como para células em cultura (macrófagos). Assim, nossos resultados demonstram que o redirecionamento da reatividade do peroxinitrito pelo tempol pode também operar em ambientes biológicos, que apresentam inúmeros e diferentes alvos para o peroxinitrito e seus radicais derivados. Provavelmente por isso, o nítróximo não age cataliticamente como anteriormente demonstrado em sistemas químicos [Bonini e col., 2002; Carrol e col., 2000]. Apesar da menor eficiência demonstrada pelo tempol em sistemas biológicos, o nítróximo em baixas concentrações (10 % da concentração do oxidante) foi um eficiente inibidor dos danos causados pelos radicais derivados do peroxinitrito em proteína (BSA) e células. Estes resultados contribuem para o entendimento dos mecanismos protetores do tempol em modelos de inflamação, podendo-se adicionar à sua capacidade de mimetizar a atividade da enzima SOD, sua capacidade de seqüestrar radicais possivelmente gerados, além de formar adutos com radicais de biomoléculas, impedindo a propagação do dano.

Apesar de existirem fortes evidências, o peroxinitrito ainda não teve sua formação *in vivo* inequivocamente demonstrada. O uso de concentrações micromolares de tempol durante a ativação de macrófagos poderá contribuir para a elucidação desta questão. Macrófagos podem produzir $\cdot\text{NO}$ e $\text{O}_2^{\cdot-}$ concomitantemente pela indução da enzima $\cdot\text{NO}$ sintase indutível (por lipopolissacarídeo e interferon-gama) e montagem da enzima NADPH oxidase (por acetato de forbol-miristato). Utilizando-se tempol em concentrações da ordem de micromolar pode-se excluir a sua atividade mimética da SOD (Figura 3, via 1) pois a constante de velocidade entre o tempol e o radical superóxido é 10.000 vezes menor que a constante de velocidade entre a SOD e o superóxido (considerando-se $k_{\text{tempol}/\text{O}_2^{\cdot-}} \sim 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [Mitchell e col., 1990] e a concentração intracelular de SOD $\sim 10 \mu\text{M}$, tem-se que $d[\text{O}_2^{\cdot-}]/dt = [\text{O}_2^{\cdot-}](k_{\text{SOD}/\text{O}_2^{\cdot-}} \times [\text{SOD}] + k_{\text{tempol}/\text{O}_2^{\cdot-}} [\text{tempol}]) = [\text{O}_2^{\cdot-}](10 \times 10^{-6} \times 10^9 + 10^5 \times 10^{-6}) = [\text{O}_2^{\cdot-}](10^4 + 0,1)$). A partir da

comparação da nitração e nitrosação das proteínas dos macrófagos ativados em ausência e presença de tempol, poder-se-ia, eventualmente, inferir sobre a produção endógena de peroxinitrito.

Em modelos de inflamação, um dos efeitos protetores do tempol é a inibição da nitração de proteínas [Cuzzocrea e col., 2000, 2001a, b, c]. A nitração de resíduos de tirosina de proteínas é considerada um dano, pois trata-se de uma alteração irreversível da proteína que pode acarretar comprometimento da estrutura e perda de sua função. Apesar de recentemente sugerirem a existência de uma enzima “denitrase” [Yasuyuki e col., 2003], há muitos trabalhos que descrevem que proteínas nitradas são degradadas mais rapidamente que proteínas nativas por proteassomos [Grune e col., 1998; Souza e col., 2000]. Nestes modelos de inflamação, a formação de peroxinitrito é favorecida, pelas altas concentrações de óxido nítrico conseqüentes da inflamação induzida; portanto, em presença de tempol poderia ocorrer um aumento da concentração basal de proteínas nitrosadas. A nitrosação de proteínas vem sendo relacionada a vários eventos de sinalização, por se tratar de um processo reversível, dependente principalmente do estado redox do compartimento celular [Mannick e Schonhoff, 2002]. Portanto, existe a possibilidade do tempol estar interferindo em determinadas vias de sinalização, através da nitrosação de proteínas específicas (mais susceptíveis à nitrosação), favorecendo os mecanismos de defesa. Contribuindo para este raciocínio, nestes modelos experimentais de inflamação onde se usou tempol como eficiente protetor do dano, observou-se inibição da expressão de proteínas associadas ao recrutamento de polimorfonucleares ao sítio de inflamação [Cuzzocrea e col., 2000]. Em suma, como em células a nitração parece ser um processo irreversível enquanto a oxidação e a nitrosação de tióis são reversíveis, o tempol poderia, por esse mecanismo, inibir a injúria tissular em situações inflamatórias.

5. Conclusão Geral

Os resultados aqui apresentados demonstram que o tempol é um eficiente inibidor dos danos a proteínas causados por peroxinitrito em presença de $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$. Em consequência, a nitração de resíduos de tirosina e a oxidação de resíduos cisteína de proteínas, no caso estudado BSA e dBSA, são fortemente inibidos enquanto reações de nitrosação de cisteína são amplificadas (Figura 4). Em contraste com um alvo simples como fenol [Bonini e col., 2002], as proteínas são oxidadas pelos radicais derivados do peroxinitrito, $\text{CO}_3^{\cdot-}$ e $^{\cdot}\text{NO}_2$, a diferentes radicais proteicos, principalmente radicais proteína-cisteinila (Figura 6 e 7). Esses radicais proteína-cisteinila participam de reações que parecem favorecer uma nitrosação independente de N_2O_3 (eq. 14 - 16). Além disso, os radicais proteína-cisteinila podem ser os principais responsáveis pelo consumo do tempol a espécies que não regenerariam tempol por processos redox (eq. 18 - 19), diminuindo a eficiência do nitróxido como inibidor dos danos causados por peroxinitrito/ CO_2 . Mesmo assim, 100 μM tempol foi capaz de inibir em *c.a.* 80% e 20% a produção de nitro-tirosina e cisteína oxidada em dBSA, respectivamente, por cerca de 520 μM $\text{CO}_3^{\cdot-}$ e $^{\cdot}\text{NO}_2$ (260 μM de cada espécie, no máximo) (Figura 4).

Analogamente aos resultados obtidos com albumina, ao aumentarmos a complexidade do modelo de estudo para células em cultura, o mesmo efeito do tempol foi verificado. As células utilizadas foram macrófagos J774, que apresentaram uma expressiva inibição da nitração proteica (Figuras 10 e 11) e aumento da concentração de proteínas nitrosadas (Figuras 11 e 12) quando tratados com peroxinitrito/ CO_2 em presença de tempol. Estes resultados indicam que mesmo em ambientes celulares o tempol redireciona a reatividade do peroxinitrito de mecanismos de nitração para mecanismos de nitrosação. Portanto, em relação ao peroxinitrito, o tempol pode agir tanto na inibição de sua formação pela atividade mimética da SOD, no redirecionamento da reatividade do oxidante, como proposto inicialmente neste trabalho (Figura 3), e eventualmente, reagindo com os radicais derivados de biomoléculas. Em situações inflamatórias, onde a formação de peroxinitrito é favorecida, o tempol apresentaria efeitos benéficos pela inibição da nitração, uma modificação proteica irreversível, e pelo aumento de proteínas nitrosadas. Estas proteínas nitrosadas por sua vez, podem ser

denitrosadas dependendo de vários fatores não-enzimáticos: presença de concentrações de redutores celulares, diferenças de pH, presença de metais de transição ou de biotióis. Além da nitroação de proteínas ser uma modificação reversível (ao contrário da nitração), ela está relacionada a muitos eventos de sinalização [Mannick e Schonhoff, 2002], que podem estar envolvidos em última instância com os efeitos protetores que o tempol apresenta em diferentes modelos experimentais de inflamação [Cuzzocrea e col., 2000, 2001a, b, c].

Finalmente, estes resultados abrem a possibilidade do uso do tempol como marcador da formação de peroxinitrito em sistemas biológicos, contribuindo para a elucidação da formação ou não do oxidante *in vivo*. A análise de nitração e nitroação de proteínas em modelos de inflamação (ou que também apresentem os radicais precursores do peroxinitrito em concentrações elevadas) em presença de tempol (em baixas concentrações, para desfavorecer sua atividade SOD mimética) pode trazer importantes subsídios para responder esta questão.

6. Referências Bibliográficas

Alvarez, B., Ferrer-Sueta, G., Freeman, B. A., and Radi, R. (1999) Kinetics of peroxynitrite reaction with amino acids and human serum albumin. *J. Biol. Chem.*, 274, 842-848.

a. Augusto, O., Bonini, M. G., Amanso, A. M., Linares, E., Santos C. X. C. and De Menezes, S.L. (2002) Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology, *Free Radic. Biol. Med.* 32, 841-59.

b. Augusto, O., Bonini, M.G., Fernandes, D.C., Linares, E. and Santos, C. X. C. (2002) Peroxynitrite, CO₂ and free radicals. Aula virtual, Oxygen Society, endereço: <http://www.medicine.uiowa.edu/FRRB/VirtualSchool/Augusto-peroxynitrite-08-16-002.ppt>

c. Augusto, O., Lopes de Menezes, S., Linares, E., Romero, N., Radi, R. and Denicola, A. (2002) EPR Detection of Glutathyl and Hemoglobin-cysteiny radicals during the Interaction of Peroxynitrite with Human Erythrocytes, *Biochemistry*, 41(48),14323 - 14328.

Balazy, M., Kaminski, P. M., Mao, K., Tan, J. and Wolin, M. S. (1998) S-Nitroglutathione, a product of the reaction between peroxynitrite and glutathione that generates nitric oxide. *J.Biol Chem.* 273, 32009 - 32015.

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

Bonini, M., Mason, R. P., and Augusto, O. (2002) The Mechanism by which 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (Tempol) Diverts Peroxynitrite Decomposition from Nitration to Nitrosation Species. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 506 - 511.

Boveris, A. and Cadenas, E. (1982) Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria, em: *Superoxide Dismutases* (Oberley, L. W., ed.) Vol II, 15 – 30, CRC Press, Boca Raton, FL.

Britigan, B. E., Rosen, G. M., Thompson, B. Y., Chai, Y. and Cohen, M. S. (1986) Stimulated neutrophils limit iron-catalyzed hydroxyl radical formation as detected by spin trapping techniques. *J. Biol. Chem.* 261, 17026 – 17032.

Carloni, P., Damiani, E., Iacussi, M., Greci, L. and Stipa, P. (1995) Unexpected deoxygenation of 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (Tempo) by thyl radicals through the formation of arylsulphiny radicals. *Tetrahedron* 51, 12445 – 12452.

Carrol, R. T., Galatsis, P., Borosky, S., Kopec, K. K., Kumar, V., Althaus, J. S., and Hall, E. D. (2000) 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (Tempol) inhibits peroxynitrite-mediated phenol nitration. *Chem. Res. Tox.* 13, 294 - 300.

Chen, S. N., and Hoffman, M. Z. (1973) Rate constants for the reaction of the carbonate radical with compounds of biochemical interest in neutral aqueous solution. *Radiat. Res.* 56, 40 - 47.

a. Cuzzocrea, S., McDonald, M. C., Mazzon, E., Siriwardena, D., Constantino G., Fulia F., Cicinotta G., Gitto E., Cordaro S., Barbieri I., De Sarno A., Caputi, A. P., and Thiemermann, C. (2000) Effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a gerbil model of brain injury. *Brain Res.* 875, 96 – 106.

b. Cuzzocrea, S., McDonald, M. C., Mazzon, E., Siriwardena, D., Constantino, G., Fulia, F., Cicionotta, G., Gitto, E., Cordaro, S., Barbieri, I., Caputi, A. P., and Thiemermann, C. (2000) Effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model of carrageenan-induced pleurisy. *Eur. J. Pharmacol.* 390, 209 - 222.

c. Cuzzocrea, S., McDonald, M. C., Mazzon, E., Dugo, L., Lepore, V., Fonti, M. T., Terranova, M. L., Caputi, A. P., and Thiemermann, C. (2000) Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, reduces dinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Eur. J. Pharmacol.* 406, 127-137.

Cuzzocrea, S., McDonald, M. C., Mazzon, E., Filipe, H. M., Centorrino, T., Lepore, V., Terranova, M. L., Ciccolo, A., Caputi, A. P. and Thiemermann, C. (2001) Beneficial effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, on the multiple organ failure induced by zymosan in the rat. *Crit. Care Med.* 29, 102 – 111.

Dean, J. A. (1979) Lange's Handbook of Chemistry 12th edition, pp 5 –13, McGraw Hill Book Co., New York.

Denicola, A., Souza, J. M. and Radi, R. (1998) Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 3566 – 3571.

Feelisch, M., Rassaf, T., Mnaimneh, S., Singh, N., Bryan, N. S., Jourdain, D. and Kelm, M. (2002) Concomitant S-, N-, and heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo. *FASEB J.* 16, 1775 - 1785.

Finkel, T. and Holbrook, N. J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of aging. *Nature* 408, 239 - 247.

- Fridovich, I. (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 97 – 112.
- Gatti, R., Radi, R. and Augusto, O. (1994) Peroxynitrite-mediated oxidation of albumin to the protein-thiyl free radical, *FEBS Letters* 348, 287 - 290.
- Godber, B. L., Doel, J. J., Durgan, J., Eisenthal, R. and Harrison, R. (2000) A new route to peroxynitrite: a role for xanthine oxidoreductase. *FEBS Lett.* 475, 93 - 96.
- Goldstein, S., Samuni, A. and Russo, A. (2003) Reaction of cyclic nitroxides with nitrogen dioxide: the intermediacy of the oxoammonium cations. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 8364 – 8370.
- Gow, A. J., Chen, Q., Hess, D. T., Day, B. J., Ischiropoulos, H. and Stamler, J. S. (2002) Basal and stimulated protein S-nitrosylation in multiple cell types and tissues. *J. Biol. Chem.* 277 (12), 9637 – 9640.
- Grune, T., Blasig, I. E., Sitte, N., Roloff, B., Haseloff, R. and Davies, K. J. (1998) Peroxynitrite increases the degradation of aconitase and other cellular proteins by proteasome. *J. Biol. Chem.* 273, 10857 – 10862.
- Ignarro, L. J. (1990) Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30, 535 – 560.
- Ignarro, L. J. (2002) Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J. Physiol. Pharm.* 53, 503 – 514.
- Kaur, H., Leung, K. H. W., and Perkins, M. J. (1981) A water soluble nitroso-aromatic spin-trap. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 142 – 143.
- Kaur, H. (1996) A water soluble C-nitroso-aromatic spin-trap 3,5-dibromo-4-nitrosobenzenesulphonic acid. "The Perkins Spin-Trap" *Free. Rad. Res.* 24, 409 – 420.
- Khairutdinov, R. F., Coddington, J. W. and Hurst, J. K. (2000) Permeation of phospholipid membranes by peroxynitrite. *Biochemistry* 39, 14238 – 14249.
- Klatt, P., and Lamas, S. (2000) Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur. J. Biochem.* 267, 1 - 18.

- Koppenol, W. H., Kissler, R., and Beckman, J. S. (1996) Synthesis of peroxynitrite: to go with the flow or on solid grounds? *Methods Enz.* 269, 296 – 302.
- Korshunov, S. S., Skulachev, V. P., and Starkov, A. A. (1997) High protonic potential mechanisms of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.* 416, 15 – 18.
- Licht, W. R., Tannenbaum, S. R., and Deen, W. M. (1988) *Carcinogenesis* 9, 365 – 372.
- Lipton, S. A., Choi, Y. B., Pan, Z. H., Lei, S. Z., Chen, H. S., Sucher, N. J., Loscalzo, J., Singel, D. J., Stamler, J. S. (1993) A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364, 626 - 632.
- Lopes de Menezes, S. and Augusto, O. (2001) EPR detection of glutathionyl and protein-tyrosyl radicals during the interaction of peroxynitrite with macrophages (J774). *J. Biol. Chem.* 276, 39879 – 39884.
- Lyman, S. V and Hurst, J. K. (1996) Carbon dioxide: physiological catalyst for peroxynitrite-mediated cellular damage or protectant? *Chem. Res. Tox.* 9, 845 – 850.
- Mannick, J. B., Hausladen, A., Liu, L., Hess, D. T., Zeng M., Miao, Q. X., Kane, L. S., Gow, A. J., Stamler, J. S. (1999) Fas-induced caspase denitrosylation. *Science* 284, 651 - 654.
- Mannick, J. B. and Schonhoff, C. M. (2002) Nitrosylation: the next phosphorylation? *Arch. Biochem. Biophys.* 408, 1 – 6.
- Marla, S. S., Lee, J. and Groves, J. T. (1997) Peroxynitrite rapidly permeates phospholipid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 14243 – 14248.
- McCord, J. M., Keele, B. B. Jr., and Fridovich, I. (1971) An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: The physiological function of superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 1024 – 1027.
- Michelson, A. M., Puget, K., Durosay, P. and Bonneau, J. C. (1977) Clinical aspects of the dosage of erythrocyte, in: *Superoxide and Superoxide Dismutase* (Michelson A. M., McCord J. M. and Fridovich I., eds), 467 – 499, Academic Press, London.
- Millar, T. M., Kanczer, J. M., Bodamyali, T., Blake, D. R. and Stevens, C. R. (2002) Xanthine oxidase is a peroxynitrite synthase: newly identified roles for a very old enzyme. *Redox Rep.* 7, 1 - 6.

Mitchell, J. B., Samuni, A., Krishna, M. C., DeGraff, W. G., Ahn, M. S., Samuni, U., and Russo, A (1990) Biologically active metal-independent superoxide dismutase mimics. *Biochemistry* 38, 2078 – 2087.

Moncada, S., Palmer, R. M. and Higgs, E. A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43, 109 – 142.

Nelson, E. J., Connolly, J., McArthur, P. (2003) Nitric oxide and S-nitrosylation: excitotoxic and cell signaling mechanism. *Biol. Cell* 95 (1), 3 - 8.

Offer, T., Russo, A., and Samuni, A. (2000) The pro-oxidative activity of SOD and nitroxide SOD mimics. *FASEB J.* 14, 1215 - 1223.

Patterson, M. K. Jr. (1979) Measurement of growth and viability of cells in culture. *Methods Enzymol.* 58, 141 – 152.

Peters, T. (1985) Serum Albumin. *Adv. Prot. Chem.* 37, 161 – 245.

Pietraforte, D. and Minetti, M. (1997) One-electron oxidation pathway of peroxynitrite decomposition in human blood plasma: evidence for the formation of protein-tryptophan-centered radicals. *Biochem. J.* 321, 743 – 750.

Prutz, W. A., Monig, H., Butler, J., and Land, E. J. (1985) Reactions of nitrogen dioxide in aqueous model systems: oxidation of tyrosine units in peptides and proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 243, 125 - 134.

Quijano, C., Alvarez, B., Gatti, R. M., Augusto, O., and Radi, R. (1997) Pathways of peroxynitrite oxidation of thiol groups. *Biochem. J.* 322, 167-173.

Radi, R., Denicola, A., Alvarez, B., Ferrer-Sueta, G. and Rubbo, H. (2000) The biological chemistry of peroxynitrite, em: *Nitric Oxide* (Ignarro L. J., ed.), 57 – 82., Academic Press, New York.

Ralph, P. and Nakoinz, I. (1975) Phagocytosis and cytolysis by a macrophage tumour and its cloned cell line. *Nature* 257, 393 – 394.

Samuni, A. M., and Barenholz, Y. (2003) Site-activity relationship of nitroxide radical's antioxidative effect. *Free Radic. Biol. Med.* 34, 177 – 185.

Santos, C. X. C., Bonini, M.G., and Augusto, O. (2000) Role of the carbonate radical anion in tyrosine nitration and hydroxylation by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* 377, 146 – 152.

Schrammel, A., Gorren, A. C., Schmidt, K., Pfeiffer, S. and Mayer, B. (2003) S-nitrosation of glutathione by nitric oxide, peroxynitrite, and (*)NO/O(2)(*⁻). *Free Radic. Biol. Med.* 34, 1078 - 1088.

Sharma, V. S., Traylor, T. G., Gardiner, R. and Mizukami, H. (1987) Reaction of nitric oxide with heme proteins and model compounds of hemoglobin. *Biochemistry* 26, 3837 – 3843.

Silvester, J. A., Timmins, G. S., and Davies, M. J. (1998) Protein hydroperoxides and carbonyl groups generated by porphyrin-induced photo-oxidation of bovine serum albumin. *Arch. Biochem. Biophys.* 350, 249 - 258.

Simon, D. I., Mullins, M. E., Jia, L., Gaston, B., Singel, D. J., and Stamler, J. (1996) Polynitrosylated proteins: Characterization, bioactivity, and functional consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 4736 – 3741.

Singh, R. J., Hogg, N., and Kalyanamaram, B. (1996) Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols. *J. Biol. Chem.* 271, 18596 – 18603.

Sobek, J., Martschke, R., and Fischer, H. (2001) Entropy control of the cross-reaction between carbon-centered and nitroxide. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 2849 – 2857.

Souza, J. M., Choi, I., Chen, Q., Weisse, M., Daikhin, E., Yudkoff, M., Obin, M., Ara, J., Horwitz, J. and Ischiropoulos, H. (2000) Proteolytic degradation of tyrosine nitrated proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 380, 360 - 366.

St-Pierre, J., Buckingham, J. A., Roebuck, S., and Brand, M. D. (2002) Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J. Biol. Chem.* 277, 44787 – 44790.

Stamler, J. S. (1994) Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 78, 931 - 936.

Subczynski, W., Lomnicka, M. and Hyde, J. S. (1996) Permeability of nitric oxide through lipid membranes. *Free Radical Res.* 24, 343 – 349.

Suzaki, E., Kawai, E., Kodama, Y., Suzaki, T. and Masujima, T. (1994) Quantitative analysis of superoxide anion generation in living cells by using chemiluminescence video microscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1201, 328 – 332.

Wright, P. J. and English, A. M. (2003) Scavenging with Tempo* to identify peptide- and protein-based radicals by mass spectrometry: advantages of spin scavenging over spin trapping. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 8655 – 8665.

Xia, Y., Dawson, V. L., Dawson, T. M., Snyder, S. H. and Zweier, J. L. (1996) Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 6770 – 6774.

Xia, Y. and Zweier, J. L. (1997) Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 6954 – 6958.

Yasuyuki, I., Saeki, M., Kamisaki, Y., Martín, E. and Murad, F. (2003) Histone H1.2 is a substrate for denitrase, an activity that reduces nitrotyrosine immunoreactivity in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 5634 – 5639.