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

DOUGLAS GANINI DA SILVA

**Mecanismo de oxidação aeróbica de acetoacetato e
2-metilacetoacetato catalisada por mioglobina:
implicações em desordens cetogênicas**

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

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
02/03/2011

DOUGLAS GANINI DA SILVA

**Mecanismo de oxidação aeróbica de acetoacetato e
2-metilacetoacetato catalisada por mioglobina:
implicações em desordens cetogênicas**

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

Orientador: Prof. Dr. Etelvino José Henriques Bechara

São Paulo
2011

Dedico esta tese aos meus pais e irmã,
a quem agradeço todo apoio e carinho.

Primeiros passos, Picasso (1943)
Início do cubismo para Picasso, retratando o início da jornada da vida pelo primeiro passo, ainda que sob apoio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

Aos meus pais, a quem devo a minha vida e quase tudo do que sou. Sempre agradecerei por resplandecerem e cultivarem o amor em mim e por mim, quando me suportam e aceitam as minhas escolhas por mais diferentes e pouco compreensivas que elas possam parecer a luz de suas realidades;

À minha irmã Déborah, pelo suporte e amor sempre incondicionais;

À minha família, em especial a minha tia Teresa, e meus padrinhos Sandra e Luiz, por me mostrarem o quanto a vida em família, e seu amor fraternal, só nos tem a acrescentar;

Ao meu orientador professor Dr Etelvino Bechara, pela confiança, convivência, alegria, oportunidades e história de vida, que nos impulsiona a ter ambições através do trabalho, a pensar criticamente para compreendermos o mundo numa busca necessária de contribuição social/científica, e a admirarmos as pessoas, valorizando-as enquanto indivíduos e coletividade, sempre olhando para a família;

À Adriana Wendel, que sempre proveu suporte imediato e experiente, e ainda mais, por termos compartilhado uma forte amizade regada de constantes conselhos inteligentes e por vezes inusitados, contribuindo assim para minha vida pessoal e científica;

À Dóris, que sempre com seus sorrisos e calma constantes, dotada de uma afetividade materna e benevolente, nos ajuda, se preocupa, e se põe disposta a aprender, ajudar e conviver;

Aos colegas de laboratório Adriana, Camila, Vanessa, Fernando, Aninha, Mariana, Rafael, e em especial ao Adriano, Rita, Chrislaine, Júlio, Nilson e Camila Mano pela convivência em momentos de discussões científicas até bate-papos informais, todos necessários à prática científica;

Aos colegas do bloco 10 Superior, alunos e professores pelo convívio amistoso entre vizinhos, bem como sua amizade e respeito;

À Cristina que mantém limpos e organizados os lugares que sempre sujamos;

Ao Dr Ronald Mason do NIEHS (Durham, NC, USA) pela orientação sagaz e assertiva durante estágio sanduíche, dando-me plena liberdade de uso de todos os recursos dos laboratórios;

Aos colegas daquele laboratório Dr Saurabh Chatterjee, Dra Kalina Ranguelova, Dra Fiona Summers, Dra Suchandra Bhattacharjee, Dr Olivier Lardinois, Dr Baozhong Zhao, Dra Marylin Ehrenshaft, Dr JinJie Jang, Dr Fabian Leinisch, e em especial a Dra Maria Kadiiska, Dr Marcelo Bonini, Dr Kriztian Stadler e Jean Corbett pelo carinho e ajuda constante na vida de um jovem cientista em formação em um imenso laboratório, bem como na vida cotidiana no exterior;

Aos membros do laboratório e a professora Dra Mari Cleide Sogayar, em especial ao Erik Halcsik, Marluci Mantovani e Maria Fernanda Forni pela atenção e suporte em todos os momentos;

Ao meu sempre orientador Dr Marcelo Paes de Barros, por ter me ensinado a essência de como ser um cientista, bem como ter me indicado este novo horizonte, sempre me apoiando;

Aos funcionários do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP pelo suporte e cuidado com os animais durante os experimentos;

Aos funcionários do Instituto de Química da USP, das Seções de Manutenção, Protocolo, Xerox, e ao Décio, técnico do professor Dr. Mario José Politi, e ao Márcio, funcionário da Central Analítica;

Aos funcionários da Biblioteca do Conjunto das Químicas;

Às secretarias de pós-graduação, e do Departamento de Bioquímica, e seus funcionários, em especial ao Marcelo, Emiliano e Milton;

À pós-graduação do Instituto de Química da USP, em especial ao Departamento de Bioquímica, e todo o corpo docente;

Ao P, Sandrinha, Marcinha, Germano, Roseli, Mara, Gabriel, Juliene, Willy e Alexandre, pelo amor da amizade e convívio rotineiro sempre compreensivo e suportivo;

Mais uma vez, a Márcia dos Santos, pela amizade e compreensão sempre pacíficas e plenas nestes 7 anos que nos conhecemos e convivemos;

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) de Processos Redox em Biomedicina (Redoxoma), pelo apoio financeiro e reuniões científicas extremamente produtivas e interessantes; e

Ao CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro, através de bolsas e projetos universais e temáticos ao meu orientador.

“Human knowledge is power, Mama. The only limits are in our minds. He said there was nothing that a computer couldn’t do, even the most complicated problems, find the value of pi, the root of all languages, the most distant stars. It was crazy how small the world was. It was a matter of opening up to it”.

Claire sobre Joshua em *Let the Great World Spin*
(Colum McCann)

“The rigors of this intellectual training gradually turned him into someone else. He learned how to look at himself from a distance, to see himself first of all as a man among other men, then as a collection of random particles of matter, and finally as a single speck of dust – and the farther he traveled from his point of origin, she said, the closer he came to achieving greatness”.

Alva sobre Hector Mann em *The Book of Ilusions*
(Paul Auster)

“Toda compreensão súbita é finalmente a revelação de uma aguda incompreensão. Todo momento de achar é um perder-se a si próprio. Talvez me tenha acontecido uma compreensão tão total quanto uma ignorância, e dela eu venha a sair intocada e inocente como antes. Qualquer entender meu nunca estará à altura dessa compreensão, pois viver é somente a altura a que posso chegar – meu único nível é viver”.

“Viver não é coragem, saber que se vive é coragem”.

“Será preciso coragem para fazer o que vou fazer: dizer. E me arriscar à enorme surpresa que sentirei com a pobreza da coisa dita”.

G.H. sobre ela mesma, talvez Clarice, em *A Paixão Segundo G.H.* (Clarice Lispector)

RESUMO

Ganini, Douglas. Mecanismo de oxidação aeróbica de acetoacetato e 2-metilacetoacetato catalisada por mioglobina: implicações em desordens cetogênicas. 2011. 238p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Acetoacetato (AA) e 2-metilacetoacetato (MAA) são compostos β -cetoácidos acumulados em diversas desordens metabólicas como no diabetes e na isoleucinemia, respectivamente. Examinamos o mecanismo de oxidação aeróbica de AA e MAA iniciada por intermediários reativos de mioglobina de coração de cavalo (Mb) gerados pela adição de H_2O_2 . Uma rota quimioluminescente que envolve um intermediário dioxetânico cuja termólise gera espécies α -dicarbonílicas (metilglioxal e biacetilo) foi proposta e estudada.

Emissão de luz ultra fraca acompanha a reação, e sua intensidade aumenta linearmente pelo aumento da concentração tanto de Mb (10-500 μM) quando AA (10-100 mM). Estudos de consumo de oxigênio mostraram que MAA é, como esperado, quase uma ordem de grandeza mais reativo que AA. Estudos de EPR com captação de spin, utilizando MNP, possibilitaram detectar adutos de MAA atribuíveis a um radical centrado no $\text{C}\alpha$ ($a_N = 1.55$ mT) e ao radical acetila ($a_N = 0.83$ mT). O sinal do radical acetila é totalmente suprimido por sorbato, um conhecido e eficiente supressor de espécies tripletes, o que é consistente com uma rota reacional envolvendo um intermediário dioxetânico.

Clivagem- α da ligação carbonila-carbonila do produto biacetilo triplet produziria, de fato, radicais acetila. Além disso, utilizando AA como substrato para Mb/ H_2O_2 , um sinal de EPR atribuível ao aduto MNP-AA $\cdot$ ($a_N = 1.46$ mT e $a_H = 0.34$ mT) foi observado e confirmado por efeito isotópico.

O consumo de oxigênio e o rendimento de compostos α -dicarbonílicos foram dose-dependentes à concentração de AA ou MAA (1-50 mM) bem como à concentração de H_2O_2 adicionado às misturas de reação contendo Mb (até 1:10 quando medido o consumo de oxigênio, e até 1:25 quando medido o rendimento de compostos α -dicarbonílicos) e *tert*-butilhidroperóxido (até 1:200). Os perfis de pH (5,8-7,8) para consumo de oxigênio e rendimento de compostos α -dicarbonílicos

mostraram maiores rendimentos para baixos valores de pH, indicativo de ferrilMb formada no ciclo peroxidático da proteína.

Avaliando os níveis de lesão de Mb, os β -cetoácidos diminuíram o nível de desorganização protéica na estrutura secundária e terciária elicitada por H_2O_2 . Ainda, houve maior preservação da estrutura primária da proteína, sendo que MAA protegeu mais em comparação a AA, embora quando utilizado este último composto, foi mostrado que há acetilação dose-dependente de Mb. Acetoacetato aumentou a velocidade de descoramento da hemeproteína, provavelmente por ataque de espécies tripletes geradas no sistema.

Músculos de rato, plantar e sóleo, expostos *ex vivo* a concentrações citotóxicas de glicose oxidase (GOX, gera H_2O_2 em fluxo), foram protegidas pelos ésteres etílicos AAE e MAAE. Foi detectado biacetilo no meio intracelular em músculos expostos a MAAE e GOX. A concentração deste composto α -dicarbonílico é claramente relacionada à abundância de Mb em cada um dos tipos de músculos estudados.

Em resumo, Mb tratada com metabólitos β -cetoácidos (AA e MAA) gera radicais centrados em carbono e produtos α -dicarbonílicos altamente reativos no estado triplete. Experimentos realizados com tecido muscular *ex vivo* sugerem que esta reação possivelmente ocorra *in vivo*. Levantamos a hipótese de que a geração de espécies carbonílicas reativas e seus adutos em condições de desbalanço metabólico possam contribuir para a compreensão das bases moleculares de desordens cetogênicas.

Palavras-chave: Acetoacetato, 2-metilacetoacetato, mioglobina, radicais livres, espécies carbonílicas tripletes, metilglioxal, biacetilo, cetose.

ABSTRACT

Ganini, Douglas. Mechanism of the aerobic oxidation of acetoacetate and 2-methylacetoacetate catalyzed by Mb: implications for ketogenic disorders. 2011. 238p. PhD Thesis - Graduate Program in Science (Biochemistry). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Acetoacetate (AA) and 2-methylacetoacetate (MAA) are β -ketoacids accumulated in several metabolic disorders such as diabetes and isoleucinemia, respectively. Here we examine the mechanism of AA and MAA aerobic oxidation initiated by the reactive enzyme intermediates formed by the reaction of muscle horse myoglobin (Mb) with H_2O_2 . A chemiluminescent route involving a dioxetane intermediate whose thermolysis yields triplet α -dicarbonyl species (methylglyoxal and diacetyl) is envisaged.

Accordingly, the ultraweak light emission that accompanies the reaction increases linearly by raising the concentration of both Mb (10-500 μM) and AA (10-100 mM). Oxygen uptake studies revealed that MAA is, expectedly, almost one order of magnitude more reactive than AA. EPR spin-trapping studies with MNP detected spin adducts from MAA attributable to an α -carbon-centered radical ($a_N = 1.55$ mT) and to an acetyl radical ($a_N = 0.83$ mT). As the acetyl radical signal is totally suppressed by sorbate, a well-known efficient triplet species quencher, the dioxetane hypothesis seems to be reliable. The α -cleavage of the carbonyl-carbonyl bond of a putative excited triplet diacetyl product would, in fact, leads to an acetyl radical. Furthermore, using AA as substrate for Mb/ H_2O_2 , an EPR signal assignable to a MNP-AA $\cdot$ adduct ($a_N = 1.46$ mT and $a_H = 0.34$ mT) was observed and confirmed by isotope effect.

Oxygen consumption and α -dicarbonyl yield were also dependent on AA or MAA concentrations (1-50 mM) as well as on the concentration of peroxide added to the Mb-containing reaction mixtures: H_2O_2 (up to 1:10 when measuring oxygen uptake and up to 1:25 when measuring the α -dicarbonyl yield) and *t*-butOOH (up to 1:200). The pH profiles (5.8-7.8) of oxygen consumption and α -dicarbonyl yield show higher reaction rates at lower pHs, indicative of a ferrylMb intermediate.

Evaluating Mb lesion, both β -ketoacids reduced disorganization of the secondary and tertiary protein structure elicited by H_2O_2 . Therefore, Mb primary structure was more preserved, and MAA was more protective than AA. Moreover using the later compound, it was shown that Mb acetylation is dose-dependent. Acetoacetate increased the rate of the hemeprotein bleaching, probably due to the attack of triplet products generated in the system.

Plantaris and soleous rat muscles exposed to damaging concentrations of glucose oxidase (GOX, generates H_2O_2 in flux), was cytoprotected by AAE and MAAE. Intracellular diacetyl was detected in muscle samples exposed to MAAE and GOX. The α -dicarbonyl concentration is clearly related to the Mb abundance in the muscle types.

In summary, Mb treated with peroxides reacts with β -ketoacid metabolites (AA and MAA), yielding carbon-centered radicals and highly reactive α -dicarbonyl products in the triplet state. Experiments carried out *ex vivo* with muscle tissue showed that this reaction possibly occurs *in vivo*. A new route for generation and accumulation of carbonyl reactive species and adducts is here proposed to occur in unbalanced metabolic situations, such as is the case of ketogenic disorders.

Keywords: Acetoacetate, 2-methylacetoacetate, myoglobin, free radicals, triplet carbonyls, methylglyoxal, diacetyl, ketosis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA: acetoacetato

AAE: acetoacetato de etila

AGEs: *advanced glycation end products*, ou produtos de glicação avançada.

ALT: alanina aminotransferase (EC 2.6.1.2)

AST: aspartato aminotransferase (EC 2.6.1.1)

BAEOC: *bovine aortic endothelial cells*, ou células endoteliais de aorta bovina

BUN: *blood urea nitrogen*, ou compostos nitrogenados no sangue

CAT: catalase (EC 1.11.1.6)

CK: creatina quinase (EC 2.7.3.2)

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CREA: creatinina

DBAS: ânion 9,10-dibromoantraceno-2-sulfonado

DBNBS: ácido 3,5-dibromo-4-nitrosobenzenossulfônico

DCF/ DCFH₂: 2',7'-diclorofluoresceína oxidada/reduzida

DEAE-cellulose: dietilaminoetil-celulose

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, ou meio de Dulbecco modificado por Eagle

DMPO: 5,5-dimetil-1-pirrolina N-óxido

DMSO: dimetil sulfóxido

DTT: ditioneitol

ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*, ou ensaio imunosorbente ligado a enzima

EPR: *electron paramagnetic resonance*, ou ressonância paramagnética eletrônica

Eos Y: eosina Y

Fosf Alk: fosfatase alcalina (EC 3.1.3.1)

FOX: *ferrous ions oxidation in the presence of xylenol orange*, ou oxidação de íons ferroso na presença de laranja de xilenol

GLOI: glioxalase 1 (EC 4.4.1.5)

GOX: glicose oxidase (EC 1.1.3.4)

GSH: glutationa reduzida

Hb: hemoglobina

HNE: 4-hidroxinonenal

HPLC: *high performance liquid chromatography*, ou cromatografia líquida de alta performance

HRP: *horseradish peroxidase*, ou peroxidase de raiz forte (EC 1.11.1.7)

IBAL: isobutanal ou isobutiraldeído

LDH: lactato desidrogenase (EC 1.1.1.27)

LDL: *low density lipoprotein*, ou lipoproteína de baixa densidade

LPS: lipopolissacarídeos

MAA: ânion 2-metilacetoacetato

MAAE: 3-metilacetoacetato de etila

Mb: mioglobina

MDA: malondialdeído

MES: ácido 2-(*N*-morfolino)etanossulfônico

metaMb: mioglobina Fe^{III}

Mm: músculo

MNP: 2-metil-2-nitrosopropano

MOPS: ácido 3-(*N*-morfolino)propanossulfônico

MTT: 1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazana

NBT: *nitrotetrazolium blue*, ou azul de nitrotetrazólio

OD: *optic density*, ou densidade óptica

OPD: *o*-fenilenodiamino

oxiMb: mioglobina Fe^{II}

PBS: *phosphate buffered saline*, ou solução salina tamponada com sais de fosfato

PBS-T: PBS adicionado de Tween 20 (0,1%, V/V)

PDA: *photodiode array*, ou arranjo de diodo

PKC: proteína quinase C (EC 2.7.11.13)

PUFA: *polyunsaturated fatty acids*, ou ácidos graxos poliinsaturados

RMN: ressonância magnética nuclear

SDS : *sodium dodecylsulfate*, ou dodecilsulfato de sódio

SDS-PAGE : *SDS-polyacrilamide gel eletrophoresis*, ou eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS

SFB : soro fetal bovino

SOD: superóxido dismutase (EC 1.15.1.1)

TBS: *Tris buffered saline*, ou solução salina tamponado com sais de Tris

TBS-T: TBS adicionado de Tween 20 (0,1%, V/V)

TEMPOL: 4-hidróxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxila

TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

TRIS: Tris(hidróximetil)aminometano

VLDL: *very low density lipoprotein*, ou lipoproteína de muito baixa densidade

XO: *xlenol orange*, ou laranja de xilenol

SUMÁRIO

1. Introdução.....	18
1.1. Acetoacetato: estresse carbonílico e implicações biológicas.....	18
1.2. Acetoacetato como carboidrato, fonte combustível, a células.....	24
1.3. Hemeproteínas e atividade peroxidásica.....	28
1.4. Modificações protéicas em Mb como proteína alvo de radicais.....	37
1.5. Atividade peroxidásica de hemeproteínas com geração de produtos carbonílicos tripletes – quimioluminescência ultra-fraca.....	40
2. Objetivos gerais.....	44
3. Materiais e métodos.....	46
3.1. Reagentes.....	46
3.1.1. Preparação da solução estoque de Mb.....	46
3.1.2. Soluções de compostos β -cetoácidos e β -cetoésteres.....	46
3.1.3. Preparação dos sais de AA e MAA.....	47
3.2. Espectros de absorção UV/Vis das hemeproteínas: determinação do conteúdo de ferrilMb e quantidade relativa de oxi/ metaMb.....	47
3.3. Determinação de radical protéico em amostras de Mb através da reação com o <i>spin trap</i> DNBBS, seguido da separação proteína/proteína- <i>spin trap</i> por eletroforese em gel não-desnaturante.....	48
3.4. Consumo de H_2O_2	49
3.5. Consumo de AA.....	50
3.6. Medidas de quimioluminescência.....	51
3.7. Avaliação do consumo de oxigênio.....	51
3.8. Análise de produtos α -dicarbonílicos.....	51

3.9. Eletroforese em gel (SDS-PAGE) e <i>blotting</i> de amostras de Mb <i>in vitro</i>	54
3.10. <i>Western blotings</i>	56
3.11. Ensaio de ligação do Coomassie Blue à proteína.....	57
3.12. Determinação de clivagem da hemeproteína utilizando-se o derivatizante fluorescamina.....	58
3.13. Fluorescência direta de Mb modificada por oxidação.....	58
3.14. Determinação do descoramento da Mb: destruição de heme extraível.....	59
3.15. Ensaio de ELISA.....	59
3.15.1. ELISA sanduíche para acetil-Mb.....	59
3.15.2. ELISA direto para nitrona DMPO-Mb, técnica de <i>immuno spin-trapping</i>	60
3.16. Determinação da temperatura de desnaturação de Mb.....	61
3.17. Espectrofotometria de dicroísmo circular (CD).....	62
3.18. EPR e simulação de espectros.....	62
3.19. Animais e Código de Ética para Experimentação Animal.....	63
3.20. Modelo-animal de indução a rabdomiólise.....	64
3.21. Sacrifício, coleta de órgãos e determinações bioquímicas.....	64
3.22. Cultura de células C2C12.....	65
3.23. Tratamento das células C2C12 com os compostos β -cetoésteres e estudo da toxicidade destes compostos.....	66
3.24. Quantificação de Mb pela concentração de apoproteína e atividade peroxidásica em extratos de células.....	67
3.25. Sacrifício e retirada cirúrgica dos músculos sóleo e plantar.....	69

3.26. Cultura do tecido muscular e determinações bioquímicas.....	70
3.27. Eletroforese em gel de proteínas do meio de cultura.....	70
4. Resultados e Discussão.....	72
4.1. Atividade peroxidásica de HRP e Mb sobre compostos β -cetoésteres e β -cetoácidos na presença de H_2O_2 em meio aerado. Alterações espectrais e estudos do papel dos radicais protéicos de Mb.....	72
4.2. Cinética do consumo de H_2O_2 e AA pelo sistema AA/Mb.....	82
4.3. Cinética do consumo de oxigênio pelos sistema β -cetoácido/Mb/ H_2O_2	85
4.4. Análise de produtos da oxidação aeróbica de β -cetoácidos catalisada por Mb/ H_2O_2	91
4.5. Perfil de pH da oxidação aeróbica de MAA catalisada por Mb/ H_2O_2	98
4.6. Quimioluminescência ultrafraca direta e sensibilizada por eosina do sistema AA/Mb/ H_2O_2	99
4.7. Estudos via eletroforese e espectroscopia CD de danos estruturais à Mb exposta a β -cetoácidos e H_2O_2 ou glicose/GOX.....	102
4.8. Estudos do sistema Mb/ β -cetoácido/ H_2O_2 (adição <i>in bolus</i> ou geração em fluxo pelo sistema glicose/GOX) por espectroscopia CD no UV distante, UV próximo e banda <i>Soret</i>	113
4.9. Análise dos radicais intermediários da oxidação de AA e MAA catalisada por Mb/ H_2O_2	120
4.10. Estudos <i>in vivo</i> de indução de rabdomiólise pela administração de AAE e MAAE a ratos.....	129

4.11. Estudos-modelo de citotoxicidade de ferrilMb com culturas de células, e cultura muscular <i>ex vivo</i> , ambos induzidos ou agravados por β -cetoácidos.....	139
5. Conclusões.....	155
6. Referências Bibliográficas.....	165
LISTA DE ANEXOS.....	191

1. Introdução

1.1. Acetoacetato: estresse carbonílico e implicações biológicas

O acetoacetato (AA), um β -cetoácido, está presente no plasma sanguíneo de indivíduos normais em concentração inferior a 0,5 mM [1], como produto do catabolismo de ácidos graxos, açúcares e aminoácidos. Sua concentração pode elevar-se até 20 vezes (6-10 mM) durante a cetogênese diabética, quando também se acumulam outros corpos cetônicos como o β -hidróxibutirato e a acetona. A cetogênese é intensa em várias patologias e quadros metabólicos como diabetes *mellitus* tipo I e II [2, 3, 4, 5, 6, 7], exercício físico extenuante [8] e dietas cetogênicas, como a popular dieta de Atkins [9, 10, 11]. Já o 2-metilacetoacetato (MAA) acumula-se em desordens do catabolismo da isoleucina onde há deficiência da enzima 2-metilacetoacetyl-CoA tiolase [12], a qual catalisa o último passo da degradação oxidativa deste aminoácido a propionilCoA e acetylCoA.

Estudos com hepatócitos, obtidos de culturas primárias de fígado de rato revelaram que AA, ao contrário de β -hidróxibutirato, era capaz de induzir estresse oxidativo. Nestas células expostas a 5 mM de AA, verificou-se aumento da geração do composto fluorescente dicloro-fluoresceína (DCF) — proveniente da oxidação do análogo reduzido, não-fluorescente, DCFH₂-diacetato —, e depleção de glutathione reduzida (GSH), bem como a restauração dos níveis de GSH quando as células eram expostas ao antioxidante tiólico *N*-acetyl-L-cisteína. Nestas células há ativação das quinases PKC (proteína quinase C) e *Ras*, sendo que esta última é reconhecidamente mediadora de sinalização celular para estresse oxidativo e estado redox [13].

Acredita-se que a resistência hepática [14] e renal [15] à insulina seja uma consequência da depleção de GSH [14] e aumento da lipoperoxidação em pacientes diabéticos [13]. Deste modo, durante a cetogênese, em que se verifica um aumento dos níveis de AA plasmático, como resultado da depleção de GSH, e aumento da lipoperoxidação das células do tecido hepático, há resistência do fígado à ação da insulina, que agravaria o quadro de cetogênese [14].

Estudos revelaram que diabéticos tipo I, que apresentam elevada cetogênese, apresentam uma alta incidência de nefropatias [15]. Outras complicações como a retinopatia diabética e o comprometimento da micro- e macro-circulação, em geral, têm sido relatadas como consequência do estresse carbonílico sofrido por estes pacientes, nos quais a cetogênese é mais elevada que no diabetes tipo II [15, 16].

O estresse carbonílico é definido como o acúmulo de compostos e adutos carbonílicos nos tecidos e fluidos [17, 18, 19, 20]. Tais adutos são provenientes da reação de compostos carbonílicos reativos, principalmente pequenos aldeídos e cetonas alifáticas advindos de intermediários do metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios – como o MDA (malondialdeído), HNE (4-hidróxi-2-nonenal) e glioxal –, com proteínas – como a pentosidina, e outros produtos finais de glicação avançada (AGEs, *advanced glycation end products*) –, e DNA – como glioxal –, além de adutos mistos produzidos por *cross-linking*, tais como adutos de MDA com aminoácidos de proteínas e bases de DNA [17, 19, 20].

O estresse carbonílico é um importante estado de deterioração de tecidos em diversas condições patológicas como diabetes, aterosclerose, uremia, amiloidíase relacionada à diálise, e ao envelhecimento no geral [21]. Neste quadro, metabólitos α -dicarbonílicos, como o glioxal e o metilglioxal, parecem ser os intermediários

reativos mais representativos do estresse carbonílico em condições patológicas [22, 23, 24, 25].

Na nefropatologia diabética, os mediadores reconhecidos do estresse carbonílico são os metabólitos α -dicarbonílicos metilglioxal, glioxal, e 3-desóxiciglicose [26]. Alguns estudos reportam que a glicemia de pacientes diabéticos, durante quadros de cetogênese, não se correlaciona com os níveis elevados de metilglioxal encontrados no plasma, e cogitam que o metilglioxal seria produzido pelo metabolismo cetogênico proveniente do AA ou do metabolismo de acetona pelo sistema citocromo P450 [24]. Entretanto, pode-se aventar que haja outras fontes de metabólitos α -dicarbonílicos nestes pacientes, originados por radicais livres, como a geração de glioxal pela lipoperoxidação e pela degradação oxidativa de carboidratos [19, 27]. Notadamente, pacientes diabéticos, assim como modelos animais para a doença, sofrem desbalanço redox, observado tanto pelo aumento de AGEs [28], como pelo aumento das atividades de enzimas antioxidantes nos órgãos linfóides destes animais [29].

Vários estudos indicam alta correlação entre o nível de AA plasmático de pacientes diabéticos tipo I com os níveis de lipoperoxidação desencadeados por estresse oxidativo [5] ou ataque direto de AA às moléculas de lipídio poliinsaturado, mas sem esclarecimento convincente dos possíveis mecanismos envolvidos [3, 7]. Também relatam a redução do nível de glutathione reduzida em eritrócitos [5], inibição do crescimento de células endoteliais [6] e acúmulo de AGEs [17].

O acetoacetato foi proposto como molécula antioxidante em quadros de neurotoxicidade de glutamato a neurônios [30] e a miocárdio em choque [31, 32] em simulações de isquemia e reperfusão. Animais alimentados com dietas cetogênicas apresentam menor nível de epilepsia quando aquele β -cetoácido é mantido em

baixas doses crônicas, advindas de alimentação cetogênica [33]. Esta resposta parece residir em um mecanismo adaptativo de reorganização sináptica entre os neurônios, como aumento da arborização e comunicação glia-neurônio, bem como de uma adaptação em relação à constituição dos lipídios da membrana destas células [34].

Não se pode deixar de rememorar que AA é um combustível fisiológico para as células, que o utiliza na forma do precursor acetil-CoA, levando à depleção de NAD(P)H [32] (vide próximo item do texto 1.2 e figura 1).

Por outro lado, Jain e McVie relataram [5] que o AA induz lipoperoxidação em eritrócitos humanos isolados. Os autores mostraram que AA quando exposto a íons de Fe^{2+} é capaz de produzir o ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), revelado pela oxidação do pigmento azul de nitrotetrazólio (NBT) [1] e redução de citocromo c [5]. Acreditamos, entretanto, que estes resultados podem ser atribuídos a espécies radicalares intermediárias da oxidação do AA pelo Fe^{2+} , que podem tanto oxidar o NBT como reduzir o citocromo c. Estes mesmos autores e outros colaboradores mostraram que, em pacientes diabéticos tipo I com metabolismo não-cetogênico e cetogênico, há aumento da facilidade com que as lipoproteínas LDL e VLDL são oxidadas por Cu^{2+} , sendo que o nível de AA correlaciona-se positivamente com os níveis de oxidação das lipoproteínas induzido por Cu^{2+} [4]. Não houve variação do nível de oxidação induzida por íons de Cu^{2+} das lipoproteínas de pessoas de metabolismo normal, quando comparada com pacientes diabéticos tipo I com metabolismo não-cetogênico. Sabe-se que a oxidação destas lipoproteínas é facilitada quando apresentam suas proteínas acetiladas. Adianta-se que a via proposta nesta tese para a oxidação aeróbica de AA prevê a formação de radical acetila (Figura 85), o que poderia estar associado à facilidade de oxidação de

lipoproteínas de pacientes diabéticos tipo I com metabolismo cetogênico. Jain e colaboradores [7] mostraram que pacientes diabéticos com quadro de cetogênese apresentam níveis maiores de MDA plasmático quando normalizados por lipídeos totais.

Em 2006, num artigo de revisão, Jain e colaboradores [1] propuseram que há dois mecanismos simultâneos que levam ao estresse carbonílico em pacientes diabéticos tipo I: (i) o mediado pelo AA e o derivado da hiperglicemia, que levaria ao aumento de produtos de glicosilação e de glicação via intermediários da auto-oxidação de carboidratos, e (ii) aumento dos níveis de NADPH. Neste contexto, é interessante notar que a glicação de mioglobina leva ao aumento de sua atividade peroxidásica, verificado pela maior indução de ferrilMb (ferrilmioglobina) quando a proteína glicosilada é exposta a H_2O_2 [35]. Estes mecanismos associados explicariam um aumento nos níveis de geração de espécies reativas, tanto pela maior produção de radicais livres, como pela sua menor metabolização, já que as enzimas antioxidantes são igualmente alvo do estresse carbonílico. Este quadro retro-alimentado seria o responsável pelo dano oxidativo, que levaria a complicações micro- e macro-vasculares, inflamatórias e nefrológicas constatadas em pacientes diabéticos tipo I em longo prazo [1].

Uma possível fonte de compostos α -dicarbonílicos em diabéticos é a reação de AA com mieloperoxidase [36], enzima presente em neutrófilos de mamíferos, funcional quando estas células encontram-se ativadas, em quadros de infecção. Segundo trabalho realizado em 1981 [36], o AA sofreria oxidação unieletrônica pelo sistema enzimático, formando um radical de AA, que ao reagir com O_2 geraria um radical peroxila, o qual, se não aniquilado por TEMPOL (4-hidróxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina 1-oxil) ou consumido por ascorbato, levaria a danos oxidativos,

denunciados por produtos de lipoperoxidação de ácido araquidônico. Neste trabalho, não foi identificado o produto gerado pela peroxidação do acetoacetato.

Em 1967, Milligan e Baldwin [37] constataram que acetoacetato é consumido por uma hemeproteína presente em extrato de coração de cabras, provavelmente Mb (mioglobina). O produto final da oxidação do AA foi identificado por cromatografia em papel como “piruvaldeído” (metilglioxal). Baseados neste trabalho, o grupo do Professor Giuseppe Cilento (IQUSP) [38] propôs a formação de um intermediário dioxetânico no sistema AA/Mb, com base na quimioluminescência ultrafraca total que acompanha a reação, e na transferência desta energia para um sensibilizador fluorescente adicionado, a eosina. Este trabalho, em que se utilizou oxiMb e Mn^{2+} como iniciadores da oxidação do AA, resultou na proposta de um mecanismo de reação envolvendo um dioxetano intermediário, cuja termólise geraria metilglioxal no estado excitado triplete, a espécie doadora de energia eletrônica para a eosina. Embora identificado inequivocamente, a natureza triplete do produto de reação, o metilglioxal, foi analisado indiretamente, utilizando-se sua condensação com *o*-fenilenodiamina (OPD). Esta reação gera o aduto metilquinoxalina, que foi analisado por cromatografia em camada delgada [38]. Quinoxalinas são pouco fluorescentes, mas seus análogos hidroxilados, quinoxalinóis, reconhecidamente, apresentam alta fluorescência. Recentemente, demonstrou-se que a condensação de OPD também ocorre com compostos β -cetoácidos como o próprio AA, gerando metilquinoxalinol, o mesmo produto de derivatização de piruvato com OPD [39]. Deste modo, o substrato remanescente, AA, deve interferir na identificação e dosagem de piruvato se for avaliado pela fluorescência das quinoxalinas geradas na mistura final de reação. Além disso, outros compostos α -dicarbonílicos derivatizáveis com OPD gerando quinoxalinas, muito semelhantes à metilquinoxalina, poderiam ser interferentes numa

medida de metilglioxal em amostras biológicas, utilizando fluorimetria ou cromatografia de camada delgada. Por este motivo, deve-se atentar para a eliminação desta interferência nas análises de compostos α -dicarbonílicos na presença de compostos β -cetoácidos, como AA ou MAA.

1.2. Acetoacetato como carboidrato, fonte combustível, a células

Sabe-se que AA é uma das fontes de acetil-CoA para as células produzirem ATP [32]. O excesso de acetil-CoA em conjunto com uma alta relação ATP/ADP, principalmente em fígado, induz a síntese de ácidos graxos. Já em músculo esquelético involuntário de ratos, que apresenta baixa atividade de biossíntese de ácidos graxos, vários trabalhos sobre o metabolismo de AA mostram que (i) na presença de glicose e insulina há acúmulo de citrato, que induz aumento dos níveis de malonil-CoA, um inibidor da carnitina acil-transferase I, inibindo a degradação de ácidos graxos [40]; (ii) a perfusão de músculos das pernas de ratos com AA não induz alteração na captação de glicose ou liberação de lactato, embora exista diminuição na taxa de oxidação de lactato e acúmulo de acetil-CoA, com inibição do complexo piruvato desidrogenase [41]; e (iii) o condicionamento físico em ratos induz aumento da utilização de AA [42].

Experimentos com corações de ratos submetidos à perfusão com AA, glicose, ácidos graxos e lactato em concentrações fisiológicas, mostram que AA é preferencialmente utilizado como fonte de acetil-CoA, seguido dos ácidos graxos e lactato, sendo a taxa de utilização de glicose inferior ao limite de detecção da técnica utilizada [43]. Apesar da alta captação e oxidação de AA, corações que utilizam exclusivamente o β -cetoácido como combustível fisiológico apresentam menor performance após os primeiros 20-35 minutos de perfusão [44], devido em parte pela

diminuição da concentração de coenzima A não-esterificada [45] e ausência de substratos fisiológicos para suprir o ciclo do ácido cítrico por vias anapleiróticas [46]. Em músculo cardíaco, a maior utilização de AA do que glicose como fonte primordial de acetil-CoA é controlada em várias etapas, bem como utiliza mecanismos de controle que variam sob diferentes estímulos hormonais [47].

Em contrapartida, outros tecidos, como o renal, utilizam majoritariamente glicose e lactato sob condições de normoglicemia, enquanto durante a hipoglicemia cetogênica utilizam ácidos graxos, aminoácidos e corpos cetônicos, como combustíveis respiratórios [48].

Figura 1. Metabolismo basal de AA em células musculares. Os estoques de glicogênio e proteínas são mobilizados durante a utilização de AA como combustível fisiológico para suplementação do ciclo do ácido cítrico via reações anapleiróticas (setas pontilhadas). Como a síntese de ácidos graxos é inibida por AA, esta via não colabora significativamente durante a cetogênese.

Embora os relatos do potencial tóxico de AA aos organismos [1, 36, 38], quando AAE foi oferecido a ratos na ração por 28 dias consecutivos, encapsulado em goma arábica, não se detectou qualquer efeito tóxico a animais machos ou fêmeas, exceto alargamento da porção cecal do intestino e presença de material

proteináceo na bexiga de machos que haviam ingerido a maior concentração (1 g.kg^{-1} por dia) [49].

Estudos em que o composto é injetado no peritônio de ratos e humanos mostram um efeito hipoglicemiante de AA, mediado pela liberação de insulina [50, 51, 52]. Nos trabalhos realizados com ratos, adotou-se um pré-condicionamento a baixas doses de AA (cerca de 100 mg.kg^{-1} na primeira semana) previamente à administração de doses mais elevadas (atingindo até 500 mg.kg^{-1} em 21 semanas) [51], mostrando claramente que há efeito adaptativo para a tolerância e efeito hipoglicemiante de AA em ratos. Estes trabalhos foram publicados entre os anos 40 a 50 e buscavam entender o mecanismo de secreção da insulina. Eles propuseram o AA como molécula indutora do diabetes, sendo reconhecida mais tarde, como molécula mediadora no metabolismo adaptativo do jejum. Não há na literatura trabalhos com animais em que AA tenha sido injetado com o objetivo de se verificar parâmetros redox ou pré-disposição a estresse oxidativo.

Recentemente, mostrou-se que ratos sob dieta cetogênica (rações com baixos níveis de carboidrato e altas concentrações de lipídeos e proteínas) apresentam altos níveis de adutos de proteínas com 4-hidróxi-2-nonenal no hipocampo, além de baixos níveis de GSH em fígado [53]. Este trabalho sugere que adaptações metabólicas, como a ativação redox do fator de transcrição para genes do aparato antioxidante Nrf2, levam à manutenção de lesão em baixos níveis a longos prazos. Por outro lado, um trabalho realizado com humanos, submetidos a dieta cetogênica por 14 dias, mostrou aumento de tióis protéicos em sangue, assim como ácido úrico e capacidade antioxidante total em plasma, sem que se observe alteração nos níveis de MDA em plasma, ou superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) no sangue [54].

1.3. Hemeproteínas e atividade peroxidásica

As hemeproteínas apresentam a protoporfirina IX coordenada pelos átomos de nitrogênio pirrólicos a um íon de ferro central (II, III e IV) constituindo o grupo heme, o grupo prostético da proteína. As quinta e sexta posições de coordenação são ocupadas por ligantes diferentes em cada hemeproteína, entretanto, na maioria delas, a quinta posição de coordenação é ocupada por um resíduo de histidina, chamada proximal. O ligante distal, que ocupa a sexta posição de coordenação, é diferente para cada proteína, bem como, para cada estado de oxidação do ferro hemínico, determinado e dependente do ligante. Mioglobina e hemoglobina (Hb) (Figura 2a e 2b), cujas funções primordiais são estocagem e transporte de oxigênio, respectivamente, ao coordenarem oxigênio molecular na sexta posição do grupo heme, aumentam o estado formal do íon de ferro no estado de oxidação +2 (forma oxi- ou ferro-) para +3 (forma meta- ou ferri-).

O ferro do citocromo c (Figura 1c), na sexta posição de coordenação, liga-se ao resíduo de metionina 80. Estudos de dicroísmo circular e EPR mostram que a interação do citocromo c com membranas de cardiolipina leva a modificações na estrutura tridimensional da proteína e densidade eletrônica sobre o ferro hemínico, facilitando a liberação da perda da coordenação da metionina 80, quando tratado com peróxidos como o *terc*-butilhidroperóxido [55, 56].

As hemeproteínas apresentam atividade peroxidásica ora específica, entre elas, a peroxidase de raiz-forte (HRP, *horseradish peroxidase*) (Figura 2d), ora inespecífica, como a Mb, Hb e citocromo c. Estas proteínas catalisam ciclos de oxidação-redução de dois passos de um elétron [57]. O primeiro passo é a oxidação do estado basal (Fe^{III}) alto spin ($S = 5/2$) por H_2O_2 , formando água e um heme, formalmente, com dois equivalentes de oxidação superiores ao do estado basal,

chamado de Composto I. O composto hidroperóxido-intermediário, chamado Composto 0, sofre uma clivagem heterolítica da ligação O-O do hidroperóxido. Esta clivagem é facilitada pelo envolvimento de uma histidina e/ou uma arginina distal como um catalisador ácido-base, que seqüestra um elétron do átomo de oxigênio mais próximo ao ferro e então o doa para o oxigênio mais externo, de saída [58].

O Composto I tem dois equivalentes de oxidação superior ao do estado nativo (Fe^{III}), sendo que um dos elétrons é proveniente do ferro, resultando em uma espécie ferril ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$) com spin intermediário ($S = 1$), que pode interagir magneticamente com radicais livres. O outro elétron é retirado do anel porfirínico, formando um radical π catiônico. No próximo passo, o composto I oxida uma molécula de substrato na periferia do heme, resultando em um intermediário com equivalente de oxidação superior ao nível basal, chamado Composto II, que não tem natureza radicalar e tem spin intermediário ($S = 1$). O último passo é uma nova oxidação de um elétron do substrato pelo Composto II ($\text{Fe}^{\text{IV}}-\text{O}-\text{H}$), com redução do composto II ao estado basal, Fe^{III} .

A peroxidase de raiz forte apresenta espectros diferentes para cada composto, sendo conhecidos seus valores de coeficiente de extinção molar (Figura 3) [59].

Figura 2. Hemeproteínas. Figuras geradas utilizando-se o software PyMol [60]. (a) Hemoglobina (oxiHb ou ferroHb) – 1GZV; (b) Mioglobina (oxiMb ou ferroMb) – 2Z6S; (c) Citocromo c (Reduzido ou ferroCit c) – 1GIW; (d) Peroxidase de raiz forte (HRP) (Nativa ou ferriHRP) – 1H5A. Os átomos do grupo heme e seus ligantes seguem o padrão de cores: verde para carbono, branco para hidrogênio, vermelho para ferro, azul para nitrogênio e amarelo para enxofre.

Atualmente, com os estudos de cristalografia por difração de raio-X de hemoproteínas sob diferentes estados de oxidação, acredita-se que o composto II, classicamente designado como a espécie $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ (como na figura 3 para HRP), na verdade, deve ser considerada como $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{-O-H}$, pois o aumento da distância entre os átomos ferro e oxigênio, de 1,70 Å para 1,84 Å para a HRP composto I para II, suporta a hipótese de uma ligação simples, sendo que a protonação é um passo fundamental para a ativação deste composto como espécie oxidante [61]. Importante frisar que estudos do efeito de pH e da atividade peroxidásica de Mb e Hb revelam que a protonação do composto II é um passo fundamental para acentuar sua atividade peroxidásica, expressa em baixos valores de pH [62].

Figura 3. Alterações espectrais de HRP/ H_2O_2 ao catalisar a peroxidação de um substrato geral SH_2 (ex., dihidroximaldeído, isobutanol, *n*-hexanol, cânfora). Os balões incluem o comprimento de onda de absorção máxima da enzima em cada uma de suas formas [59]. O Composto III só é formado quando a concentração de H_2O_2 é superior à da hemoproteína [42] e é pouco reativo com substratos, a não ser como fonte potencial de íon radical superóxido por conversão a Fe^{II} .

Os espectros dos diversos intermediários da atividade peroxidásica da Mb e Hb, por ser menos específica, são menos característicos. Os compostos I e II têm espectros de absorção muito semelhantes, e, por este motivo, alterações espectrais destas hemeproteínas são atribuídas genericamente à espécie ferril ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$) [63]. Em comparação com peroxidases hemínicas, Mb apresenta baixa atividade peroxidásica, o que pode ser explicado por fatores estruturais. A estabilidade do Composto I da Mb é baixa devido à ausência de uma arginina distal, presente em HRP, que estabilizaria a carga negativa proveniente da quebra heterolítica do intermediário hidroperóxido [61].

A exposição do grupo heme não pode ser considerado o fator preponderante para explicar as diferenças na atividade peroxidásica típicas de Mb e HRP, pois como ilustrado na figura 2, o grupo heme da Mb é extremamente exposto ao solvente, enquanto o grupo heme da HRP encontra-se em uma cavidade da proteína, acessível ao solvente por um canal [61], embora HRP apresente atividade peroxidásica muito superior a de Mb. É interessante notar que a HRP contém 18% de carboidrato associado que pode atuar como fonte de átomos de hidrogênio para neutralizar intermediários radiculares dos substratos de sua atividade peroxidásica [64].

Recentemente, cálculos computacionais, em que se simula as diferentes estruturas nos diversos estados de oxidação para as hemeproteínas, baseados em dados de cristalografia, RMN de proteínas e química de coordenação, revelam valores teóricos para a densidade eletrônica sobre os diversos átomos, bem como as distâncias teóricas entre os átomos, especialmente, quando a obtenção de cristais da hemeproteína é impraticável, como é o caso da Mb Composto I (Figura 4). Para metaMb, com a sexta posição de coordenação vaga, verifica-se que o átomo

de ferro encontra-se abaixo do plano do anel porfirínico, e apresenta alto spin, com a mais baixa densidade eletrônica (1,09 a 1,43 elétrons) sobre o átomo de ferro de todos os demais estados de oxidação. A maior densidade eletrônica, correspondente a quase dois elétrons, aparece no Composto II protonado (1,39 a 1,93 elétrons), sendo o contrário para a densidade eletrônica sobre o oxigênio, que cai de 0,70 a 0,95 elétron no Composto I para 0,05 elétron no Composto II protonado. Isto permite sua atribuição a um complexo tipo $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-O}^{\bullet-}$, de baixo spin, mesmo com alguma contribuição (5 a 35%) da tradicional designação $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{-OH}^{\cdot-}$. Estes estudos constatarem um encurtamento da ligação Fe-ligante, de 2,06 Å na forma aquo-metaMb, para 1,76 Å no Composto II protonado, evidenciando a transição de ligação dupla para simples durante o ciclo peroxidásico da hemeproteína. O ferro também mostra deslocamento em direção ao plano da porfirina, com valor relativo ao plano do anel de -0,70 Å quando no estado aquo-metaMb, para 0,07 Å quando Composto II protonado [63].

Mioglobina, Hb e HRP apresentam o grupo heme não ligado covalentemente à apoproteína. Ele é mantido pela coordenação com a histidina proximal, 93 na Mb, F8 na Hb e 170 na HRP, respectivamente. Já no citocromo c, o grupo heme é ligado covalentemente à apoproteína por duas pontes de sulfeto através das cisteínas 14 e 17, além de coordenado pela histidina proximal 18 e a metionina distal 80.

Como dito, a pequena estabilidade do Composto I de Mb resulta em sua rápida conversão ao Composto II, em que o radical π catiônico sofre transferência de elétron principalmente aos resíduos de aminoácidos triptofano 14 e tirosina 103 [65]. O radical da tirosina 103, pode captar elétron, no caso da Mb de baleia-azul (*Balaenoptera musculus*), da tirosina 151, e na Mb humana, da cisteína 110, formando os radicais tirosinila 151 e cisteinila 110 [65]. O resíduo do triptofano 14, na presença de oxigênio, gera um radical peroxila, que é capaz de oxidar diversos

substratos [66], como NADH, estireno e urato. Os radicais dos resíduos de triptofano 14 e tirosina 103 foram evidenciados por *spin trapping* utilizando respectivamente ácido 3,5-dibromo-4-nitrosobenzeno sulfônico (DBNBS) [67] e 5,5-dimetil-1-pirrolina *N*-óxido (DMPO) [66], e por EPR direto para detectar o radical peroxila proveniente do radical triptofanila combinado com O₂ [66].

Figura 4. Estruturas otimizadas de cinco diferentes estados de um modelo para mioglobina: (a) Fe^{III}.H₂O, baixo spin; (b) Fe^{III}, alto spin; (c) Composto I; (d) Composto II e (e) Composto II protonado. As cores representam: cinza para carbono, cinza claro para hidrogênio, vermelho para oxigênio, azul para nitrogênio e laranja para ferro [63].

Como mostrado na figura 4, o radical π catiônico pode seguir três rotas: (i). transferência de elétron a resíduos de aminoácidos, como descrito acima; (ii). sob baixo pH, com a protonação do estado ferril, há desestabilização deste estado e seu decaimento a sua forma meta; (iii). migração do radical para resíduos da apoproteína

e ligação covalente ao grupo heme da espécie oxoferril rearranjada — de $\text{Fe}^{\text{IV}}\text{-O-H}$ para $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-O-H}$ mais um radical hemínico —, levando à aniquilação do radical, e ao surgimento de mioglobina-X, ou -H [68]. Os ensaios clássicos com metaMb geralmente na presença de alta concentração de H_2O_2 em tampões ácidos, ou desnaturantes, levam à liberação do grupo heme. Entretanto, observa-se que há grupos heme que não são liberados por estarem covalentemente ligados a apoproteína, enquanto que os liberados apresentam-se tanto na forma estruturalmente íntegra, quanto oxidado e/ou modificado [69]. Há relatos na literatura de que ocorre a liberação do ferro hemínico de Hb quando exposta a H_2O_2 , seguida da reação de Fenton [70, 71].

Estudos mostram que Mb exposta a altas concentrações de H_2O_2 pode dimerizar-se, sendo que, aparentemente, ocorre predominantemente nas isoformas de baleia-azul (*Balaenoptera musculus*), via ligação por aniquilamento entre os radicais de resíduos da tirosina-151, e na humana, via ligação dissulfeto entre dois radicais cisteinila-110. A dimerização de Mb não é proeminente na isoforma de cavalo (*Equus caballus*), cujos resíduos radicais identificados seriam menos acessíveis à interação com radicais de outra molécula de proteína [68, 69].

Figura 5. Peróxido de hidrogênio reage com ferrilMb produzindo a espécie ferril e um radical π catiônico que migra prontamente para a proteína (passo a). A carga deste radical é perdida rapidamente por desprotonação. Sob pH básicos a espécie ferril é estável, e Mb-H ou -X não é formada. O radical protéico pode sofrer *quenching* antes da ferrilMb eventualmente se auto-reduzir (passos b e c). O radical pode migrar por resíduos de aminoácidos (passo d). A protonação do oxigênio ferril sob pH ácido (passo e) desestabiliza a espécie ferril, permitindo-a decair (auto-redução, passos f e g). Alternativamente, o anel hemínico, por apresentar natureza parcialmente radicalar, reage com o radical de um resíduo de aminoácido da vizinhança da porfirina, resultando na aniquilação dos radicais, formando uma ligação covalente entre apoproteína-heme (passos h e i). A ligação entre heme e apoproteína só ocorrerá se houver um radical protéico e uma espécie oxoferril protonada [68].

Na presença de captadores de spin, tais como o DMPO, radicais centrados em proteínas podem ser captados gerando adutos proteína-DMPO que ainda mantém sua natureza paramagnética. Tais adutos por serem estáveis por segundos ou minutos, podem ser detectados e caracterizados por EPR. Entretanto, o nitróxido de proteína-DMPO pode ser reduzido ou oxidado às espécies EPR-silenciosas hidroxilamina e nitrona, respectivamente, apesar de se manterem como adutos proteína-DMPO.

Com o desenvolvimento de um anticorpo anti-nitrona de DMPO pelo grupo do Prof. Dr. Ronald Mason (NIH, USA), foi possível localizar e caracterizar radicais centrados em proteínas e DNA de pacientes com diversas doenças metabólicas e ambientais [72, 73], tais como o diabetes [74], e em modelos de sepsis baseado em exposição a lipopolissarídeos de *E. coli* (LPS) [75] e intoxicação por cobre com danos a DNA [76].

O sistema utilizado como padrão para o desenvolvimento da técnica de *imuno spin trap* foi o de Mb adicionada de H₂O₂. Neste modelo foi caracterizada a presença exclusiva do aduto nitrona de DMPO ligado à tirosina 103 [77].

1.4. Modificações protéicas em Mb como proteína alvo de radicais

Recentemente, o grupo de Winterbourn (2010) [78] relatou que o radical tirosinila-151 de ferrilMb de baleia-azul (*Balaenoptera musculus*) pode reagir com o radical O₂•⁻, gerando um aduto peroxídico, que foi identificado por espectrometria de massas [79]. Witting e colaboradores (2008) [80] mostraram que a exposição de metaMb a HOCl leva à halogenação e oxidação, respectivamente, de resíduos específicos de Trp e Met.

A reação de Mb com espécies reativas de nitrogênio também tem sido intensamente investigada [81]. Sabe-se atualmente que esta hemeproteína apresenta atividades de nitrito redutase e óxido nítrico oxidase [82]. A depender da disponibilidade dos reagentes, metaMb ou oxiMb são capazes de, a baixas tensões de O_2 , gerar NO o qual produz nitrosilMb na presença de redutores [83], bem como inibe a respiração mitocondrial [84]. Em normoxia, a catálise inversa é favorecida, acumulando-se nitrito como um “tampão” para NO [83]. Deste modo, acredita-se que Mb tem um papel na regulação da respiração mitocondrial em músculo cardíaco quando em eventos de isquemia-reperfusão [85].

Já na presença de H_2O_2 e NO_2^- , Mb gera $NO_2^\bullet$ e ácido peroxinitroso (HONOO) através de uma atividade nitrito oxidase [86]. Dióxido de nitrogênio, sendo um potente agente nitrante, leva à nitração de resíduos de Tyr e Trp da proteína catalisadora [86, 87]. O rendimento de nitração de metaMb na presença exclusivamente de HONOO é bastante inferior quando comparada a Mb exposta a H_2O_2 e NO_2^- , mostrando claramente que a hemeproteína ainda catalisa a isomerização de peroxinitrito a nitrato, NO_3^- [88].

Casella e colaboradores (2008) mostraram que Mb é quimicamente alterada ao reagir com dopamina [89]. O radical semiquinona de dopamina é adicionado a resíduos de His da hemeproteína. Este aduto Mb-dopamina apresenta baixa estabilidade, resultando em desenovelamento e precipitação da proteína modificada [89].

Na literatura há consenso de que compostos redox ativos, tais como nitróxidos estáveis [90], ascorbato [91], compostos aromáticos, como catecol [92] e dopamina [89], aumentam a atividade catalásica de ferrilMb. Os casos mais bem estudados são o de ascorbato e TEMPOL. A geração de radicais ascorbila por

oxidação unieletrônica de ascorbato pelo radical protéico ou hemínico de ferrilMb ocorre com constante de velocidade $k_2 > 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [93]. Não há dados cinéticos sobre a reação deste composto com cada um dos equivalentes de oxidação de ferrilMb, devido à inexistência de técnicas que discriminem os dois elétrons da ferrilMb. Entretanto, espera-se que a constante de velocidade do radical protéico seja maior que a do radical hemínico, já que este é estável por vários minutos quando em pH básico [94], enquanto que o radical protéico claramente gera instantaneamente uma plethora de radicais centrados em diferentes resíduos da proteína [95]. No caso de nitróxidos estáveis como o TEMPOL (4-hidróxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina 1-oxil), há uma reciclagem deste composto da sua forma radical ao cátion oxamônio. O cátion oxamônio, como um forte oxidante, é responsável pela aceleração do consumo de H_2O_2 , via intermediário $\text{O}_2^{\bullet-}$, levando à liberação de O_2 [90]. Desta forma, através do ciclo redox entre radical e cátion oxamônio, TEMPOL atua como um mimético de catalase/SOD, em um processo iniciado por ferrilMb. A constante de reação de TEMPOL com o radical hemínico é da ordem de $3,4 \times 10 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [96], enquanto que com radicais centrados em carbono, como radicais protéicos, é da ordem de 10^8 - $10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [97]. Lardinois e colaboradores (2009) [97] reportaram que um aduto aldeídico com o N-terminal da proteína é gerado pelo cátion oxamônio. Após a conjugação do cátion oxamônio ao N-terminal de Mb há um rearranjo intramolecular, resultando na liberação da hidroxilamina correspondente de TEMPOL, seguida da desaminação e posterior hidratação do resíduo N-terminal, então convertido a uma função aldeídica.

Notadamente, TEMPOL e ascorbato atuam principalmente como moléculas interceptadoras dos radicais protéicos de ferrilMb, prevenindo lesões oxidativas em

porções apoprotéicas, bem como degradação do grupo heme [90, 93], embora no caso de TEMPOL haja carbonilação de Mb [97].

A quantificação de carbonilproteínas totais é classicamente utilizada para determinação de lesões oxidativas a proteínas de tecidos, pois é um parâmetro do desbalanço final entre geração de espécies reativas e acúmulo destas proteínas modificadas, como acontece durante o envelhecimento [98]. Entretanto, os níveis de carbonilas protéicas são dependentes da seqüência protéica alvo para dado radical [99], já que a sua geração é proveniente da incorporação de compostos carbonílicos à proteína, ou por modificações redox do esqueleto carbônico protéico ou da cadeia lateral de aminoácidos [100], como descrito anteriormente para o cátion oxamônio de TEMPOL [97].

Outros parâmetros usados para avaliar danos oxidativos a proteínas são os níveis de tióis reduzidos [101], hidroperóxidos protéicos [102], produtos de degradação de resíduos de aminoácidos [79, 80, 86], e perda ou alteração de atividade enzimática [103].

1.5. Atividade peroxidásica de hemeproteínas com geração de produtos carbonílicos tripletes – quimioluminescência ultra-fraca

Por três décadas, o grupo do Prof. Bechara estuda hemeproteínas peroxidásicas e geração de compostos carbonílicos tripletes mediada por moléculas de dioxetano. Cilento, Bechara e colaboradores (1988) [104] utilizaram o isobutanal (IBAL), um aldeído-modelo de metabólitos vegetais, que na sua forma enólica pode ser oxidado, na presença de HRP/H₂O₂, por oxigênio molecular ao α -hidroperóxido correspondente. Segue-se o ataque nucleofílico do grupo hidroperóxido ao carbono aldeídico e conseqüente ciclização da molécula, formando um intermediário

dioxetânico, que, por termólise, gera acetona triplete e ácido fórmico [105]. As espécies tripletes, pela sua vida-longa e configuração eletrônica diradicalar, têm reatividade similar à de radicais alcóxilas [106].

Estudos realizados por Bechara e colaboradores (2004) [107] revelaram que β -cetoácidos e seus ésteres são oxidados por oxigênio molecular, na presença de peroxinitrito iniciador, possivelmente formando dioxetano como produto intermediário. Este, por termólise, gera espécies dicarbonílicas tripletes, as quais por clivagem Norrish geram o radical acetila.

Sabe-se que a facilidade de enolização de aldeídos e cetonas é limitante da velocidade de oxidação destes compostos, que esta reação é catalisada pelo íon fosfato ou arsenato e que, pelo mecanismo via termólise de intermediários dioxetânicos alquílicos, são geradas espécies excitadas majoritariamente no estado triplete. β -Dicetonas, pela presença de duas carbonilas espaçadas por um grupo metileno, podem gerar um enol estabilizado por ponte de hidrogênio intramolecular, cuja constante de enolização é da ordem de 10^3 . Vários fatores afetam o potencial de oxidação destas moléculas, dentre eles, a presença de substituintes alquila em posição α , que reduz o potencial de oxidação de uma β -dicetona em cerca de 500 mV [108].

Os β -cetoésteres, como o AAE, apresentam comportamento similar ao de seus pares não esterificados, exceto pela sua menor reatividade, devido ao fato de compostos esterificados apresentarem conteúdo enólico inferior até uma ordem de grandeza [108] e potencial de redução mais positivo [109].

Segundo o mecanismo de oxidação de β -cetoácidos por peroxinitrito ou Mb, na presença de peróxido iniciador, proposto por Bechara e colaboradores [107, 110, 38], em conjunto com trabalhos realizados com o sistema IBAL/ HRP-H₂O₂ [104], os

β -cetoácidos podem ser oxidados e gerar espécies tripletes *in vitro* e possivelmente *in vivo*.

Por apresentarem reatividade similar a de radicais alcoxilas, as espécies tripletes são capazes de desencadear a lipoperoxidação, bem como são desativadas por emissão de calor ou fosforescência, por transferência energética a aceptores, como o oxigênio ou sensitizadores como o ânion do ácido 9,10-dibromoantaceno-2-sulfônico (DBAS), a clorofila, e a eosina, gerando seu estado excitado singlete, fluorescente. Compostos α,β -insaturados, tais com o sorbato, também são bons supressores de espécies tripletes, isomerizando-se [106, 111]. Ainda segundo reações fotoquímicas, estas espécies podem se adicionar a duplas ligações, ou ainda seguir clivagens Norrish tipo 1 ou 2, gerando espécies radicalares secundárias e produtos de seu aniquilamento [112].

Figura 6. Comportamento fotofísico e fotoquímico de acetona triplet gerada a partir da oxidação aeróbica de IBAL por HRP: a. abstração de hidrogênio de PUFA's com conseqüente desencadeamento de lipoperoxidação; b. desativação térmica; c. decaimento via emissão de luz por fosforescência; d. transferência energética a oxigênio molecular, gerando oxigênio singlete; e. transferência energética ao aceptor DBAS, que da sua forma singlete, decai emitindo luz via fluorescência ao estado fundamental; f. transferência energética ao dieno α,β -insaturado sorbato, com sua conseqüente isomerização; g. adição a dupla ligação de olefinas; h. clivagens Norrish tipo 1 ou tipo 2, gerando radicais acetila e metila, monóxido de carbono, bem como produtos da aniquilação destes produtos radicais, tais como biacetilo. Adaptado de [112].

Com este rico quadro de alvos biologicamente relevantes e reatividades, as espécies tripletes podem ser importantes para o entendimento de doenças e quadros metabólicos em que compostos carbonílicos sejam acumulados, levando à diversificação e intensificação do estresse carbonílico.

2. Objetivos gerais

O acúmulo de compostos carbonílicos reativos, como AA, e, principalmente, compostos α -dicarbonílicos, como metilglioxal e biacetilo, e seus adutos com biomoléculas, ocorre em diversas desordens metabólicas. Estes e seus adutos podem levar a complicações clínicas secundárias em decorrência destas doenças, como no caso do desenvolvimento de retinopatia e arterosclerose pelo diabetes.

Já mioglobina, quando liberada do tecido muscular (rabdomiólise) acumula-se no tecido renal e induz, através da sua atividade peroxidásica e obstrução física, lesões e modificações teciduais que podem progredir até a instauração de lesão renal crônica.

Deste modo, o objetivo geral desta tese é estudar o mecanismo da oxidação de AA e MAA, como fontes dos compostos α -dicarbonílicos metilglioxal e biacetilo, respectivamente, ambos no estado triplete (Figura 85), catalisado por Mb sob atividade peroxidásica *in vitro* e *in vivo*. Estudamos ainda possíveis efeitos deletérios dos intermediários tripletes e produtos radicalares a Mb. Utilizando estudos com culturas de células e tecidos *ex vivo*, e em animais *in vivo*, administrados os compostos β -cetoésteres, avaliamos a oxidação destes compostos e seu efeito na morte celular e estresse oxidativo em (i) culturas de células endoteliais expostas a Mb e H_2O_2 , (ii) em um modelo animal de rabdomiólise, e em (iii) músculos em cultura *ex vivo* expostos a H_2O_2 .

Figura 7. Compostos substratos estudados como possíveis geradores de espécies reativas e produtos α -dicarbonílicos a partir de sua oxidação catalisada por hemeproteínas/ H_2O_2 , atuando como peroxidases.

3. Materiais e métodos

3.1. Reagentes

A menos que especificada a fonte nas metodologias, todos os reagentes usados foram adquiridos da Sigma-Aldrich e eram da mais alta pureza disponível. Todas as soluções foram preparadas com água deionizada (Millipore Milli-Q® ou PicoPure®) e os tampões tratados com Chelex®.

3.1.1. Preparação da solução estoque de Mb

A solução da ferriMb (metaMb, ou Mb.Fe^{III}) foi preparada a partir da proteína comercial solubilizada em PBS (50 mg.mL⁻¹), que após equilibrada com N₂, foi tratada com ferricianeto de potássio 10% (m/m). Após 10 min, o excesso de sal da solução foi eliminado através de filtração em duas colunas em seqüência: DEAE-celulose equilibrada e eluída com tampão fosfato 20 mM, pH 7,0, seguida de Sephadex G25, eluída com tampão fosfato 20 mM, pH 7,4 [113]. A concentração da hemeproteína recém-eluída da coluna foi determinada espectrofotometricamente, utilizando-se o valor $\epsilon_{633} = 3,42 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ [114]. As alíquotas de 200 μL foram estocadas a -20°C. Para preparação de ferroMb (oxiMb ou Mb.Fe^{II}), utilizou-se ditionito de sódio, seguindo-se o mesmo protocolo e $\epsilon_{576} = 15,3 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ [114].

3.1.2. Soluções de compostos β -cetoácidos e β -cetoésteres

Acetoacetato de etila (Sigma Chemical Co.) e 2-metilacetoacetato de etila (Aldrich) foram utilizados após recém-purificação por destilação (Figura 7).

Acetoacetato e MAA foram preparados como descrito no próximo item.

3.1.3. Preparação dos sais de AA e MAA

Acetoacetato e 2-metilacetoacetato foram preparados por saponificação dos respectivos ésteres etílicos [115]. Soluções 1,0 M dos ésteres etílicos são incubadas em água com 1:1,2 de NaOH (ligeiro excesso) a 25°C sob agitação por 1 h. Adiciona-se 50% do volume de HCl 4 M gelado (concentração final 1,33 M). Quando necessária a utilização de volumes maiores desta solução-estoque nos ensaios, faz-se a neutralização dela com HCl até que a solução fique neutra.

3.2. Espectros de absorção UV/Vis das hemeproteínas: determinação do conteúdo de ferriMb e quantidade relativa de oxi/ metaMb

Utilizou-se um espectrofotômetro Varian, modelo 50 BIO UV-VIS, com sistema de controle de temperatura Peltier, modelo PCB150.

O conteúdo de ferriMb obtida pelo tratamento de Mb com peróxido de hidrogênio foi acompanhado cineticamente, utilizando-se o cálculo indicado por Cadenas e Giulivi [93]: FerriMb (μM) = 249

$$A_{550\text{nm}} - 367 A_{630\text{nm}}.$$

Para as determinações da porcentagem de ferriMb e ferroMb

na mistura padrão de reação, utilizou-se a reta de regressão ajustada para a porcentagem de ferroMb *versus* a relação entre a absorção em 550 nm e 630 nm.

Deste modo, a equação de segundo grau obtida da reta de regressão, índice de correlação de 0,9959, foi utilizada para os cálculos de decaimento de oxiMb a

Figura 8. Curva-padrão para a determinação do conteúdo de ferroMb em uma mistura com ferriMb como descrito no texto (item 2.7).

metaMb, adotando-se a premissa de estequiometria 1:1. Nestes cálculos, os espectros de oxiMb na presença de H_2O_2 , não incluíam aquele da espécie ferrilMb.

3.3. Determinação de radical protéico em amostras de Mb através da reação com o *spin trap* DNBBS, seguido da separação proteína/proteína-*spin trap* por eletroforese em gel não-desnaturante

A síntese do DNBBS foi realizada de acordo com Kaur (1996) [116].

A metodologia de isolamento de Mb com radical protéico, após reação com o agente captador de spin DNBBS, e sua separação através de eletroforese não-desnaturante, foi descrita por Harris e colaboradores (2002) como uma ferramenta de purificação do aduto proteína-DNBBS para posterior análise por espectrometria de massas [67]. Deste modo, adaptou-se o método, mantendo-se as proporções dos reagentes utilizados e procedimentos, para análise das bandas presentes no gel. As amostras de Mb (62,5 μ M) foram adicionadas de DNBS (312,5 μ M) por 30 s. Incubações por tempos maiores levaram à precipitação da proteína. Os adutos de DNBBS são reduzidos por 5 min com ascorbato (10 mM) e misturados com tampão de amostra não-desnaturante.

O gel nativo descontínuo de 10% para corrida e 4% para empilhamento, e as demais soluções, seguiram os padrões normais para eletroforese vertical de proteínas, exceto para a ausência de SDS ou qualquer outro desnaturante (tampão de corrida 192 mM glicina, 25 mM Tris, pH 8,3; tampão para gel de empilhamento 0,50 M Tris.HCl, pH 6,8; tampão para gel de corrida 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8). A corrida foi realizada aplicando-se 100 V por cerca de 3 h. Os adutos proteína-DNBBS apresentam relação massa/carga maior, já que tem carga negativa maior em relação à proteína nativa, e, após a corrida em gel não desnaturante,

apresentam-se como uma banda inferior e migram mais em relação à proteína sem radical, portanto, sem o captador de spin.

3.4. Consumo de H_2O_2

O consumo de H_2O_2 foi determinado pela determinação, a cada 2 min, do conteúdo de H_2O_2 total pelo método FOX [117]. Este método utiliza uma solução de laranja de xilenol (XO) 100 μM e Fe^{2+} 250 μM , em ácido perclórico 25 mM. O Fe^{2+} ao reagir com peróxidos oxida-se a Fe^{3+} e forma um complexo com XO vermelho-róseo que absorve intensamente a luz em 560 nm.

Figura 9. Curva-padrão para a determinação do consumo de H_2O_2 , realizada como descrito no texto (item 2.8).

O método FOX é muito sensível e para que as medidas não ultrapassem os valores da curva de calibração, adicionou-se 50 μL de amostra a 1,0 mL de solução de FOX. Após 30 min, as medidas de absorbância foram efetuadas em leitor de microplacas.

Notadamente, íons de ferro contaminantes ou liberados pela amostra superestimam o resultado de FOX [118], entretanto nas condições dos experimentos mostrados neste relatório, o ferro, se liberado da hemeproteína, não interfere na determinação de H_2O_2 , pois a adição de 10 U de CAT à amostra anula totalmente a absorbância da solução, depois de adicionada a solução de FOX. Deste modo, também se verificou que é desprezível o teor de hidroperóxidos distintos de H_2O_2 nas amostras.

3.5. Consumo de AA

Acetoacetato foi determinado por modificação do método de Walker (1954) [119], que consiste na conjugação de AA com o sal de diazônio de *p*-nitro-anilina (0,04%) em tampão acetato 70 mM, pH 5,5. No método original, após a derivatização, o aduto em solução e o precipitado alaranjado são extraídos e solubilizados em *n*-butanol para determinação da absorbância em 450 nm.

O procedimento foi adaptado para um método cinético, no qual acompanha-se a formação do aduto alaranjado pela absorbância em 450 nm durante 5 min. Deste modo, o passo de extração com solvente orgânico foi eliminado.

Figura 10. Curva-padrão para determinação de AA, como descrito no item 3.5.

Para verificarmos se os

prováveis produtos provenientes da oxidação de AA seriam interferentes no ensaio, realizou-se o mesmo ensaio com metilglioxal, biacetilo, piruvato e oxalato 5 mM, porém, nenhum dos compostos afetou o ensaio.

Os autores do método sugeriram que possivelmente o aduto alaranjado estável seria proveniente do ataque de duas moléculas do sal de diazônio ao grupo metileno do AA. Deste modo, e como confirmado experimentalmente, MAA, por apresentar apenas um átomo de hidrogênio *alfa*, não seria derivatizável ao aduto estável de coloração alaranjada.

A curva-padrão exibiu forte correlação entre os valores de inclinação da absorbância a 450 nm ao longo do tempo e a concentração de AA adicionado, $R^2 > 0,999$.

Nas amostras, devido à grande sensibilidade do método, a determinação do consumo de AA foi realizada com pequenas alíquotas da amostra (de 1 a 10 μL) antes e depois da adição de H_2O_2 . A diluição do AA nas amostras pela adição de H_2O_2 foi considerada para os cálculos, embora diferentes soluções-estoque de H_2O_2 tenham sido preparadas, a fim de que o volume adicionado às amostras fosse o mesmo para todos os tratamentos (10 μL de H_2O_2 estoque para 1,0 mL final de amostra).

3.6. Medidas de quimioluminescência

A detecção de quimioluminescência foi feita utilizando-se contador de fótons Hamamatsu, modelo TVC 767, acoplado a uma fotomultiplicadora Thorn EMI, modelo 9658AM, mantida por um refrigerador termoelétrico da Thorn EMI, modelo FACT50 MK II, a -8°C . O fototubo é conectado a um amplificador modelo 1121 A da Princeton Applied Research™ (Princeton, NJ).

3.7. Avaliação do consumo de oxigênio

O consumo de oxigênio foi monitorado em um sistema polarográfico Hansatech (Sistema Oxygraph). Assumiu-se a concentração de 240 μM de O_2 sob atmosfera normal 25°C , e 1,25 mM sob atmosfera de O_2 puro, a 25°C , bem como 210 μM de O_2 sob atmosfera normal a 37°C [120].

3.8. Análise de produtos α -dicarbonílicos

Os produtos α -dicarbonílicos glicoxal, metilglicoxal, e biacetil foram separados e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em um equipamento de marca Waters, dotado de duas bombas modelo 515, injetor

automático modelo 717 plus, filtro pré-coluna dotado de cartucho C-18 da marca Phenomenex, utilizando-se uma coluna de fase reversa C-18 da Supelco. Os dados provenientes do detector de fluorescência, de marca Waters, modelo 474, e detector de arranjo de diodo, de marca Waters modelo 996, foram tomados em um computador, no qual o software Epower possibilitava todo o controle do sistema e tratamento dos dados.

O derivatizante *o*-fenilenodiamina (OPD) foi utilizado para a geração de quinoxalinas substituídas quando reage com substratos α -dicarbonílicos [121]. O procedimento consiste na adição de 125 μ L de ácido acético 0,50 M a 500 μ L de amostra em tampão fosfato 0,10 M, pH 7,4. Segue-se adição de 375 μ L de solução do derivatizante 0,10% (p/V) preparado em água e aquecimento das amostras em banho com agitação a 60°C por 1 h. Após filtradas, as amostras são injetadas (20 μ L) em HPLC, utilizando-se uma coluna C18 de 25 cm x 4,6 mm, partículas de 50 μ m, de marca Supelco. Como fase móvel, utilizou-se tampão acetato 20 mM, pH 4,2, filtrado, e adicionado de acetonitrila 4:6 (v/v). Eluição em regime de gradiente também foi utilizado em alguns experimentos, com rampa de 30% a 90% de metanol ao longo de 30 min. A detecção e quantificação das quinoxalinas foram feitas utilizando-se cromatogramas extraídos dos dados do detector PDA. O espectro UV/Vis típico para quinoxalinas correspondentes foi também analisado para validação dos picos, já que é bastante característico (Figura 11). Antes de aplicação às amostras, o método foi validado e a identidade dos picos confirmada por co-eluição dos compostos α -dicarbonílicos glicoxal, metilglicoxal e biacetilo, adicionados às amostras antes do procedimento de derivatização, bem como pela injeção de padrões comerciais quinoxalinol, quinoxalina, metilquinoxalina e dimetilquinoxalina.

Figura 11. Análise espectrofotométrica de compostos α -dicarbonílicos determinados após derivatização com OPD e separação cromatográfica de alta performance. Em (a) mostra-se o espectro de absorção do pico eluído em 4,8 min, correspondente a 2-metilquinoxalinol, aduto fluorescente, proveniente da derivatização de OPD com β -cetoácidos e/ou o α -cetoácido, piruvato. Em (b) mostra-se o espectro do pico eluído em 10 min correspondente à dimetilquinoxalina, aduto específico e pouco fluorescente derivado de biacetilo com OPD [122].

A curva-padrão dos compostos α -dicarbonílicos (Figura 12) foi obtida a partir da integração dos picos nos comprimentos de onda 236 nm e 314 nm. Embora a absorvidade das quinoxalinas seja maior para o comprimento de onda de 236 nm, que levaria ao aumento da sensibilidade do método, prefere-se a utilização de 314 nm, já que os cromatogramas apresentam menor número de picos contaminantes, além de os picos referentes aos adutos apresentarem melhor resolução.

Figura 12. Curva-padrão dos adutos α -dicarbonílicos/ OPD de biacetil em 314 nm (a) e 236 nm (b), metilglioxal em 314 nm (c) e 236 nm (d) e glioxal em 314 nm (e). Os protocolos de derivatização e análise estão descritos no texto.

3.9. Eletroforese em gel (SDS-PAGE) e *blotting* de amostras de Mb *in vitro*

Utilizou-se o sistema Invitrogen NuPAGE® Novex®, cuba SureLock®, com géis de 15 poços pré-preparados (1,0 mm espessura) num gradiente de 4 a 12% de acrilamida-bisacrilamida. Os géis não contêm nenhum desnaturante ou redutor,

somente sais tamponantes de ácido 2-(N-morfolino)etanosulfônico (MES). A adição de LDS Sample Buffer (NP# 0007)® à amostra e aquecimento por 5 min a 70°C confere o caráter desnaturante da eletroforese, bem como a adição de Reducing Agent (NP# 0004)®, o caráter redutor. O gel é corrido programando-se a fonte de alta voltagem a 200 V, constante por 35 min, sendo MES SDS (NP# 0002)® o tampão de corrida.

A transferência das proteínas do gel para membranas de nitrocelulose 0,45 µm foi realizada em sistema semi-seco BioRad™ utilizando-se tampão de transferência (192 mM glicina, 25 mM TRIS-base e 0,10% SDS) acrescido de 20% (V/V) de metanol, com voltagens e condições como descrito pelo fabricante.

As membranas, após o ciclo de transferência, foram coradas com solução Ponceau 0,10% em ácido acético 0,50% para confirmação da transferência.

A revelação de géis foi realizada utilizando-se solução do corante Coomassie Blue (BioRad™) por 2 h, seguido de várias incubações com solução descorante (metanol: ácido acético: água, 4:1:5 (V/V/V)) ou ainda a coloração por prata como descrito por Heukeshoven e Demick (1985) [123].

Para a realização de eletroforese em gel não-desnaturante, utilizou-se o protocolo descrito por Laemmli [140], entretanto sem a adição, tanto no tampão de amostra ou corrida, bem como na formulação dos géis, de compostos desnaturantes como SDS, 2-mercaptoetanol ou ditioneitol (DTT).

A densitometria das bandas em densidade ótica foi realizada com o software livre ImageJ v. 1.42q (NIH) utilizando o protocolo que acompanha o programa.

3.10. *Western blotings*

As membranas de nitrocelulose, após transferência, foram incubadas com PBS-T adicionado de gelatina de peixe 4% (v/v) por 16 h a 4°C para bloqueio dos sítios remanescentes de ligação a membrana. Após 3 lavagens de 5 min com tampão de lavagem (PBS-T adicionado de gelatina de peixe 0,2% (v/v)), o anticorpo primário preparado em tampão de lavagem foi incubado com as membranas por 2 h, sob leve agitação, a 25°C. Os anticorpos primários utilizados e seus títulos foram: primário policlonal anti-Mb produzido em cabras, 1:1000 (Bethyl Antibodies™), e primário policlonal anti-nitrona de DMPO produzido em coelho, 1:5000.

Após 3 lavagens de 5 min com tampão de lavagem, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado a fosfatase alcalina anti-anticorpos de cabra, 1:5000 (v/v), em tampão de lavagem, por 2 h sob leve agitação a 25°C.

No caso do anticorpo anti-nitrona de DMPO, utilizou-se anticorpo secundário conjugado a um fluoróforo (anti-anticorpos de coelho, 1:10000 em tampão de lavagem) com máximo de excitação em 800 nm. Com o auxílio de um leitor Odyssey (Li-Cor™), é possível a visualização num mesmo blot de até dois anticorpos secundários, um de excitação máxima em 800 nm e outro em 700 nm. Já que esta tecnologia utiliza os princípios da fluorescência induzida por laser, a detecção de antígenos é mais sensível, e, como a excitação ocorre na faixa do infravermelho, os blots não sofrem descolorimento significativo quando expostos a luz artificial.

Após 3 lavagens, os blots para nitronas de DMPO foram secos e em seguida escaneados em leitor Odyssey (Li-Cor™) para detecção.

Como substrato para a fosfatase alcalina foi utilizado CDP-Star® 0,25 mM (Tropix®, comercializado pela Applied Biosystems®) adicionado do sensibilizador Nitro-Block II™ (Applied Biosystems®).

3.11. Ensaio de ligação do Coomassie Blue à proteína

O corante Coomassie Blue G-250 é classicamente um dos corantes mais utilizados para a determinação de proteínas em soluções complexas. O ensaio de Bradford [124] utiliza a capacidade deste corante de ligar-se ao esqueleto carbônico de proteínas em meio ácido, fazendo com que o corante mude seu espectro de absorção do vermelho para o azul [125]. Foi utilizado este princípio para caracterização de alterações na

Figura 13. Curva-padrão para determinação de proteínas conforme método de Bradford modificado [125].

estrutura primária de Mb após reagir com H_2O_2 e β -cetoácidos, já que mudanças no esqueleto carbônico de proteínas, como clivagem, ou formação de carbonilas protéicas, diminuiriam a afinidade e porcentagem de corante ligado a estas regiões protéicas.

Recentemente, várias mudanças foram introduzidas no clássico ensaio de Bradford, dentre elas, a determinação do corante na sua forma ligada, ou azul (595 nm) expressa em relação à forma livre, ou vermelha (456 nm) trazendo ganhos de sensibilidade, na linearidade da curva padrão e na especificidade do ensaio [125].

O reagente de Bradford foi preparado dissolvendo-se 100 mg de Azul de Coomassie Brilhante G-250 em 50 mL de etanol 95%, seguida da adição de 100 mL de ácido fosfórico 85%, diluído para 1,0 L, e filtrado em papel filtro comum e condicionado em frascos âmbar até o seu uso [124]. O ensaio foi realizado em microplacas adicionando-se 10 μ L de amostra e 40 μ L de reagente de Bradford a 150 μ L de água. Após agitação e espera de 10 min, as absorvâncias em 450 nm e

595 nm foram determinadas e expressas como a relação $A_{595\text{nm}}/A_{450\text{nm}}$ [125]. O mesmo procedimento foi realizado para a curva-padrão na qual utilizou-se albumina sérica bovina como padrão (1 a 40 $\mu\text{g/mL}$).

3.12. Determinação de clivagem da hemeproteína utilizando-se o derivatizante fluorescamina

Fluorescamina é um derivatizante de aminas primárias largamente utilizada em ensaios de atividade de proteases. O reagente não fluorescente ao reagir em meio ligeiramente básico com aminas primárias gera adutos altamente fluorescentes (excitação 280 nm e emissão 520 nm). O procedimento padrão consiste em pipetar nos poços de placas pretas 4 μL de amostra, 191 μL de água, 15 μL de Na_2CO_3 1,0 M, pH 9,9, e 25 μL de fluorescamina 0,10% em acetona. Após 5 min de agitação a 25°C, a fluorescência dos adutos de fluorescamina nas placas é lida e expressa como unidades relativas arbitrárias [126].

3.13. Fluorescência direta de Mb modificada por oxidação

A fluorescência direta de hemeproteínas após reagirem com H_2O_2 reflete a concentração de produtos hemínicos degradados oriundos de lesão oxidativa [127]. Para esta determinação foi aferida a fluorescência das soluções de Mb após reação com H_2O_2 em várias concentrações, na presença dos β -cetoácidos, nos seguintes conjuntos de comprimentos de onda: 321 nm de excitação e 465 nm de emissão, e 460 nm de excitação e 525 nm de emissão.

3.14. Determinação do descoramento da Mb: destruição de heme extraível

Adotou-se a quantificação de heme extraível por HPLC fase reversa (coluna e pré-coluna C18 Luna®, 5 cm x 0,46 cm, marca Phenomenex™), utilizando fase móvel ácida (ácido trifluoroacético 0,050% em modo isocrático 40:60, acetonitrila: água (v/v), fluxo de 0,50 mL.min⁻¹). As amostras com Mb 25 µM, na presença ou ausência dos β-cetoácidos (10 mM), em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, a 25°C, foram adicionadas de H₂O₂ (0,125 mM a 2,50 mM, ou 1:5 a 1:100, M/M) imediatamente antes da primeira injeção (10 µL). A partir dos dados obtidos pelo detector PDA, o pico de heme autêntico foi integrado utilizando-se cromatogramas em 403 nm.

Para estes experimentos, preferiu-se adotar o procedimento de separação cromatográfica, pois havia o interesse de se caracterizar modificações oxidativas no grupo heme. Entretanto, não foi verificado nenhum outro pico nos cromatogramas obtidos.

3.15. Ensaios de ELISA

3.15.1. ELISA sanduíche para acetil-Mb

Nos poços de microplaca estéril transparente de fundo chato, média ligação (Greiner™), foram pipetados solução de anticorpo de captura *anti-pan acetyl C2* produzido em coelhos (Santa Cruz™) diluído a 5 µg mL⁻¹ de tampão carbonato 20 mM pH 9,5. Após incubação por 16 h a placa foi lavada 3 vezes com água destilada, seguida da incubação por 2 h com leite desnatado 5% em TBS-T. Após 3 lavagens com água destilada, amostras contendo 15 µg de Mb (50 µL) foram incubadas a 37°C por 1 h 30 min. Após este período, as placas foram lavadas 3 vezes com água

destilada e a cada poço foram adicionados 200 μL de solução do anticorpo de detecção anti-Mb produzido em cabra (Santa Cruz™) 1:500 em TBS-T com leite 3% por 2 h, a 25°C. Lavou-se a placa 3 vezes com água destilada e adicionou-se 200 μL de solução de anticorpo secundário conjugado a HRP anti-anticorpos de cabra produzido em burro 1:1000 em TBS-T por 2 h, a 25°C. Após 3 lavagens com água destilada, o ELISA foi revelado utilizando a hidrólise de TMB mediada por H_2O_2 e HRP (KPL™), segundo descrições do fabricante. A leitura da OD em 450 nm, após adição de ácido fosfórico 1,0 M (concentração final), é estável e linear à concentração para o antígeno ensaiado.

3.15.2. ELISA direto para nitrona DMPO-Mb, técnica de *immuno spin-trapping*

Para este ensaio, foram preparadas amostras de Mb 10 μM e DMPO 50 mM adicionadas de várias concentrações de H_2O_2 (1 μM a 1 mM), na presença ou ausência de AA ou MAA (1 a 50 mM). Após 2 h de reação a 25°C, adicionou-se CAT 250 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ às amostras, e após 5 min, transferidas para banho de gelo. As amostras foram então diluídas 15 vezes com tampão de ligação para ELISA (tampão carbonato 20 mM, azida sódica 0,020%, pH 9,6), e diluídas 3:1 (v/v) com tampão de amostra para eletroforese em gel.

As amostras diluídas com tampão de amostra para eletroforese em gel foram processadas para *Western blot* anti-nitrona de DMPO e coloração de gel como descrito no item 3.4 e 3.6 para a validação dos resultados de ELISA.

Em cada poço de placas estéreis brancas sólidas foram incubados 200 μL das amostras diluídas com tampão de ligação por 1 h a 37°C, ou 16 h a 4°C. Após uma lavagem com tampão de lavagem (PBS-T adicionado de gelatina de peixe 0,2% (V/V)), os poços foram preenchidos (300 μL) com gelatina de peixe 4% (V/V) em

tampão de ligação por 1 h a 37°C, para bloqueio dos sítios remanescentes de ligação a placa. Após uma lavagem, foram adicionados 200 µL de solução de anticorpo anti-nitrona DMPO policlonal produzido em coelho (desenvolvido no laboratório do Prof. Ronald P. Mason (NIH, USA)) 1:5000 em tampão de lavagem por 1 h, a 37°C.

Após 3 lavagens, adicionou-se aos poços da placa 200 µL de anticorpo anti-anticorpos de coelho conjugado a fosfatase alcalina 1:500 em tampão de lavagem por 1 h, a 37°C. Após 3 lavagens, o ELISA foi revelado utilizando-se o substrato luminescente CDP-Star® (Tropix™, comercializado pela Applied Biosystems™) 25 µM em TBS pH 9,6. A leitura da luz emitida foi realizada utilizando-se um leitor de microplacas Tecan®, modelo Infinite M200.

3.16. Determinação da temperatura de desnaturação de Mb

Amostras de Mb nativa (50 µM), e Mb previamente tratada com H₂O₂ 1:25 e na presença de AA ou MAA (50 mM) foram preparadas em tampão fosfato 200 mM, pH 7,4 por 2 h a 37°C.

As amostras de Mb (50 µM) foram concentradas por filtração molecular em filtros de corte de 10 kD (Centicron®, Millipore®). Para o ensaio de desnaturação, utilizou-se o protocolo descrito por Olsen (1994) [128], no qual a proteína é diluída em tampão MOPS 50 mM, pH 7,0, contendo guanidina 0,90 M e K₃Fe(CN)₆ 0,10 mM. As amostras em cubetas vedadas, sob agitação a cada 1,5 min, eram aquecidas de 1°C sendo a absorbância medida a 403 nm. Os valores de absorbância em 403 nm *versus* a temperatura foram ajustados a curvas de Boltzman ($R^2 > 0,99$), das quais a temperatura de desnaturação foi obtida.

3.17. Espectrofotometria de dicroísmo circular (CD)

O equipamento Jasco J-720 foi utilizado para aquisição dos espectros de dicroísmo circular. Para as determinações no UV distante (190-260 nm), cubetas cilíndricas de caminho óptico de 1 mm foram utilizadas, enquanto que para as varreduras no UV próximo (250-380 nm) e na região da banda *Soret* (600-270 nm ou 370-450 nm) foram utilizadas cubetas de 5 mm [129]. As leituras foram realizadas com resolução de 0,5 nm e velocidade de 10 nm/min. Amostras de Mb 250 μ M com AA ou MAA 25 mM e várias concentrações de H_2O_2 (1:1-1:25 ou 0,25-6,25 mM) foram preparadas em tampão fosfato 200 mM, pH 6,0, e mantidas sob agitação a 37°C. Após 2 h, estas amostras foram diluídas 10 vezes em água e incubadas em gelo até a leitura. Foi adotado o mesmo procedimento descrito anteriormente para as amostras nas quais H_2O_2 foi gerado em fluxo pelo sistema glicose (5 mM adicionado ao tampão) e glicose oxidase (50 mU.mL⁻¹).

Após aquisição dos dados, os espectros de dicroísmo circular foram subtraídos dos valores de branco (tampão ou tampão mais glicose), atenuados e normalizados a desvio dicróico (mdeg.cm⁻².dmol⁻¹) utilizando-se o *software* do equipamento.

3.18. EPR e simulação de espectros

Os espectros de EPR foram obtidos a 25°C em um aparelho Bruker EMX dotado de uma cavidade HighQ. Os espectros que não indicam tempo no qual foram adquiridos, foram traçados após 3 min da incubação dos reagentes. A aquisição dos espectros foi realizada através do *software* WinEPR. Condições instrumentais: Potência de micro-onda 20 mW; Constante de tempo, 83 ms; Velocidade de

varredura, 1 G/s; Modulação de amplitude 0,5 G; Ganho $2,0 \times 10^4$; Frequência de microonda 9,18 GHz.

O agente de captação de spin metil-nitrosopropano (MNP) [130] foi preparado (0,50 M) em frasco âmbar utilizando-se acetonitrila como solvente. A solução foi preparada com no mínimo 3 h de antecedência à utilização nos experimentos.

A simulação de espectros foi realizada através do *software* livre WinSim, versão 0.96. Este *software* permite a simulação de espectros mistos, bem como mede a correlação entre o experimental e o simulado, com porcentagem de cada sinal para composição do espectro original [131].

3.19. Animais e Código de Ética para Experimentação Animal

Para os experimentos utilizou-se ratos da raça Wistar com 3 meses de idade, aproximadamente 250 g, provenientes do Biotério do Conjunto das Químicas ou do Charles River (Raleigh, NC, USA).

Experimentos iniciais foram realizados no NIEHS/ NIH, Carolina do Norte, EUA, após o Comitê Institucional de Ética para Experimentação Animal aprovar e realizar, junto ao pesquisador, experimento-piloto para verificar o estado físico dos ratos, bem como a adequação de procedimentos visando melhorias no conforto e bem-estar animal. Os seguintes procedimentos foram incorporados aos protocolos experimentais: (i) utilização de pentobarbital como anestésico/ sedativo; (ii) utilização de Alpha-dri® como cobertura das caixas, para prevenção do desconforto devido a injeção im de grandes volumes nas patas e provável sensação de desconforto muscular; e (iii) oferta de ração moída e molhada servida em placas de Petri no chão das caixas dos animais em recuperação.

Todos os preceitos éticos recomendados pelas normas COBEA, pelo Comitê de Ética Institucional do IQ-USP e pelo NIEHS/ NIH foram adotados durante todos os experimentos.

3.20. Modelo-animal de indução a rabdomiólise

Os animais foram privados do acesso a água 18 h antes da indução da rabdomiólise. Após serem sedados e anestesiados pela injeção ip de pentobarbital 10% (m/v) ($0,35 \text{ mL.kg}^{-1}$), a indução da rabdomiólise foi feita pela injeção im de solução de glicerol 50% (V/V) na dose de 10 mL.kg^{-1} . Animais-controle foram injetados pela mesma via e dose com solução salina fisiológica [132]. A dose total foi dividida em dois volumes iguais, sendo aplicada em três pontos dos músculos das patas evitando-se injeções próximas à região do nervo ciático.

3.21. Sacrifício, coleta de órgãos e determinações bioquímicas

Após sedados com pentobarbital 10% ($0,35 \text{ mL.kg}^{-1}$) ou xilazina 10%/quetamina 10% (0,4 mL xilazina adicionada de 0,2 mL quetamina/kg), amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca, seguida de sacrifício por guilhotinamento. Fígado, rins, coração e urina (punção da bexiga) foram coletados e congelados instantaneamente em nitrogênio líquido. Em alguns experimentos, o rim direito foi fixado em solução de formalina neutra 10% com posterior processamento para análise histológica. O soro foi obtido por centrifugação (1.000 g por 10 min, 4°C) do sangue imediatamente após a coagulação (15 min a 37°C , seguido de 10 min a 4°C), sendo aliquoteado e congelado instantaneamente em nitrogênio líquido para posterior análise.

As seguintes determinações em soro foram realizadas, utilizando-se kits comerciais (Doles®, Brasil): creatinina (CREA), compostos nitrogenados séricos (BUN), glicose, proteína, potássio, cloretos, e atividade das enzimas creatina quinase (CK), fosfatase alcalina (Fosf Alk), alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST).

As atividades de glioxalase I (GLOI) em fígado e rim foram determinadas usando-se o protocolo descrito por McLellan, Thornalley, Benn e Sonkesen (1994) [133]. Em resumo, após adição de amostra ao sistema de reação (tampão imidazol 200 mM, pH 7,0, com MgSO_4 16 mM, GSH 1,0 mM e metilglioxal 7,9 mM) acompanha-se a absorbância em 240 nm para a formação de S-D-lactoilglutathione, cujo coeficiente de extinção molar é $3,37 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

A concentração de proteínas nas amostras foi determinada pelo método de Folin [134].

3.22. Cultura de células C2C12

A linhagem de células miogênicas murinas C2C12, isoladas de rabdomiosarcoma murino, caracterizadas como células satélites miogênicas, foram mantidas em meio de cultura DMEM suplementado com penicilina $100 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$, estreptomicina $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, e soro fetal bovino 10% (V/V). Ao alcançarem 80% de confluência, a diferenciação das células a miotubos, ou fibras musculares, foi induzida pela diminuição do SFB do meio de cultura para 5%. A diferenciação se completa em 7-8 dias, quando as células aderentes de formato fibroblástico fundem-se, formando células bastante alongadas multinucleadas, que apresentam capacidade de contração [135]. Todas as culturas foram mantidas a 37°C em

incubadora com atmosfera humidificada de 5% CO₂ e 95% de ar, e o meio de cultura era trocado a cada 2 dias.

3.23. Tratamento das células C2C12 com os compostos β -cetoésteres e estudo da toxicidade destes compostos

Células C2C12 foram semeadas em placas de 96 poços, na densidade de 10⁴ células por poço. No dia seguinte, verificada a confluência da cultura, as placas tiveram seu meio substituído para meio DMEM adicionado de SFB 5%, para diferenciação. Após 8 dias, o meio de cultura dos miotubos foi substituído por 90 μ L/poço de DMEM sem soro. Para o tratamento, adicionou-se aos poços 10 μ L de AAE, MAAE, AA, MAA, glicose oxidase (GOX) ou H₂O₂, diluídos ou solubilizados em solução salina tamponada com sais de fosfato (PBS).

Após 22 h, aos 100 μ L de meio de cultura foi (i) adicionado 10 μ L a cada poço de solução de MTT (solução estéril de MTT 10 mg.mL⁻¹ mantido a -4°C), ou (ii) coletado e substituído por 100 μ L de meio de cultura DMEM sem soro para então adicionar-se a solução de MTT. Após cerca de 2 h, as placas foram vertidas e a cada poço foram adicionados 100 μ L de DMSO para solubilização dos cristais de formazan intracelulares [136]. Poços-controle nos quais, durante todo o período de tratamento (22 h, mais 2 h na presença do sal de MTT), foi utilizado DMEM adicionado de SFB 5%, ou DMEM puro, ou ainda 90 μ L de DMEM puro adicionado de 10 μ L de PBS, mostraram o mesmo valor de viabilidade celular pelo teste MTT e nenhuma diferença visível ao microscópio de luz foi verificada. Após 2 h no escuro e sob agitação, fez-se a leitura da absorção em 570 nm (correspondente as células em atividade metabólica) e 650 nm (debris celulares).

3.24. Quantificação de Mb pela concentração de apoproteína e atividade peroxidásica em extratos de células

Em dias pré-determinados, contados a partir do dia da substituição do meio de manutenção para o de diferenciação, células a serem coletadas, cultivadas em placas de 6 poços, tiveram seu meio de cultura aspirado. Após lavadas com PBS, as células foram raspadas utilizando-se rodo com 1 mL de PBS e coletadas para tubos Eppendorf. Após sonicadas em banho de gelo

Figura 14. Curva-padrão do ensaio de ELISA de apoproteína de mioglobina. No ensaio (vide texto), verificou-se linearidade até 500 ng.mL⁻¹ de Mb com alta correlação ($R^2 > 0,95$).

por 2 min em 4 pulsos de 30 s e descansos de 30 s, os extratos foram clarificados por centrifugação (10.000 g por 10 min, 4°C). A concentração de proteínas totais nas amostras clarificadas foi determinada pelo método clássico de Folin [134].

A quantificação da apoproteína de Mb foi feita através de um ensaio de ELISA contra Mb. Após 3 h da ligação da amostra à placa (10 µg de proteína do extrato celular em 100 µL do tampão carbonato/bicarbonato 100 mM, pH 9,6), bloqueou-se a placa por 2 h com solução de albumina 1% em PBS-T (200 µL), seguida da incubação por 2 h com anticorpo primário (100 µL por poço, 1:500 em PBS-T), anti-Mb de cabra (sc-8081, Santa Cruz™), seguida de 1 h do anticorpo secundário (100 µL por poço, 1:2000 em PBS-T), anti-anticorpos de cabra conjugado a HRP (sc-2020, Santa Cruz™). Entre todas as etapas descritas anteriormente e após a incubação com o anticorpo secundário, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T. A revelação do ELISA foi feita utilizando-se 100 µL do reagente de TMB do

kit comercial da KPL™. O desenvolvimento da cor foi interrompido utilizando-se 50 μL de H_3PO_4 (diluído 1:1 em água, V/V). Todas as incubações foram realizadas a 37°C . A leitura da absorbância em 450 nm de uma curva-padrão é expressa contra a concentração de Mb (0,001 a $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Neste ensaio, observou-se linearidade até 500 ng.mL^{-1} de Mb, cuja reta de regressão mostrou alta correlação ($R^2 > 0,95$) entre os níveis de Mb e absorção em 450 nm (Figura 14). Para cada análise de ELISA, repetiu-se a curva-padrão na faixa de 5 a 500 ng.mL^{-1} de Mb.

A atividade peroxidásica dos extratos foi determinada pelo método descrito por O'Brien e colaboradores (1992) [137], com algumas modificações para a realização em microplacas de 96 poços e *o*-dianisidina. Utilizou-se 20 μL de extrato celular, adicionou-se 20 μL de água, ou cianeto de potássio 20 mM para preparo de amostras-controle, seguido de 40 μL de *terc*-butilhidroperóxido 1,0 M em

Figura 15. Curva-padrão do ensaio de atividade peroxidásica de mioglobina. No ensaio (vide texto), verificou-se linearidade até $50 \mu\text{M}$ de Mb com alta correlação ($R^2 > 0,99$).

PBS e 120 μL de *o*-dianisidina 0,40 mM em PBS. Após incubação por 30 min a 37°C , a reação é interrompida com 50 μL de H_2SO_4 6,0 M. A leitura da absorbância em 540 nm da curva-padrão é expressa contra a concentração de Mb (0,1 – $200 \mu\text{M}$). Neste ensaio, observou-se linearidade até $20 \mu\text{M}$ de Mb. A reta de regressão mostrou alta correlação ($R^2 > 0,99$) entre os níveis de Mb e absorção em 540 nm (Figura 15).

3.25. Sacrifício e retirada cirúrgica dos músculos sóleo e plantar

Os animais foram colocados em jejum de 6 h antes do sacrifício. Após sedados com xilazina 10% associada a quetamina 10% (0,4 mL xilazina adicionada de 0,2 mL quetamina por kg), os animais foram sacrificados por guilhotinamento. Foram removidos cirurgicamente os músculos sóleo e plantar das pernas dos animais (Figura 16). Após lavagem em PBS, os tecidos foram mantidos a 37°C em meio de manutenção de tecidos (meio Krebs-Hanseleit sem cálcio, com os seguintes componentes: NaCl 114,45 mM, KH_2PO_4 1,2 mM, KCl 5,0 mM, NaHCO_3 24,0 mM, MgCl_2 1,0 mM, borbulhado com carbogênio, acertado o pH para 7,4 com HCl e adição de glicose 8 mM e manitol 32 mM) [138, 139]. Após testes para integridade muscular (verifique item 3.26, Figuras 17 e 79), verificou-se que os músculos sóleo e plantar mantêm-se viáveis e preservados durante todo o tempo de sua extração cirúrgica e ainda por até 8 h incubados no meio descrito acima sob constante borbulhamento do gás carbogênio.

Figura 16. Procedimento para extração cirúrgica dos músculos sóleo e plantar da perna de ratos.

3.26. Cultura do tecido muscular e determinações bioquímicas

Após a coleta de todos os músculos (menos de 2 h para 5 animais), cada peça de músculo plantar ou sóleo foi colocada em um poço de uma placa de 6 poços com 7,5 mL de meio de manutenção por poço, ou placas de 12 poços com 4 mL de meio de manutenção por poço. O meio foi mantido sob constante borbulhamento de gás carbogênio (5% CO₂ e 95% ar) por um sistema de mangueiras e agulhas (vide Figura 17). As placas foram mantidas em incubadora a 37°C.

As atividades enzimáticas foram determinadas em meio de cultura, utilizando-se kits comerciais (Doles®, Brasil) para lactato desidrogenase (LDH), creatina quinase (CK) e aspartato aminotransferase (AST). A concentração de proteínas nas amostras foi determinada pelo método de Folin [134].

Figura 17. Representação esquemática do banho de órgãos montado para manutenção dos músculos em cultura sob constante borbulhamento de gás carbogênio por até 8 h. As placas de 6 ou 12 poços foram mantidas a 37°C dentro de incubadora climatizada.

3.27. Eletroforese em gel de proteínas do meio de cultura

Para SDS-PAGE, foi utilizado o protocolo de Laemmli [140], com emprego de gel de corrida a 12% e empilhamento a 4%. Amostras de meio de cultura foram

diluídas 1:1 (V:V) com tampão de amostra 4X para que a análise quantitativa pela densitometria das bandas do géis fosse referente às abundâncias das proteínas por volume do meio de cultura nos diversos tratamentos. Amostras de homogenatos de tecidos e células clarificados por centrifugação (10.000 g por 10 min, 4°C) foram preparadas de modo a ser aplicado 10 µg de proteína da amostra por poço do gel.

4. Resultados e Discussão

4.1. Atividade peroxidásica de HRP e Mb sobre compostos β -cetoésteres e β -cetoácidos na presença de H_2O_2 em meio aerado. Alterações espectrais e estudos do papel dos radicais protéicos de Mb

Ensaio realizado com HRP (5 μ M), cuja forma nativa contém Fe^{III} , na presença de H_2O_2 equimolar, e o composto β -dicarbonílico acetilacetona (100 μ M), reproduziram os dados de literatura descritivos para a reciclagem da enzima nativa (absortividade máxima da banda *Soret* em 403 nm) para composto I (evidenciado por um desvio da banda *Soret* para 405 nm), seguida da geração do composto II (absortividade máxima em 420 nm), e em seguida restauração de HRP nativa, concomitante ao consumo de acetilacetona. Este foi monitorado no comprimento de onda máximo de absorção do composto, 280 nm (Figura 18).

A reciclagem da enzima atesta que acetilacetona é oxidada pela HRP compostos I e II. Após 90 minutos, ao adicionar novamente H_2O_2 equimolar e 100 μ M acetilacetona, verifica-se, novamente, consumo do substrato β -dicarbonílico. Esta análise espectral evidencia que a enzima realmente retornou ao seu estado nativo, ou seja, houve duas reduções unieletrônicas do substrato pelos compostos intermediários da enzima.

Figura 18. Variação temporal dos compostos intermediários de HRP na presença de acetilacetona. Monitoramento do consumo de acetilacetona, pela sua absorção máxima em 280 nm, por HRP nativa (5 μ M) a partir da adição de H_2O_2 (5 μ M), bem como a geração do composto II (420 nm) e seu decaimento para o estado nativo (403 nm). Após 90 minutos adicionou-se novamente H_2O_2 (5 μ M) e acetilacetona (100 μ M). Sistema montado em tampão fosfato 0,10 M, pH 7,4 a 37°C.

Utilizando-se do mesmo sistema de reação (HRP 5 μ M, com H_2O_2 5 μ M, em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, a 37°C), avaliou-se a reciclagem da enzima quando na presença de AAE (2 mM) (Figura 19a) e MAAE (1 mM) (Figura 19b). Verificou-se que a reciclagem da enzima ocorreu com retorno do composto II ao estado nativo, indicando que o AAE e MAAE são oxidados pelos compostos intermediários de HRP de maneira análoga à acetilacetona.

Figura 19. Variação temporal das concentrações dos compostos intermediários de HRP na presença de β -cetoésteres. Acompanhamento da absorção de luz nos comprimentos de onda de 420 nm (Composto II) e 403 nm (proteína nativa), em soluções de HRP (5 μ M) adicionada de H_2O_2 (5 μ M), quando na presença de (a) AAE (2 mM) ou (b) MAAE (1 mM). Sistema preparado em tampão fosfato 0,10 M, pH 7,4 a 37°C.

Mioglobina exposta a H_2O_2 e MAA também sofre mudanças espectrais na região do visível (de 350 a 700 nm), pelas quais se pode avaliar o decaimento dos intermediários oxidantes desta hemoproteína.

Inicialmente, utilizou-se oxiMb Fe^{II} (20 μ M), adicionada de H_2O_2 equimolar, como catalisadora da reação de oxidação de MAA (de 50 a 0,05 mM), em tampão fosfato 0,20 M, pH 7,4, a 37°C (Figura 20). A análise dos espectros de absorção ao longo do tempo mostra o decaimento de oxiMb (Fe^{II}) a metaMb (Fe^{III}) dose-dependente de MAA (cálculo descrito no item 3.2). Nas duas maiores concentrações do substrato, 50 e 25 mM, houve total oxidação da hemoproteína em 5 min após iniciada a reação. Para as concentrações intermediárias de MAA, 10 e 2 mM, observou-se cinética bimodal, com uma queda inicial mais acentuada, seguida de uma contínua queda do conteúdo de oxiMb numa velocidade superior quando comparado às menores concentrações de MAA utilizadas no ensaio. O decaimento

de oxiMb na presença de 50 mM de MAA, sem a adição de H_2O_2 , se mostrou linear até sua total conversão à metaMb após 50 minutos (Figura 20).

Sabendo-se da geração de ferrilMb na reação de metaMb com H_2O_2 , buscamos avaliar o consumo da espécie ferrilMb intermediária pelo β -cetoácido. Para MAA observa-se uma clara dose-dependência para as quatro maiores concentrações utilizadas (50, 25, 10 e 2 mM). Já para as três menores concentrações de MAA, o consumo de ferrilMb é muito semelhante ao decaimento espontâneo de ferrilMb em solução. Sabendo-se que para as menores concentrações de MAA não foi possível a determinação de biacetilo e em conjunto com os resultados de decaimento/consumo de ferrilMb, parece que para as três menores concentrações de MAA, há preponderantemente o decaimento espontâneo desta espécie ferrilMb e não seu consumo pelo substrato (Figura 21).

Quando se monitora consumo/decaimento de ferrilMb utiliza-se as bandas de absorção no visível para o cálculo, que demonstram o ambiente do grupo heme. Como relatado no item 1.3, a reação de H_2O_2 com peroxidases hemínicas gera um composto com dois equivalentes de oxidação superior ao estado basal, que é capaz de realizar dois passos unieletrônicos de oxidação do substrato.

Figura 20. Determinação de decaimento de oxiMb (Fe^{II}) a metaMb (Fe^{III}) por MAA. Amostras com 20 μM oxiMb (Fe^{II}), 20 μM H_2O_2 , e diversas concentrações de MAA tiveram seus espectros de absorção de luz traçados a cada 2,5 min, e o conteúdo de cada espécie de Mb foi determinado como descrito no item 3.2. Sistemas preparados em tampão fosfato 0,20 M, pH 7,4, mantidos a 37°C.

Figura 21. Decaimento do conteúdo de ferrilMb na presença de diversas concentrações de MAA. Os espectros de absorção de luz de amostras com metaMb 20 μM , H_2O_2 20 μM , na presença de diversas concentrações de MAA, foram traçados ao longo do tempo, e a concentração de ferrilMb determinada como descrito no item 3.2. Sistemas montados em tampão fosfato 0,20 M, pH 7,4, mantidos a 37°C.

Em Mb, um dos elétrons é hemínico, avaliado pelo decaimento/consumo de ferrilMb. Para a monitoração do segundo equivalente de oxidação, utilizou-se dois

protocolos experimentais em que Mb com um radical centrado na porção apoprotéica é captado por agentes de captação de spin seguidos de sua separação, detecção e quantificação.

No primeiro protocolo, segundo a metodologia de Kelman e colaboradores (1996) [66], o radical de Mb captado por DBNBS é separado da proteína nativa por cromatografia nativa em gel. O aduto Mb-DBNBS, ao ser reduzido por ascorbato, confere maior carga negativa à proteína, a qual, por isso, migra mais em relação à proteína não-radicalar e, portanto, não ligada ao DBNBS.

Alíquotas de amostras nas quais adicionou-se H_2O_2 equimolar e MAA 50 mM a metaMb 65 μM , (8 μg de proteínas totais por poço no gel), foram coletadas e preparadas em tempos pré-determinados (Figura 22, a-g). Controles representativos da proteína nativa (Figura 22 h), da proteína na forma meta adicionada de H_2O_2 após 0 min (Figura 22 i), e após 2 h (Figura 22 j) foram preparados. Verificou-se que não há redução dos níveis de proteína apo-radical ao longo do tempo, diferentemente do conteúdo de ferrilMb (vide Figura 21).

Figura 22. Efeito de MAA sobre a geração de Mb-DBNBS ao longo do tempo da reação de MAA com Mb/H₂O₂. Amostras de metaMb 62,5 µM, na presença de 50 mM de MAA e H₂O₂ 62,5 µM, foram coletadas sendo (a) 0 min, logo após a adição de H₂O₂; (b) 5 min; (c) 15 min; (d) 30 min; (e) 45 min; (f) 60 min; (g) 2 h; em (h) amostra de metaMb 62,5 µM; amostras de ferrilMb-DBNBS geradas e processadas a partir de metaMb (62,5 µM) (i) logo após a adição de H₂O₂ equimolar, e (j) após 2 h de incubação. As condições da eletroforese e coloração do gel estão descritas no item 2.5.

Em outro ensaio, a hemeproteína adicionada de H₂O₂ equimolar, foi exposta a diversas concentrações de MAA (0,20 a 4,0 mM), e as amostras foram coletadas e rapidamente preparadas após 1 h do início da reação pela adição do H₂O₂ (Figura 23, a-f). Amostras-controle de proteína nativa (Figura 23 g) e amostras da proteína ferrilMb com apo-radical (Figura 23 h) foram preparadas. Verificou-se que há dose-dependência de MAA para o conteúdo de proteína nativa, indicando que ocorre transferência do radical da apoproteína de Mb para o substrato, sendo facilitada quando o substrato encontra-se em altas concentrações.

Figura 23. Efeito da concentração de MAA sobre a geração de Mb-DBNBS após 1 h da reação de MAA com Mb/H₂O₂. Amostras de metaMb 62,5 µM, com adição equimolar de H₂O₂, na presença de várias concentrações de MAA, sendo (a) 200 mM; (b) 100 mM; (c) 50 mM; (d) 20 mM; (e) 4 mM; (f) sem adição de MAA, foram coletadas e processadas após 1 h de incubação a 37°C, como descrito no item 3.3. Em (g) amostra de metaMb (62,5 µM), e (h) amostra de ferrilMb-DBNBS, gerada a partir de metaMb (62,5 µM) processada logo após a adição de H₂O₂ equimolar. As condições da eletroforese e coloração do gel estão descritas no item 2.5. Os valores de densitometria óptica da banda superior do gel (proteína nativa), estão mostrados em proporção à OD total da canaleta.

Os experimentos utilizando DBNBS para captação de radicais protéicos atestaram claramente que MAA reage com os radicais protéicos produzidos por Mb adicionada de H₂O₂. Surpreendentemente, ao longo do tempo, a concentração do aduto Mb-DBNBS é mantida constante ainda que houvesse β-cetoácido livre para reação. Entretanto, um número crescente de evidências sugere que DBNBS não é

adequado para quantificações de adutos para radicais protéicos, pois esta molécula pode adicionar-se a proteínas via mecanismos não mediados pela captação de spin, gerando resultados falsos positivos.

Deste modo, utilizando-se uma segunda metodologia, batizada de *imuno spin-trapping* para o aduto nitrona de Mb-DMPO, foi possível mostrar que ambos β -cetoácidos diminuem a concentração de radicais protéicos em Mb na presença de H_2O_2 1:10 (Figura 24.a). Nesta metodologia, quantificações mais acuradas via imunoensaios de ELISA são possíveis de serem realizados, embora devam sempre ser confirmados por ensaios de *Western blot* das amostras devido a artefatos oriundos da metodologia de ELISA.

Após contra-checados com *Western blots*, análises estatísticas de regressão dos valores obtidos nos ensaios de ELISA revelaram que, usando MAA, embora no limite de confiança estatística, observa-se que a taxa de diminuição da concentração de adutos Mb-DMPO é 1,3 vezes maior que para AA (Figura 24 b).

A reta de regressão conjunta para os dados indica que as retas descritas para AA e MAA não são paralelas (p -valor para o fator de interação igual ou inferior a 0,01) e, portanto, há efeito diferenciado para os β -cetoácidos, pois descrevem duas retas com valores diferentes de inclinação (Figura 24 b).

De maneira similar, utilizando diferentes concentrações de H_2O_2 (de 1:0,1 a 1:100, Mb: H_2O_2), verificou-se que a adição de 10 mM dos β -cetoácidos diminui a concentração de adutos Mb-DMPO na ordem de sua reatividade, sendo que MAA diminui em 73,5% e AA 54,3%, quando comparados às amostras-controle (sem adição dos cetoácidos) (Figura 25).

Fica claro que o colapso da concentração dos adutos de Mb-DMPO está ligado à reatividade dos compostos β -cetoácidos estudados, mas que a

concentração destes compostos parece ser o fator principal a ser considerado, já que a reação deste radical protéico centrado em carbono, embora, bastante reativo, tem como aparente limitação a acessibilidade ao substrato (Figura 21-25).

O conjunto destes dados permite aventar que a oxidação dos cetoácidos ocorre também pelo radical tirosinila 103 da Mb, em conjunto com o radical hemínico. De maneira menos confiável, pode-se cogitar que outros radicais centrados em diferentes resíduos (triptofano 14, principalmente [141, 66]) possam ser captados e contribuir com o sinal de captação.

Figura 24. Efeito da concentração de AA e MAA no rendimento final de radicais protéicos de Mb captados por DMPO. Amostras de Mb (10 μ M) adicionada de H₂O₂ 100 μ M (1:10), na presença de diversas concentrações de AA (linhas pretas) ou MAA (linhas vermelhas) (0,5-50 mM) e DMPO 50 mM, tiveram seu conteúdo de radicais protéicos determinados por ELISA *imuno spin-trapping* anti-DMPO. Condições experimentais descritas no item 3.15.2. Em (b) a concentração do β -cetoácido está transformada (transformação logarítmica), para linearização dos dados, possibilitando a análise estatística por regressão linear conjunta (vide texto).

Figura 25. Efeito de AA e MAA e H₂O₂ no rendimento final de radicais protéicos de Mb captados por DMPO em função da concentração de H₂O₂. Amostras de Mb (10 µM) adicionada de H₂O₂ 1 µM a 1 mM (1:0,1 a 1:100) (preto), na presença de AA (vermelho) ou MAA (verde) 10 mM, e DMPO 50 mM, tiveram seu conteúdo de radicais protéicos determinados por ELISA *imuno spin-trapping* anti-DMPO. Condições experimentais descritas no item 3.15.2. A análise estatística via regressão descrita no texto refere-se aos dados de valor de ELISA obtidos para H₂O₂:Mb até 10 (vide texto).

4.2. Cinética do consumo de H₂O₂ e AA pelo sistema AA/Mb

A Figura 33 ilustra os experimentos realizados para se medir o consumo de H₂O₂ pelo sistema metaMb/ H₂O₂ 1:10, sob diversas concentrações de AA.

Neste experimento, um minuto após a coleta de amostra, grande parte do H₂O₂ adicionado já fora consumido. Portanto, após várias padronizações (vide item 3.4), preferiu-se medir a velocidade de consumo de H₂O₂ após 3 min, mostrando-se linearmente correlacionada até 45 min ($r^2 \geq 0,98$). Ao estipularmos esta velocidade, medimos a velocidade de consumo de H₂O₂ pela reciclagem da Mb, que após um ciclo peroxidásico, reage novamente com outra molécula de H₂O₂ para gerar novamente o composto I.

Figura 26. Dependência da velocidade de consumo de H₂O₂ por Mb em função da concentração de AA. Após 30 s da adição de H₂O₂ iniciou-se a determinação, a cada 1 min, por 7 minutos, da concentração de H₂O₂, utilizada posteriormente para o cálculo da velocidade, como descrito no item 3.4. Condições experimentais: Amostras de metaMb 50 μM e H₂O₂ 500 μM (1:10), na presença de diversas concentrações de AA, em tampão fosfato 0,20 M, pH 7,4, a 25°C.

Foi possível ajustar os dados de velocidade de consumo de H₂O₂ a uma exponencial de segunda ordem, evidenciando duas etapas: a primeira consome H₂O₂ mais rapidamente, o que deve ser atribuído à reação com a espécie ferril, já que a baixas concentrações do β-cetoácido, esta espécie se acumula, decaindo ou reagindo com novas moléculas de H₂O₂; a segunda fase, com menor velocidade de consumo de H₂O₂, deve ser atribuída à reciclagem de Mb, refletindo a velocidade de reação da espécie ferril com o β-cetoácido, a qual é dependente da concentração deste reagente.

Ao avaliarmos o consumo de AA por Mb (50 μM) adicionada de H₂O₂ 1:1 (Figura 27 a-b), verificou-se forte correlação entre a velocidade inicial de consumo do reagente e sua concentração inicial, portanto, a maior velocidade inicial no ensaio, foi obtida para a maior concentração inicial de AA, 50 mM, cuja velocidade inicial foi de 1,16 μmol.min⁻¹.

Já para o sistema adicionado de H_2O_2 1:10 (500 μM) (Figura 27 c-d), houve forte correlação entre a velocidade inicial de consumo de AA até a concentração inicial de reagente 30 mM, com proporcional diminuição da velocidade inicial de consumo do reagente para as concentrações 40 e 50 mM, provavelmente devido à aniquilação entre os radicais iniciais do substrato. Deste modo, para amostras adicionadas de H_2O_2 1:10, a maior velocidade inicial foi obtida para AA 30 mM, ou seja, 0,99 $\mu\text{mol}.\text{min}^{-1}$, o que hipoteticamente seria obtido com 45 mM de AA tratado com H_2O_2 na proporção 1:1.

Figura 27. Velocidade inicial de consumo de AA por Mb adicionada de H_2O_2 (a) 1:1 ou (c) 1:10. Correlação entre velocidade inicial de consumo de AA e concentração de AA em amostras de Mb 50 μM , adicionadas de H_2O_2 50 μM (1:1) (a-b) e 500 μM (1:10) (c-d), preparadas em tampão fosfato 200 mM, pH 7,4, a 25°C.

Com os resultados prévios, houve a necessidade de se determinar o efeito de diferentes proporções de Mb:H₂O₂ na velocidade inicial de consumo de AA. Os resultados mostrados na figura 28 indicam que, no caso de amostras contendo Mb 50 µM, na presença de AA 25 mM, há aumento da velocidade inicial de consumo do β-cetoácido até 1:5 de H₂O₂ (250 µM), seguida da diminuição dose-dependente da velocidade inicial até 1:100 de H₂O₂. De fato, há praticamente inibição completa do consumo de AA quando 1:100 de H₂O₂ (5 mM) foi utilizado.

Figura 28. Velocidade inicial de consumo de AA por Mb adicionada de diversas concentrações de H₂O₂ (1:1 a 1:100). A velocidade inicial de consumo de AA foi determinada em amostras de Mb 50 µM, AA 25 mM, adicionadas de H₂O₂ 50 µM a 50 mM (1:1 a 1:100), preparadas em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, a 25°C.

4.3. Cinética do consumo de oxigênio pelo sistema β-cetoácido/Mb/ H₂O₂

Monitorando-se o consumo de oxigênio pelo sistema metaMb (20 µM)/ H₂O₂ equimolar para diferentes concentrações dos dois β-cetoácidos estudados (Figura 29), verifica-se que há dose-dependência no consumo de oxigênio até a concentração de 50 mM.

Figura 29. Efeito da concentração de MAA ou AA na cinética de consumo de oxigênio catalisada por Mb/H₂O₂ 1:1. A variação temporal da concentração de O₂ foi determinada em amostras de metaMb 25 μM e H₂O₂ 1:1 (25 μM) na presença de várias concentrações de (a) AA e (b) MAA, em tampão fosfato 0,10 M, pH 7,4, a 37°C.

De acordo com Giulivi e Cadenas (1993) [93], o maior rendimento de ferrilMb é observado quando a concentração de H₂O₂ excede em dez vezes aquela da hemeproteína. Desta forma, acompanhando-se a cinética de consumo de oxigênio pelo sistema metaMb (20 μM), adicionada de 1:10 de H₂O₂, estimulado por diversas concentrações de MAA, verificou-se consumo total do oxigênio dissolvido em menos de 13 min por β -cetoácido 50 mM (Figura 30).

Figura 30. Efeito da concentração de MAA ou AA na cinética de consumo de oxigênio catalisada por Mb/H₂O₂ 1:10. A variação temporal da concentração de O₂ foi determinada em amostras de metaMb 20 μM e H₂O₂ 1:10 (200 μM) na presença de várias concentrações de (a) AA e (b) MAA, em tampão fosfato 0,10 M, pH 7,4, a 37°C.

Tanto para o sistema MAA e metaMb/H₂O₂ equimolar ou na proporção 1:10, foi possível o cálculo da velocidade inicial do consumo de oxigênio (Figuras 31).

Figura 31. Velocidades iniciais de consumo de O₂ por MAA na presença de Mb/H₂O₂ 1:1 e 1:10. Amostras de metaMb e H₂O₂ (a) 1:1 (Mb 25 μM e H₂O₂ 25 μM), e (b) 1:10 (Mb 20 μM e H₂O₂ 200 μM) preparadas em tampão fosfato 0,10 M, pH 7,4, 37°C.

As velocidades de consumo de oxigênio pelo sistema AA e metaMb/ H_2O_2 equimolar, entretanto, não obedecem a uma reta, mesmo após aplicação de várias modelagens matemáticas por vários tipos de funções e transformações.

Como verificamos que os protocolos com 1:10 de H_2O_2 apresentaram uma resposta mais consistente com o consumo de oxigênio pelo sistema MAA e metaMb, estudou-se o efeito de proporções crescentes de H_2O_2 adicionado ao sistema (Figura 32).

Figura 32. Efeito da concentração de H_2O_2 na cinética de consumo de O_2 por MAA e Mb/ H_2O_2 . Acompanhou-se a variação temporal da concentração de oxigênio em amostras de metaMb 25 μM na presença de MAA 20 mM, em tampão fosfato 0,10 M, pH 7,4, a 37°C, e adição de várias concentrações de H_2O_2 (de 1:2 a 1:200, 50 μM a 5mM).

Notadamente, o sistema com grande excesso de H_2O_2 (a partir de 1:10) revela outras reações da hemeproteína com H_2O_2 , como a liberação de O_2 , prejudicando a análise desejada, já que os passos de geração de ferrilMb, oxidação do substrato, e consumo de oxigênio pelo radical $\text{MAA}^{\bullet}$ estão sobrepostos à produção de O_2 pelo sistema.

Trabalhos recentes [62, 132] relatam a interação de Mb com hidroperóxidos lipídicos para geração de ferrilMb, que inicia e propaga a cascata de lipoperoxidação. Deste modo, utilizou-se o hidroperóxido *tert*-butilhidroperóxido, como eliciador da atividade peroxidásica de metaMb (25 μ M), variando-se a concentração do hidroperóxido e fixando-se em 20 mM a concentração de ambos β -cetoácidos (Figura 33).

Figura 33. Efeito da concentração de *tert*-butilhidroperóxido na cinética de consumo de O_2 por AA ou MAA catalisada por Mb. A variação temporal da concentração de oxigênio foi determinada em amostras de metaMb 25 μ M e (a) AA ou (b) MAA 20 mM, adicionadas de *tert*-butilhidroperóxido, em tampão fosfato 0,10 M, pH 7,4, a 37°C.

Mediu-se as velocidades iniciais de consumo de oxigênio pelos dois substratos nos sistemas com *tert*-butilhidroperóxido (Figura 34). Para ambos os β -cetoácidos, observou-se dose-dependência entre *tert*-butilhidroperóxido (em proporção à Mb) e a velocidade inicial de consumo de oxigênio, sendo que para MAA a relação é linear (Figura 34 b), enquanto que o AA obedece a uma curva exponencial (Figura 34 a).

Figura 34. Velocidades iniciais de consumo de O_2 em função da concentração de *tert*-butilhidroperóxido adicionado a Mb. Amostras de metaMb 25 μM com diferentes concentrações de *tert*-butilhidroperóxido (expressas no gráfico como log da proporção a Mb) na presença de (a) AA, e (b) MAA, 20 mM, preparadas em tampão fosfato 0,10 M, pH 7,4, a 37°C.

Adotamos a transformação matemática recíproca ($1/Y$) para linearização dos dados para viabilizar a análise estatística por regressão linear conjunta (Figura 35).

Figura 35. Gráficos da velocidade de consumo de O_2 e proporção de *tert*-butilhidroperóxido adicionado a Mb e AA ou MAA, com os dados transformados a valores inversos. Condições experimentais: metaMb 25 μM , na presença de AA ou MAA, 20 mM, preparadas em tampão fosfato 0,10 M, pH 7,4, a 37°C, adicionado de diversas concentrações de *tert*-butilhidroperóxido (25 μM a 5 mM, 1:1 a 1:200). Os

valores de velocidade inicial de consumo de oxigênio (vide figura 38) foram traçados contra o valor inverso da proporção de *tert*-butilhidroperóxido utilizado nos ensaios.

Utilizando-se as retas de regressão isoladas ($R^2 > 0,993$, Figura 35), obtivemos valores indicativos de que a metade da velocidade máxima de consumo de O_2 é alcançada para AA (20 mM) quando na proporção de 57:1 (*tert*-butilhidroperóxido:Mb), e 7:1 (*tert*-butilhidroperóxido:Mb) no caso de MAA (20 mM). Ou seja, pode-se sugerir que MAA é cerca de oito vezes mais reativo que AA quando o sistema oxidante é metaMb/*tert*-butilhidroperóxido.

4.4. Análise de produtos da oxidação aeróbica de β -cetoácidos catalisada por Mb/ H_2O_2

O sistema oxiMb, H_2O_2 equimolar, e MAA, gerou o composto α -dicarbonílico, biacetilo, como produto principal (Figura 36). Observou-se dose-dependência de biacetilo *versus* MAA em todos os tratamentos (Figura 36).

Figura 36. Determinação de biacetilo produzido por oxiMb e H_2O_2 1:1. Amostras contendo 20 μ M oxiMb Fe^{II} , 20 μ M H_2O_2 , e diversas concentrações de MAA foram preparadas em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4, mantidos a 37°C por 2 h. Na mistura reacional foi realizada a determinação como descrito no item 3.8.

Sabendo da dependência da velocidade de decaimento de ferrilMb da concentração de MAA, estudou-se o rendimento de biacetilo em dois sistemas: (i) H_2O_2 equimolar à hemeproteína (Figura 37 a); e (ii) H_2O_2 adicionado em excesso de 50 vezes (1:50) (Figura 37 b). Quando se avaliou o rendimento de biacetilo nos dois sistemas a partir de Mb 20 μM e MAA 50 mM, obteve-se 52 μM de biacetilo usando-se H_2O_2 equimolar (Figura 37 a), e apenas cerca de 0,23 μM no sistema tratado com 1:50 de H_2O_2 (Figura 37 b). Para ambos sistemas, observou dose-dependência na geração de biacetilo, entretanto, claramente, o sistema com excesso de 50 vezes de H_2O_2 apresentou rendimento cerca de 200 vezes menor. Em condições de alta concentração de H_2O_2 , Cadenas (1989) [142] levantou a possibilidade de formação de oxigênio singlete por transferência de átomo de oxigênio de ferrilMb para H_2O_2 que culminaria na destruição da proteína bem como o descoramento de seu grupo heme. Interessante notar que em altas concentrações de H_2O_2 , no qual se observa destruição do heme, e provável liberação de ferro, não houve contribuição significativa para geração de biacetilo no sistema.

Figura 37. Biacetilo gerado por MAA tratado com Mb e H_2O_2 1:1 (a) e 1:50 (b). Amostras contem Mb Fe^{III} 20 μM , H_2O_2 (a) 20 μM , 1:1, ou (b) 1 mM, 1:50, e diversas concentrações de MAA em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4, mantidos a 37°C por 2 h. Biacetilo determinado como descrito no item 3.8.

Como discutido na seção 3.8, a determinação de compostos α -dicarbonílicos, como biacetilo, metilglioxal e glioxal, e α -cetoácidos, como piruvato e oxalato, pode ser realizada utilizando-se *o*-fenilenodiamino (OPD) como derivatizante para a geração de quinoxalinas e quinoxalinóis estáveis, respectivamente. Ao analisarmos amostras nas quais AA era o β -cetoácido substrato, com diferentes concentrações de H_2O_2 adicionado, foi possível observar, utilizando-se separação por HPLC em modo gradiente, a presença de três picos, correspondentes a (i) quinoxalinol, (ii) 1-*N*-óxido de quinoxalina [143], e a (iii) metil-quinoxalina, correspondente ao aduto de OPD com metilglioxal. As áreas de todos os picos apresentam o mesmo perfil dos valores obtidos para o metilglioxal (Figura 38).

Figura 38. Rendimento de metilglioxal para AA e Mb/ H_2O_2 1:10. Condições experimentais: Amostras de Mb 250 μ M, H_2O_2 2,5 mM (1:10), e diversas concentrações de AA, preparadas em tampão fosfato 100 mM, pH 6,0, por 1 h a 37°C. As amostras foram analisadas como descrito no item 3.8.

Os demais picos, embora estejam relacionados com adutos advindos de produtos ou do reagente de AA/Mb/ H_2O_2 não puderam ser identificados. Entretanto, sabe-se que o aduto 1-*N*-óxido de quinoxalina poderia ser gerado por oxido-redução

de quinoxalinas geradas na derivatização, ou ainda como produto de OPD que reagiu com algum radical intermediário da reação. Já o aduto quinoxalinol, poderia ser proveniente da reação de OPD com AA, como descrito por Wang e Qin (2005) [144], descartando a possibilidade de que este quinoxalinol seja advindo da derivatização exclusiva de um α -cetoácido. Embora não saibamos a exata estrutura destes adutos, estes parecem ser pouco importantes para o esclarecimento do mecanismo de reação de oxidação de AA catalisado por Mb/H₂O₂, conquanto a identidade e rendimento de metilglioxal sejam seguramente aferidos.

Desta forma, podemos afirmar que biacetilo é o principal produto da oxidação de MAA por Mb/H₂O₂ e metilglioxal de AA, corroborando a via de oxidação proposta nesta tese (Figura 85), pela qual estes compostos α -dicarbonílicos advêm da termólise de um intermediário dioxetânico hipotético.

Quando avaliado o rendimento de metilglioxal (Figura 39 a) ou de biacetilo (Figura 39 b) obtidos a partir de AA ou MAA, respectivamente, e Mb adicionada de diversas concentrações de H₂O₂, houve coincidência do perfil de rendimento para os dois β -cetoácidos. A maior concentração de composto α -dicarbonílico foi medida para H₂O₂ 1:25. Comparando-se os rendimentos ponderados pela concentração de Mb e do β -cetoácido utilizado, verifica-se que AA gera cerca de 70 vezes menos metilglioxal em comparação ao biacetilo produzido por MAA (o efeito de pH não foi considerado para este cálculo).

Figura 39. Rendimento de compostos α -dicarbonílicos de (a) AA ou (b) MAA e Mb com diversas concentrações de H₂O₂. Condições experimentais: em (a) amostras de Mb 250 μ M, AA 25 mM, e H₂O₂ 250 μ M a 25 mM (1:1 a 1:100), preparadas em tampão fosfato 100 mM, pH 6,0, por 1h mantidas a 37°C; em (b) amostras de Mb 50 μ M, MAA 20 mM, e H₂O₂ 50 μ M a 5 mM (1:1 a 1:100), preparadas em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, por 1 h mantidas a 37°C. As amostras foram analisadas como descrito no item 3.8.

Ainda comparando rendimentos de produto α -dicarbonílico, o mesmo experimento foi realizado com MAA e diversas concentrações de *terc*-butilhidroperóxido (Figura 40). Notadamente o rendimento de biacetilo nestas amostras é maior, mas o perfil de rendimento é o mesmo que o de H₂O₂, sendo máximo com 1:25 do peróxido orgânico é 2,2 vezes maior em comparação com H₂O₂.

Figura 40. Rendimento de biacetilo por MAA, Mb e diversas concentrações de *tert*-butilhidroperóxido. Condições experimentais: amostras Mb 50 µM, MAA 20 mM, e diversas concentrações de *tert*-butilhidroperóxido 50 µM a 2,5 mM (1:1 a 1:100) em tampão fosfato 0,10 M, pH 7,4, a 37°C. Após 4 h de reação, as amostras foram preparadas como descrito no item 3.8.

Ainda realizamos ensaios de rendimento de compostos α -dicarbonílicos quando AA ou MAA, na presença de Mb, é exposta a H_2O_2 gerado em fluxo pelo sistema glicose/GOX (Figura 41 a-b). Variando a concentração de GOX adicionado ao ensaio pudemos verificar dose-dependência linear entre concentração de produto α -dicarbonílico e GOX até a concentração de 10 mU.mL^{-1} (Figura 41 c).

Figura 41. Rendimento de produtos α -dicarbonílicos a partir de (a) AA ou (b) MAA tratado com Mb exposta a fluxo de H_2O_2 gerado por GOX/glicose. Condições experimentais: amostras de Mb (a) 50 μM ou (b) 250 μM , (a) MAA ou (b) AA 50 mM, e GOX 0,5 a 500 mU.mL^{-1} , na presença de glicose 5 mM no tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, por 1 h mantidas a 37°C. Em (c) regressão dos valores de rendimento de compostos α -dicarbonílicos em função da concentração de GOX utilizada nos ensaios (0,5 a 10 U.mL^{-1}) ($R^2 > 0,99$). As amostras foram analisadas como descrito no item 3.8.

Utilizando-se a análise de regressão conjunta, e determinando-se as retas de regressão isoladas, obtivemos valores indicativos de que AA gera cerca de 50 vezes menos produto quando comparado com MAA, nas mesmas condições experimentais.

4.5. Perfil de pH da oxidação aeróbica de MAA catalisada por Mb/H₂O₂

O perfil de pH para a reação de Mb, H₂O₂ 1:10 e MAA foi traçado a partir de velocidades de consumo de oxigênio e rendimentos de biacetilo (Figura 42). Nota-se claramente que a maior reatividade de Mb/H₂O₂ frente a MAA ocorre a baixos pH.

A forte correlação ($R^2 = 0,98513$) entre os valores de velocidade de consumo de O₂ e de biacetilo evidencia que este é gerado a partir da incorporação de O₂ aos intermediários de reação de MAA e Mb/H₂O₂ (Figura 42 c).

Figura 42. Efeito do pH do tampão fosfato sobre a velocidade de consumo de O₂ (a) e geração de biacetilo (b). Amostras com metaMb 25 μM, H₂O₂ 250 μM (1:10), na presença de MAA 20 mM, preparadas em tampões fosfato (100 mM, corrigidos para a mesma força iônica com KCl) em diversos pHs (5,8 a 8,0) foram ensaiadas e incubadas a 37°C. A determinação de biacetilo foi realizada após incubação das amostras por 1 h. Em (c) correlação linear entre a velocidade de consumo de oxigênio e o rendimento de biacetilo.

4.6. Quimioluminescência ultrafraca direta e sensibilizada por eosina do sistema AA/Mb/H₂O₂

Com o objetivo de se investigar a formação de espécies carbonílicas no estado eletronicamente excitado triplete na peroxidação de β -cetoácidos catalisada por Mb/H₂O₂, investigou-se através de um *photon-counter* a emissão de luz ultrafraca do sistema oxiMb Fe^{II} (150 μ M) e H₂O₂, na proporção de 1:1, na presença de 100 mM do β -cetoácido. A hemeproteína na presença de H₂O₂, eliciou emissão de luz duas vezes mais intensa quando comparada à linha base. A emissão de luz ultrafraca, após adição de AA intensificou-se em cerca de 6 vezes em relação à linha base. A quimioluminescência do sistema mostrou-se constante por pelo menos 3 min (Figura 43). Importante notar que não foi detectada, nestas mesmas condições, quimioluminescência de MAA com Mb/H₂O₂. Devido ao menor potencial de redução de MAA comparado ao AA, é possível que haja supressão química de biacetilo triplete por abstração de átomo de hidrogênio do MAA.

Figura 43. Quimioluminescência direta emitida por AA com oxiMb/H₂O₂. Condições experimentais: 150 μ M oxiMb, 150 μ M H₂O₂ e AA 100 mM, em tampão fosfato 0,10 M, pH 7,4, a 37°C.

Foram realizados experimentos em que se observou forte correlação ($R^2 > 0,99$) entre os níveis de intensidade máxima da emissão de luz direta total sob diferentes concentrações de AA (10 a 100 mM) (Figura 44 a) e do catalisador Mb (75 a 600 μ M) de oxiMb Fe^{II} adicionada de H₂O₂ 1:1 (Figura 44 b).

Figura 44. Correlação ($R^2 > 0,995$) entre emissão de luz direta total e concentração de AA (a) ou Mb (b). Condições experimentais: Em (a) 150 μ M de oxiMb Fe^{II}, 150 μ M H₂O₂, e 10 a 100 mM AA, em tampão fosfato 0,10 M, pH 7,4, a 37°C. Em (b) oxiMb Fe^{II} (75 a 600 μ M), com H₂O₂ equimolar, e AA 50 mM, em tampão fosfato 0,10 M, pH 7,4, a 37°C.

Foram realizados ensaios de quimioluminescência intensificada por transferência de energia para sensibilizadores adequados, como a eosina Y (corante xantênico brominado com anéis fenólico e quinônico condensados) em diferentes concentrações (Figuras 45 e 46). A transferência de energia triplete (produto doador de energia)-*singlete* (aceptor fluorescente) seria facilitada pelo denominado efeito de átomo pesado (*heavy atom effect*), que facilita o cruzamento inter-sistema (*intersystem crossing*) singlete-triplete [111]. Utilizando concentrações de corante 20 μ M (Figura 45 a) e 200 μ M (Figura 45 b), confirmou-se que há possivelmente dois mecanismos responsáveis pelo aumento da emissão de luz total

do sistema. O primeiro seria mediado pela oxidação radicalar da eosina Y e esperado descoramento deste corante [111], e um segundo, por transferência triplete^{T1} (doador) → tripleteⁿ (aceptor) → singlete^{S1} (aceptor) e emissão de luz proveniente do decaimento do sensibilizador excitado (S₁) [145].

Figura 45. Efeito da concentração de eosina sobre emissão de luz de amostras oximiMb/H₂O₂ e AA. Condições experimentais: amostras contêm oximiMb Fe^{II} (150 μM), H₂O₂ 1:1 (150 μM) e 10 mM AA (AA) em tampão fosfato 0,10 M, pH 7,4, a 37°C. As setas indicam a ordem de adição. As linhas pretas indicam o controle, sem adição de eosina, as linhas vermelhas, com adição de AA e eosina, e as linhas verdes, na ausência de AA com adição de eosina, sendo (a) para 0,02 mM eosina, (b) 0,2 mM eosina, e (c) 2 mM eosina.

Quando se utilizou a maior concentração do corante (2 mM) como sensibilizador, observou-se uma cinética muito semelhante àquela dos sistemas com

diferentes concentrações de AA, até 50 mM (Figura 45 (c) e Figura 46). Para a concentração de AA 100 mM, observou-se uma redução da emissão de luz total, provavelmente advindo de *quenching* da eosina Y excitada pelo AA. Consistentemente, na ausência de AA, tal como descrito por Kamyia e colaboradores em 1966 [111], a eosina quimioluminesce fortemente quando tratada com H_2O_2 . Os perfis das curvas de quimioluminescência obtidas variando-se as concentrações de reagentes – intensificação e *quenching* – são evidências da ocorrência de transferência de energia do transiente tripleto da reação para a eosina Y no estado fundamental, que excitada decai emitindo luz.

Figura 46. Efeito da adição de alta concentração de eosina (2 mM) em sistemas oxiMb/ H_2O_2 com diversas concentrações de AA. Amostras contendo 150 μ M oxiMb Fe^{II} , 150 μ M H_2O_2 e AA (1 a 100 mM) em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4, 37°C. As setas indicam a ordem de adição dos reagentes.

4.7. Estudos via eletroforese e espectroscopia CD de danos estruturais à Mb exposta a β -cetoácidos e H_2O_2 ou glicose/GOX

Para estudar alterações estruturais na Mb advindas de sua atividade peroxidásica sobre β -cetoácidos, inicialmente utilizamos eletroforese não-

desnaturante. Todas as amostras referentes aos sistemas de reação descritos apresentam a mesma concentração inicial de Mb (50 μ M) em tampão fosfato 0,20 M, pH 7,4, na qual variou-se a proporção de H₂O₂ em relação a de Mb para uma concentrações fixa de MAA (50 mM) e seus controles (Figura 47).

Os géis mostram que o β -cetoácido (Figura 47) protege a proteína de degradação, sugerida pela diminuição da área de arraste quando MAA está presente (Figura 48 a). Entretanto, verifica-se que na presença de MAA há uma fração de proteína que possivelmente forma agregados (Figura 48 b), enquanto diminui a banda da proteína nativa (Figura 48 c), indicando que estes agregados tornam-se incapazes de penetrar no gel.

Figura 47. Gel descontínuo não-desnaturante de amostras de Mb/H₂O₂ e MAA. Amostras de metaMb 50 µM com diversas concentrações de H₂O₂ 50 µM a 5 mM (1:1 a 1:100) na presença de MAA 50 mM, foram diluídas 20 vezes, correspondendo a cerca de 5 µg de proteína por poço. Demais condições experimentais estão descritas no item 3.9.

Figura 48. Densidade óptica das regiões ou bandas do gel não-desnaturante de amostras de Mb/H₂O₂ e MAA (Figura 47). Amostras de metaMb 50 µM com diversas concentrações de H₂O₂ 50 µM a 5 mM (1:1 a 1:100) na presença de MAA 50 mM. Demais condições experimentais estão descritas no item 3.9. Para detalhamento das regiões e imagem do gel, vide figura anterior (Figura 47).

Ensaio de ligação da proteína original e proteína tratada com o oxidante ao Coomassie Blue (vide item 3.11) mostrou que a proteína pré-incubada com H₂O₂ apresenta menor ligação ao corante (dados não mostrados).

Alterações na estrutura primária da proteína foram determinadas pela derivatização de porções N-terminais da proteína ou de seus fragmentos, no caso de clivagens, por fluorescamina, que gera um aduto fluorescente.

Nestes experimentos, verificamos que AA em crescentes concentrações protege de modo dose-dependente a clivagem de metaMb (20 µM) desencadeada por 1:10 de H₂O₂ (Figura 49).

Figura 49. Efeito de AA na clivagem de Mb desencadeada por H_2O_2 1:10. Condições experimentais: amostras contendo metaMb 20 μM , H_2O_2 200 μM (1:10), na presença de diversas concentrações de AA (de 1 a 50 mM), mantidas por 2h em constante agitação a 37°C, foram submetidas ao ensaio de clivagem protéica com fluorescamina (vide item 3.12).

É interessante notar que mesmo havendo consumo de H_2O_2 , como descrito anteriormente no item 4.2, há uma menor clivagem da proteína, quando na presença de altas concentrações de AA. Deste modo, poderíamos atribuir ao AA um efeito antioxidante sobre a ferrilMb. Entretanto, este efeito antioxidante é bastante controverso, já que nesta reação há a geração de espécies tripletes (vide item 4.6), muito reativas, bem como produtos α -dicarbonílicos (vide item 4.4) especialmente deletérios a biomoléculas.

Em outro experimento, verifica-se que MAA (50 mM) é igualmente capaz de inibir a clivagem de metaMb (50 μM) desencadeada por crescentes concentrações de H_2O_2 (Figura 50).

Figura 50. Efeito de MAA sobre a clivagem de Mb exposta a diversas concentrações de H₂O₂. Condições experimentais: amostras contendo metaMb 20 µM, H₂O₂ 20 µM a 2 mM (1:1 a 1:100), na presença de MAA 50 mM foram mantidas por 2 h em constante agitação a 37°C. Amostras controle sem a adição de MAA foram preparadas conjuntamente. As amostras foram submetidas ao ensaio de clivagem protéica com fluorescamina (vide item 3.12).

Portanto, tanto MAA quanto AA protegem Mb de clivagem da cadeia polipeptídica. Em virtude de o MAA ser mais reativo que AA, observa-se que MAA protege, cerca de 2 vezes mais, a geração de adutos fluorescentes advindos de heme oxidado, monitorados através da fluorescência em (i) 525 nm, excitação em 460 nm, e (ii) em 465 nm, excitação em 321 nm (dados não mostrados).

O estudo de heme íntegro extraível de Mb após tratamento com H₂O₂, na ausência e presença de AA 10 mM (Figura 51), indicam que o descoramento da Mb ocorre principalmente após longas incubações. Quando a relação Mb:H₂O₂ é superior a 1:5, há significativo maior taxa de descoramento quando o β-cetoácido está presente no meio reacional.

Figura 51. Efeito de MAA no descoramento de Mb (conteúdo de heme íntegro extraível) eliciado por diversas concentrações de H_2O_2 . Amostras contendo Mb 25 μM , H_2O_2 125 μM a 2,5 mM (1:5 a 1:100), na ausência ou presença de AA 10 mM, foram determinadas para o conteúdo de heme íntegro extraível ao longo de 9 h de incubação a 25°C. Determinação realizada como descrito no item 3.14.

Na separação de heme extraível em meio ácido por HPLC, não foi observado outro pico que não o correspondente a hemina, ou heme íntegro.

Pela metodologia empregada não foi possível determinar se o conteúdo de heme extraível foi diminuído, devido à sua completa destruição ou à ligação covalente a apoproteína. Entretanto, experimentos realizados (não mostrados), indicam que o conteúdo de Mb-X é mais alto pós-adição de H_2O_2 e diminuído quando se administra o β -cetoácido. Este comportamento sugere que a presença de um substrato para a atividade peroxidásica preveniria a formação de ligações covalentes entre o grupo heme íntegro e a apoproteína. Em experimentos com Mb/ H_2O_2 /AA ou MAA, foi encontrada uma baixa concentração de Mb-X, que não explicaria a extensiva diminuição de heme extraível da proteína quando adicionada de H_2O_2 e β -cetoácidos (Figura 51).

Utilizando-se um ELISA sanduíche (vide item 3.15.1), foi possível mostrar que Mb é acetilada quando exposta a H_2O_2 e AA (Figura 52). O gráfico de intensidade do

ELISA *versus* concentração de AA mostra dose-dependência. O alto valor do ELISA para Mb comercial não é devido exclusivamente à ligação inespecífica entre os anticorpos de captura e revelação, pois os valores do branco foram baixos, em torno de 0,10 (Figura 52 a). Entretanto, espera-se que o anticorpo, por ser desenhado para uma relativa pequena modificação estrutural, apresente inespecificidade parcial, e por este motivo, os dados mostrados como regressão é que devem ser analisados e interpretados (Figura 52 b).

Figura 52. Determinação de Mb acetilada em amostras de Mb/H₂O₂ e AA. Amostras de Mb 50 μ M, adicionadas de H₂O₂ 500 μ M (1:10) e AA (1-50 mM), foram preparadas em tampão fosfato 0,20 M, pH 7,4 por 8 h a 37°C. Em (a) gráfico de barras mostra-se os valores de ELISA (OD_{450nm}, vide seção 3.5.1) para as amostras e controles. Em (b), forte correlação ($R^2 = 0,97624$) entre os valores de ELISA para acetil-Mb e a concentração de AA adicionado. Demais condições experimentais descritas no item 3.15.1.

Adiciona-se o fato de que o tratamento de Mb com H₂O₂ e AA ou MAA induz diminuição da temperatura de desnaturação da proteína em cerca de 3,5°C, o que é esperado de modificação química da proteína (Figura 53).

Figura 53. Efeito de MAA e AA na variação da temperatura de desnaturação de Mb exposta a H₂O₂, 1:25. Condições experimentais: amostras de Mb 50 µM, e AA 50 mM ou MAA 50 mM, foram adicionadas de H₂O₂ 1,25 mM, em tampão fosfato 200 mM, pH 7,4, e mantidas por 2 h, a 37°C sob constante agitação (vide item 3.16).

Quando foi utilizado o sistema glicose/GOX para a geração de H₂O₂ em fluxo, houve dramático descoramento da Mb na presença de AA (1-15 mM) após 1 h a 25°C (Figura 54 a). Interessante notar que no sistema contendo 20 mM de AA há, contraditoriamente, acúmulo de uma espécie da hemeproteína com banda visível positiva máxima em 590 nm e banda *Soret* em 410 nm. A análise da estrutura protéica de Mb neste sistema, por SDS-PAGE seguida de *Western blot* anti-Mb (Figura 54 c), mostra claramente um aumento do número de espécies de natureza polimérica da proteína.

Figura 54. Espectros UV-visível (a) e modificações estruturais de Mb (b e c) exposta a GOX/glicose e AA. Condições experimentais: amostras de Mb 20 μ M (b e c) expostas a AA (0-20 mM) e H_2O_2 gerado em fluxo, a partir do sistema GOX (50 $mU \cdot mL^{-1}$) e, glicose (5 mM) presente em solução balanceada de Hanks sem $MgCl_2$, incubadas por 1 h, a 25°C. Em (b) e (c), amostras preparadas e analisadas como descrito em 3.9 e 3.10.

Os estudos espectrofotométricos (UV-Vis) relatados em 4.1 mostraram que adição de H_2O_2 e AA ou MAA a uma solução tamponada de Mb desencadeia o ciclo peroxidásico da proteína sobre os substratos, oxidando-os. Entretanto, não foi possível detectar alterações no espectro UV-Vis final da hemoproteína. Na presença de altas concentrações de MAA, Mb foi detectada apenas na sua forma inicial meta.

Apenas observou-se aumento do descoramento de Mb adicionada de AA e H_2O_2 (via determinação de heme extraível em ácido).

Análises de géis SDS-PAGE de amostras de Mb adicionadas de diferentes concentrações de H_2O_2 , na presença ou não dos β -cetoácidos, mostraram que AA acelera a destruição da hemeproteína, enquanto que MAA a protege parcialmente (Figura 55).

Figura 55. Efeito de AA e MAA na densitometria da banda do gel SDS-PAGE de Mb tratada com H_2O_2 1:1 (vide itens 3.3 e 3.4). Os valores de densitometria estão expressos em porcentagem do controle (sem adição de H_2O_2). Os pontos vermelhos e azuis indicam amostras adicionadas de AA e MAA 20 mM, respectivamente. As amostras foram preparadas em tampão fosfato 100 mM, pH 6,0, após 1h, a 25°C, sob constante agitação.

Em amostras nas quais H_2O_2 é gerado em fluxo pelo sistema GOX/glicose, obteve-se o mesmo resultado: AA acelera a destruição de Mb, enquanto que MAA a protege parcialmente (Figura 56).

Figura 56. Efeito de AA e MAA na imagem e densitometria da banda de Mb em géis (a) nativo e (b) SDS-PAGE quando na presença de H_2O_2 gerado em fluxo pelo sistema GOX/glicose. Amostras de Mb 250 μM , β -cetoácido 25 mM, e GOX 50 $mU \cdot mL^{-1}$, preparadas em tampão fosfato 200 mM, pH 6,0, adicionado de glicose 5 mM, foram preparadas após 2 h, mantidas sob constante agitação, a 37°C (vide item 3.9).

4.8. Estudos do sistema Mb/ β -cetoácido/ H_2O_2 (adição *in bolus* ou geração em fluxo pelo sistema glicose/GOX) por espectroscopia CD no UV distante, UV próximo e banda *Soret*

Os desvios dicróicos das amostras de Mb/ H_2O_2 tratadas com AA (Figura 57) revelam que há um aumento da contribuição da banda de 208 nm em detrimento da de 222 nm (Figura 57 b) [129, 146]. Em última análise, a proteína apresenta maior reestruturação de α -hélices para folhas- β quando AA foi adicionado ao meio de reação. O espectro CD de Mb/ H_2O_2 e MAA (Figura 58) indicou que este β -cetoácido protege a proteína da reestruturação de α -hélice em folha- β , exceto no caso da maior concentração de H_2O_2 utilizada (Figura 58 b-c).

Figura 57. Efeito de AA nos espectros de CD na região do UV distante (a) para amostras de Mb adicionada de diversas concentrações de H_2O_2 . Amostras de Mb 250 μM , com diversas concentrações de H_2O_2 0,25 mM a 6,25 mM (1:1 a 1:25) e AA 25 mM, foram preparadas em tampão fosfato 200 mM, pH 6,0 por 2 h, a 37°C. As amostras foram diluídas 10 vezes em água previamente a leitura (vide item 3.17). Em (b) os valores de desvio dicróico em 208 e 222 nm foram tabulados de acordo com a extensão de sua diferença a proteína nativa.

Figura 58. Efeito de MAA nos espectros de CD na região do UV distante (a) para amostras de Mb adicionada de diversas concentrações de H₂O₂. Amostras de Mb 250 μ M, com diversas concentrações de H₂O₂ 0,25 mM a 6,25 mM (1:1 a 1:25) e MAA 25 mM, foram preparadas em tampão fosfato 200 mM, pH 6,0 por 2 h, a 37°C. As amostras foram diluídas 10 vezes em água previamente a leitura (vide item 3.17). Em (b) os valores de desvio dicróico em 208 e 222 nm foram tabulados de acordo com a extensão de sua diferença a proteína nativa.

Os espectros na região do UV próximo, indicadores da interação de resíduos de aminoácidos aromáticos entre si, bem como sua exposição ao solvente, confirmam que AA adicionado a Mb/H₂O₂ acelera a alteração estrutural (Figura 59 a), enquanto que o MAA preserva a estrutura da hemeproteína (Figura 59 c).

Figura 59. Efeito de AA e MAA nos espectros de CD na região do UV próximo (a) para amostras de Mb adicionada de diversas concentrações de H₂O₂. Amostras de Mb 250 µM, com diversas concentrações de H₂O₂ 0,25 mM a 6,25 mM (1:1 a 1:25), e (a) AA 25 mM, ou (c) MAA 25 mM, foram preparadas em tampão fosfato 200 mM, pH 6,0 por 2 h, a 37°C. As amostras foram diluídas 10 vezes em água previamente a leitura (vide item 3.17). Em (b) os valores de desvio dicróico em 294 e 272.5 nm foram tabulados de acordo com a extensão de sua diferença a proteína nativa.

Como esperado, o desvio dicróico na região da banda *Soret* para Mb/H₂O₂ é menos intenso na presença de AA (Figura 60). Vale salientar que uma redução dos valores de desvio dicróico da banda *Soret* indica perda de associação da proteína com o heme [146], seja pela maior taxa de destruição do grupo heme

(descoramento), ou pelo aumento da desorganização protéica que então se dissocia do heme. Em conjunto com os dados sobre a diminuição observada de heme íntegro extraível em ácido (Figura 51), a redução da banda *Soret* deve-se portanto à oxidação com descoramento da hemeproteína. Já a adição de MAA a Mb/H₂O₂ levou a menor alteração do desvio dicróico na região da banda *Soret* por peróxido (Figura 61).

Figura 60. Efeito de AA nos espectros de CD na região da banda *Soret* para amostras de Mb adicionada de diversas concentrações de H_2O_2 . Amostras de Mb 250 μ M, com diversas concentrações de H_2O_2 0,25 mM e 2,5 mM (1:1 e 1:10), e AA 25 mM, foram preparadas em tampão fosfato 200 mM, pH 6,0 por 2 h, a 37°C. As amostras foram diluídas 10 vezes em água previamente a leitura (vide item 3.17).

Figura 61. Efeito de MAA nos espectros de CD na região da banda *Soret* para amostras de Mb adicionada de diversas concentrações de H_2O_2 . Amostras de Mb 250 μ M, com diversas concentrações de H_2O_2 0,25 mM a 6,25 mM (1:1 a 1:25), e MAA 25 mM, foram preparadas em tampão fosfato 200 mM, pH 6,0 por 2h, a 37°C. As amostras foram diluídas 10 vezes em água previamente a leitura (vide item 3.17).

Quando H_2O_2 foi gerado em fluxo pelo sistema glicose/GOX, observou-se que AA e MAA protegem parcialmente Mb da transição de α -hélice para folha- β (Figura

62) [129, 146], da oxidação dos aminoácidos aromáticos (Figura 63 a), e da diminuição da intensidade de desvio dicróico da banda *Soret* (Figura 63 b). AA, como nos experimentos já relatados, mostrou-se menos eficaz que MAA na proteção da Mb contra danos estruturais.

Figura 62. Efeito de AA e MAA nos espectros de CD na região do UV distante (a) de amostras de Mb e H₂O₂ gerado em fluxo pelo sistema glicose/GOX. Amostras de Mb 250 μ M, β -cetoácido 25 mM, e glicose oxidase 50 mU.mL⁻¹, preparadas em tampão fosfato 200 mM, pH 6,0, adicionado de glicose 5 mM, após 2 h mantidas sob constante agitação, a 37°C, foram diluídas 10 vezes em água para leitura (vide itens 3.17). Em (b e c) os valores de desvio dicróico em 208 e 222 nm foram tabulados de acordo com a extensão de sua diferença a proteína nativa.

Figura 63. Efeito de AA e MAA nos espectros de CD na região do UV próximo (a) e da banda *Soret* (b) de amostras de Mb e H₂O₂ gerado em fluxo pelo sistema glicose/GOX. Amostras de Mb 250 μM, β-cetoácido 25 mM, e glicose oxidase 50 mU.mL⁻¹, preparadas em tampão fosfato 200 mM, pH 6,0, adicionado de glicose 5 mM, após 2 h mantidas sob constante agitação, a 37°C, foram diluídas 10 vezes em água para leitura (vide itens 3.17).

Estes resultados são consistentes com aqueles reportados anteriormente sobre a inibição da clivagem protéica pelos β-cetoácidos (Figuras 49 e 50), principalmente a altas concentrações de AA (Figura 49). Nestes estudos, utilizando-se glicose/GOX para a geração de H₂O₂ em fluxo (Figura 62 e 63), ambos AA e MAA amenizaram a destruição protéica, o que contrasta com os resultados da adição *in bolus*, na qual, ao menos para as menores concentrações de H₂O₂ utilizadas, AA acelera a destruição enquanto MAA protege parcialmente Mb de degradação eliciada por H₂O₂.

4.9. Análise dos radicais intermediários da oxidação de AA e MAA catalisada por Mb/H₂O₂

Utilizando-se EPR com captação de spin pelo agente de captação MNP, foi possível identificar os adutos paramagnéticos de MNP gerados pelos radicais MAA•

($a^N = 1,58$ mT) e $AA^\bullet$ ($a^N = 1,46$ mT e $a_\beta^H = 0,335$) formados pela abstração de um átomo de hidrogênio de MAA (Figura 64) e AA (Figura 65) pelo intermediário ferrilMb. No caso de MAA, além do sinal triplete do aduto MNP-MAA $^\bullet$, aparece outro triplete com $a^N = 0,83$ mT atribuível ao aduto MNP-acetila, postulado nesta tese como oriundo da clivagem alfa (Norrish) do produto biacetilo triplete. Assim, o espectro experimental consiste na somatória de duas espécies de três linhas: 70% da intensidade advém do aduto do radical de MAA ($a^N = 1,54$ mT), e 30% do aduto do radical acetila ($a^N = 0,83$ mT).

O desdobramento pelo hidrogênio do sinal observado para MNP-AA $^\bullet$ (Figura 85) também evidencia que o carbono *alfa* é o átomo no qual o radical primário está centrado.

Figura 64. Adutos paramagnéticos de MNP para radicais intermediários da reação de MAA com Mb/H₂O₂. Amostras com MAA 50 mM, MNP 100 mM, Mb 250 μ M e H₂O₂ 2,5 mM (1:10), em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4 a 25°C. Os espectros de EPR foram adquiridos após 5 min da preparação da mistura reacional. Posteriormente, os sinais foram identificados e simulados. Controles sem adição

MAA não mostrou qualquer aduto paramagnético advindo da oxidação deste solvente por Mb e/ou H_2O_2 .

Figura 65. Adutos paramagnéticos de MNP para radicais intermediários da reação de AA com Mb/ H_2O_2 . Amostras com AA 50 mM, MNP 100 mM, Mb 250 μM e H_2O_2 25 mM (1:100), em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4 a 25°C. Os espectros de EPR foram adquiridos após 2 min da preparação da mistura reacional. No espectro é possível identificar somente um aduto MNP-AA $^{\bullet}$, de $a^N = 1,46$ mT.

A análise da área do sexteto atribuível ao aduto de MNP com o radical AA $^{\bullet}$ gerado por Mb/ H_2O_2 revela forte correlação às concentrações de β -cetoácido e hemeproteína no ensaio (Figura 66). O sexteto pode então ser seguramente atribuído ao MNP-AA $^{\bullet}$, já que sua ocorrência é dependente da adição do β -cetoácido (Figura 65), bem como tem comportamento dose-dependente aos reagentes adicionados (Figura 66).

Figura 66. Efeito da concentração de (a) Mb ou (b) AA no sinal de MNP-AA• da reação de AA com Mb/H₂O₂. Correlacionou-se a área do sinal (dupla integração) do aduto MNP-AA• com a concentração de (a) Mb ((a) 0-500,0 μM e (b) 500,0 μM) ou de (b) AA ((a) 50,0 mM e (b) 5,0-50,0 mM), na presença de de MNP 100 mM e H₂O₂ 1:10 ((a) 0-5,0 mM e (b) 5,0 mM) preparadas em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, a 25°C. Espectros adquiridos após 5 min.

Estudos de supressão do sinal de EPR de MNP-AA• por CAT (400 U.mL⁻¹) confirmaram que ferrilMb promove a reação de oxidação unieletrônica de AA (Figura 67 a).

Neste contexto, vale lembrar que Jain e colaboradores (1998) [6] reportaram que AA é oxidado por adição de Fe²⁺, o qual gera radical O₂•⁻, atestado pela redução de ferricitocromo c. Acreditamos que a redução do citocromo c neste sistema seja devida à redução direta da hemeproteína pelos radicais intermediários de AA. De fato, ao adicionarmos SOD às amostras de AA/Mb/H₂O₂, verificamos que o sinal do aduto MNP-AA• não foi alterado, mesmo com altas concentrações da enzima (Figura 67 b), sugerindo que o radical O₂•⁻ não é intermediário da reação de oxidação de AA por Mb/H₂O₂.

Figura 67 Efeito da adição de CAT (a) e SOD (b) no sinal do aduto MNP-AA*. Amostras com AA 50 mM, MNP 100 mM, Mb 250 μ M e H₂O₂ 6,25 mM (1:25) foram preparadas em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4 a 25°C. Os espectros foram adquiridos após 2 min.

Utilizando-se AA, cujos carbonos 2 e 4 ou 1 e 2 foram especificamente enriquecidos com ^{13}C , foi possível verificar um aduto paramagnético cujos valores $a^N = 1,46$ mT e $a_\beta^H = 0,335$ mT caracterizam os desdobramentos para todos os isótopos. Para o 2,4- ^{13}C -AA há ainda um desdobramento duplete com $a = 0,68$ mT, que aparece também para o isótopo 1,2- ^{13}C -AA (Figura 68). Deste modo, indubitavelmente, o radical primário de AA é centrado no C2, posição *alfa*.

Ainda para o 2,4- ^{13}C -AA há um segundo desdobramento isotópico de $a = 0,076$ mT que, por ser bastante pequeno, é atribuível ao efeito isotópico do $^{13}\text{C}4$, posição *gama*. Já para o isótopo 1,2- ^{13}C -AA, um segundo desdobramento isotópico de $a = 0,68$ mT é atribuível ao efeito isotópico do $^{13}\text{C}1$, posição *beta*.

Na Tabela 1 estão listados todos os adutos paramagnéticos captados por MNP, suas estruturas e constantes de acoplamento para a oxidação dos β -cetoácidos pelo sistema Mb/ H_2O_2 .

Segundo o mecanismo de oxidação proposto por esta tese (Figura 85), o radical acetila, presente nos experimentos de EPR com captação de spin para as amostras de Mb/ H_2O_2 e MAA, seria proveniente da homólise *alfa* de biacetilo triplete formado pela termólise de um dioxetano intermediário. Como resultado paralelo, citamos o relato de Soares e Bechara (1982) [147] sobre total coincidência entre o espectro de quimioluminescência do sistema metilacetoacetona/HRP, que se processa via um intermediário dioxetânico, e o espectro de fosforescência de biacetilo, confirmando assim a multiplicidade eletrônica do produto desta reação. A quimioluminescência eliciada pelo sistema AA/Mb/ H_2O_2 , descrita no item 4.6, foi atribuída à fosforescência de metilglioxal formado pela clivagem de um intermediário dioxetânico hipotético derivado de AA. Coerentemente, a intensidade da luz emitida pelo sistema AA/Mb/ H_2O_2 responde linearmente o aumento da concentração do substrato e a de Mb (Figura 44).

Figura 68. Efeito de AA isotopicamente enriquecido com ^{13}C nos acoplamentos do aduto de MNP-AA[•]. Amostras contendo MNP 100 mM, Mb 500 μM e H_2O_2 5 mM (1:10), preparados em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, tiveram seus espectros adquiridos após 5 min a 25°C.

Tabela 1. Resumo das constantes de acoplamento hiperfino referentes aos experimentos de captação de spin utilizando MNP para a oxidação de AA e MAA catalisada por Mb/H₂O₂.

	a^N	a_β^H	a_α^{13C}	a_β^{13C}	a_γ^{13C}
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\overset{\gamma}{\underset{\cdot}{\text{C}}}-\overset{\beta}{\underset{\cdot}{\text{C}}}-\overset{\beta}{\underset{\cdot}{\text{C}}}-\text{O}^- \\ \parallel \quad \parallel \quad \parallel \\ \text{O} \quad \text{H} \quad \text{O} \end{array}$	1,458	0,334	0,68	1,284	0,076
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\overset{\gamma}{\underset{\cdot}{\text{C}}}-\overset{\beta}{\underset{\cdot}{\text{C}}}-\overset{\beta}{\underset{\cdot}{\text{C}}}-\text{O}^- \\ \parallel \quad \parallel \quad \parallel \\ \text{O} \quad \text{O} \quad \text{O} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	1,58				
$\text{H}_3\text{C}-\overset{\gamma}{\underset{\cdot}{\text{C}}}-\overset{\beta}{\underset{\cdot}{\text{C}}}-\overset{\beta}{\underset{\cdot}{\text{C}}}-\text{O}^-$	0,83				

Para confirmar a intermediação de espécies carbonílicas tripletes na reação de MAA com Mb/H₂O₂ testamos o efeito supressor (*quenching*) de um ácido α,β -insaturado, sorbato ($k_q = k_{\text{dif}} \sim 5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ em meio aquoso [106, 111]), sobre o sinal de EPR do radical acetila. De fato, o aduto radical MNP-acetila foi quase totalmente suprimido quando se adicionou sorbato de sódio às amostras (Figura 69). Este resultado é forte argumento a favor da geração de produto α -dicarbonílico no estado triplete, produtor de radical acetila por clivagem *alfa*, pelo sistema β -cetoácido/Mb/H₂O₂. Como controle, resultados não mostrados atestam que sorbato (1:1, sorbato: MAA) não é um substrato que compete por ferrilMb quando há MAA no meio reacional, podendo assim ser responsável pela supressão do sinal paramagnético do radical aduto MNP-acetila.

Figura 69. Efeito do supressor de espécies tripletes sorbato no sinal do aduto MNP-acetila em amostras de MAA e Mb/H₂O₂. Condições experimentais: amostras preparadas em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, contendo sorbato 50 mM, MAA 50 mM, MNP 100 mM, Mb 250 μ M e H₂O₂ 25 mM (1:100), tiveram seus espectros de EPR adquiridos após 5 min, a 25°C.

Usando-se EPR com captação de spin com MNP, foi possível mostrar que os sinais para ambos β -cetoácidos comportam-se de maneira similar quando se varia a concentração de H₂O₂: valores máximos de área dos adutos de MNP com os radicais primários dos β -cetoácidos são obtidos quando 25 equivalentes de H₂O₂ são adicionados a Mb (Figura 70). Interessante notar que o mesmo perfil de rendimento do aduto MNP-MAA[•] é obtido para o aduto MNP-acetila, sugerindo que o radical acetila seria realmente proveniente do radical MAA[•], como proposto por este trabalho.

Figura 70. Efeito da concentração de H₂O₂ (a e c) na área do sinal (dupla integração em b e d) para os adutos de AA e MAA captados por MNP. As amostras com AA 50 mM (a-b) ou MAA 50 mM (c-d), MNP 100 mM, Mb 250 µM e diversas concentrações de H₂O₂ 250 µM a 25 mM (1:1 a 1:100) foram preparadas em tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, a 25°C. Os espectros de EPR foram adquiridos após 5 min.

4.10. Estudos *in vivo* de indução de rabdomiólise pela administração de AAE e MAAE a ratos

A rabdomiólise, morte do tecido muscular, é uma das três causas mais frequentes de lesão renal crônica [148, 149]. Com a morte do tecido muscular, o conteúdo celular de miócitos é liberado no plasma, sendo que Mb acumula-se no rim. A formação de agregados protéicos, diminuição do fluxo sanguíneo, obstrução

física dos túbulos renais, e necrose tecidual agravada pela atividade peroxidásica de Mb [132], podem culminar em lesão renal crônica, que a depender da extensão e tratamento, pode levar à morte.

Sabendo-se que β -cetoácidos são passíveis de oxidação catalisada por mioglobina gerando uma pletora de espécies reativas de carbono e oxigênio, buscamos investigar se haveria aumento na indução de rabdomiólise em animais que receberam pré-tratamento com os β -cetoésteres.

Numa primeira tentativa de montar um modelo experimental de rabdomiólise com β -cetoácidos, ratos receberam uma injeção de MAAE em dose aguda (1 g.kg^{-1}). Detectou-se leves alterações em parâmetros bioquímicos analisados no soro que poderiam denunciar danos teciduais (vide Tabela 2). Aumentos significativos (p-valores inferiores a 0,05) ao se comparar grupos injetados com MAAE e salina (grupo controle) foram observados para os parâmetros BUN (compostos nitrogenados totais), potássio, atividade de CK (creatina quinase) e ALT (alanina aminotransferase) séricos.

Já os ratos que receberam dose aguda (1 g.kg^{-1}) de AAE (vide Tabela 3), além do aumento na atividade de CK e ALT séricos, sofreram aumento da atividade de AST (aspartato aminotransferase) sérica, além de valores inferiores de glicose sérica.

Tabela 2. Parâmetros analisados em soro de ratos injetados com uma dose aguda (1 g.kg⁻¹) de MAAE via ip.

Grupo	CK	Fosf Alk	AST	ALT	Glicose	Cloretos	Potássio	BUN	Creatinina
Salina	83.13 ^{\$} (27.19)	33.74 (2.76)	10.97 (4.80)	1.77 ^{\$} (0.25)	199.44 (51.75)	94.45 (6.73)	4.49 ^{\$} (0.56)	11.89 ^{\$} (1.49)	12.83 (0.31)
MAAE	122.27 ^{\$} (26.28)	29.95 (6.09)	10.20 (4.33)	2.96 ^{\$} (1.13)	236.82 (40.05)	85.98 (11.77)	7.27 ^{\$} (1.06)	15.20 ^{\$} (1.40)	13.05 (0.70)

Unidades e siglas: CK (creatina quinase), Fosf Alk (fosfatase alcalina), AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase) foram determinadas pela sua atividade sérica e padronizadas por U.L⁻¹. Concentração de glicose em soro foi determinada e expressa mg.dL⁻¹. Cloretos, potássio, BUN (compostos nitrogenados totais) e creatinina séricos foram determinados e estão expressos em mg.L⁻¹. Animais controle receberam solução salina fisiológica na mesma dose e via. Os valores entre parênteses mostram o desvio padrão (n = 3). ^{\$} indica diferença significativa p-valor superior a 0,05.

Tabela 3. Parâmetros analisados em soro de ratos injetados com uma dose aguda (1 g.kg⁻¹) de AAE via ip.

Grupo	CK	Fosf Alk	AST	ALT	Glicose	Cloretos	Potássio	BUN	Creatinina
Salina	83.13 ^{\$} (27.195)	37.97 (3.29)	6.26 ^{\$} (0.59)	1.77 ^{\$} (0.25)	273.95 ^{\$} (51.51)	85.16 (19.17)	5.25 (0.96)	16.19 (4.59)	3.65 (3.175)
AAE	149.97 ^{\$} (34.805)	40.2 (13.67)	53.54 ^{\$} (37.05)	44.98 ^{\$} (32.14)	221.82 ^{\$} (32.8)	94.395 (6.303)	4.2 (0.085)	22.5 (10.0)	2.96 (1.47)

Unidades e siglas: CK (creatina quinase), Fosf Alk (fosfatase alcalina), AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase) foram determinadas pela sua atividade sérica e padronizadas por U.L⁻¹. Concentração de glicose em soro foi determinada e expressa mg.dL⁻¹. Cloretos, potássio, BUN (compostos nitrogenados totais) e creatinina séricos foram determinados e estão expressos em mg.L⁻¹. Animais controle receberam solução salina fisiológica na mesma dose e via. Os valores são indicados como média ± desvio padrão (n = 3). ^{\$} indica diferença significativa p-valor superior a 0,05.

Em seguida, testou-se um protocolo de tratamento por 14 dias (duas injeções diárias de AAE ou MAAE $0,25 \text{ mL.kg}^{-1}$, via ip, às 9h e 18 h) para se verificar possível agravamento no desenvolvimento de lesão renal crônica nestes animais.

Um experimento-piloto de indução de rabdomiólise foi realizado pela injeção im de glicerol 50% (via im, dose 10 mL.kg^{-1}). Os animais apresentaram alta atividade de CK sérico com máximo após 8 h. Os rins destes animais já se mostravam profundamente alterados com coloração vermelho-amarronzada (Figura 72), acompanhada de mudanças histológicas severas como perda de epitélio renal, acúmulo de agregados protéicos (Figura 73), e sinais de nefropatia.

Figura 71. Atividade de CK sérica em ratos que receberam injeção im de glicerol 50% (10 mL.kg^{-1}) (G). Animais-controle (S) receberam injeção im (10 mL.kg^{-1}) de solução salina fisiológica ($n = 3$).

A avaliação por escores de lâminas provenientes de animais 4, 8 e 24 h após a injeção de glicerol indicam que durante as primeiras horas ocorre o acúmulo dos agregados protéicos e dano epitelial (Figura 73). Ao longo das primeiras 24 horas, há diminuição nos agregados protéicos e dano epitelial, enquanto se desenvolve a lesão renal crônica (Figura 73).

Figura 72. Imagens do corte sagital e lâminas histológicas (coloração HE no aumento 40x) de rins de ratos induzidos a desenvolver rabdomiólise pela injeção im de glicerol 50% (10 mL.kg^{-1}) em três pontos dos músculos das pernas. Nas lâminas é possível ver a formação de agregados protéicos nos túbulos renais, bem como morte do tecido epitelial renal (menor densidade de núcleos no epitélio de túbulos renais).

Figura 73. Análise por escores (0 a 4) de lâminas histológicas (coloração HE) de rins de ratos induzidos a desenvolver rabdomiólise por injeção im de glicerol 50% (10 mL.kg^{-1}) em três pontos das perna (Grupo Glicerol). Animais controle (Grupo Salina) receberam injeção im (10 mL.kg^{-1}) de solução salina fisiológica.

Análises por *Western blot* e géis SDS-PAGE mostraram que embora a Mb esteja presente em rins de animais acometidos de rabdomiólise induzida pela injeção im de glicerol, aparentemente, há acúmulo mais expressivo de Hb, facilmente identificada como a banda de 10 kD (Figura 74). Nos cortes histológicos dos rins de ratos acometidos de rabdomiólise é possível identificar acúmulo de hemácias neste tecido. Deste modo, não podemos afirmar que o aumento expressivo na abundância de Hb neste tecido seja proveniente de hemácias íntegras, ou se Hb seria um dos constituintes do agregado protéico. Segundo a literatura, os casts protéicos seriam majoritariamente compostos de Mb [132].

Os resultados de parâmetros bioquímicos em soro de animais pré-tratados com MAAE e AAE estão descritos nas tabelas 4 e 5.

Ratos que receberam injeções duas vezes ao dia de AAE e MAAE por 14 dias ($0,25 \text{ mL.kg}^{-1}$ via ip) tiveram menor ganho de peso no período, entretanto, verificou-se diferença estatisticamente significativa somente para o tratamento com MAAE.

É digno de nota que todos os parâmetros avaliados sofreram alterações pela indução de rabdomiólise (vide item 3.20), mostrando claramente que neste modelo-animal o efeito que culmina em lesão renal crônica deve ser compreendido como uma patologia sistêmica desencadeada pela injeção im de glicerol.

Os animais que receberam os β -cetoésteres ou salina apresentaram parâmetros bioquímicos similares para o desenvolvimento de rabdomiólise (atividade de CK, e proteínas, creatinina, cloretos e potássio séricos), mas níveis significativamente superiores aos dos animais não induzidos à rabdomiólise.

Figura 74. Determinação de Mb em rins de ratos induzidos ao desenvolvimento de rabdomiólise por injeção im de glicerol 50% (10 mL.kg^{-1}). Gel SDS-PAGE corado com Coomassie mostra abundância de proteína de 10 kD nas amostras de ratos sob rabdomiólise. Determinações realizadas como descrito nos itens 3.9 e 3.10.

Os animais incitados a desenvolver rabdomiólise e pré-tratados com MAAE apresentaram aumento significativo de BUN sérico, diminuição dos níveis de glicose sérica, e aumento das atividades séricas de AST, ALT e fosfatase alcalina. Nos animais pré-tratados com AAE observou-se diminuição dos níveis de glicose sérica, bem como aumento da atividade sérica de AST e ALT. Analisados conjuntamente, estes resultados mostram que a injeção dos β -cetoésteres a ratos numa dose crônica induz aumento de lesão hepática que acompanha a rabdomiólise neste modelo-animal.

A atividade de glioxalase I (GLOI), enzima que converte metilglioxal em piruvato, não sofreu alteração relacionada ao pré-tratamento com MAAE, mas foi menor em animais com rabdomiólise. Já os animais que receberam pré-tratamento

com AAE experimentaram aumento significativo da atividade de GLOI no fígado. No tecido renal de animais que receberam injeções crônicas de AAE houve aumento significativo de GLOI, quando os resultados são expressos em relação ao peso fresco do material utilizado para a preparação dos homogenatos empregados nos ensaios (50 mg de tecido fresco por mL de homogenato).

A dosagem de metilglioxal sérico, possivelmente oriundo da oxidação do AA injetado, revelou aumento significativo da concentração deste metabólito α -dicarbonílico nos animais induzidos à rabdomiólise, mas não se observou efeito no tratamento com AAE.

Tabelas 4. Parâmetros bioquímicos de amostras de soro, fígado e rins de ratos pré-tratados com MAAE e induzidos a rabdomiólise.

Grupo	CK	Fosf Alk	AST	ALT	GLOI fígado (U.mg prot ⁻¹)	GLOI rim (U.mg prot ⁻¹)	GLOI rim (U.L ⁻¹)
MAAE + Glicerol	1866,37 (530,71)	51,96 ^{\$} (6,99)	194,84 ^{\$} (9,99)	99,05 ^{\$} (17,85)	161,20 (46,825)	168,14 (6,80)	1235,80 (111,67)
MAAE + Salina	96,07 (14,07)	21,685 (4,42)	12,495 (2,61)	3,26 (0,82)	216,47 (16,22)	176,47 (11,64)	1029,49 (53,33)
Salina + Glicerol	1936,17 (1073,53)	39,395 ^{\$} (8,46)	58,34 ^{\$} (19,10)	24,73 ^{\$} (12,69)	163,75 (42,82)	159,725 (19,305)	1195,52 (128,19)
Salina + Salina	79,64 (26,98)	23,72 (3,56)	9,815 (3,18)	2,29 (0,47)	206,715 (19,57)	184,05 (8,73)	1119,70 (67,77)

Grupo	Glicose	Cloretos	Potássio	BUN	Creatinina	Proteína	
MAAE + Glicerol	10,435 ^{\$} (2,90)	134,67 (11,47)	12,75 (6,62)	46,15 ^{\$} (10,76)	14,19 (0,39)	22,16 (0,77)	
MAAE + Salina	53,35 (9,37)	91,30 (5,19)	5,755 (0,39)	18,46 (2,52)	12,43 (0,25)	19,40 (0,92)	
Salina + Glicerol	13,36 ^{\$} (6,895)	128,75 (13,77)	8,65 (3,355)	36,91 ^{\$} (5,985)	14,91 (1,38)	21,5 (2,14)	
Salina + Salina	41,77 (13,80)	93,81 (6,17)	5,55 (0,595)	16,10 (1,85)	12,96 (0,39)	19,46 (0,90)	

Grupo	Ganho de peso (g)
Salina	19,45 ^{\$} (5,44)
MAAE	9,45 ^{\$} (7,58)

Unidades e siglas: CK (creatina quinase), Fosf Alk (fosfatase alcalina), AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase) foram determinadas pela sua atividade sérica e padronizadas por U.L⁻¹. Concentração de glicose em soro foi determinada e expressa mg.dL⁻¹. Cloretos, potássio, BUN (compostos nitrogenados totais), creatinina e proteínas séricas foram determinados e estão expressos em mg.L⁻¹. Atividade de GLOI (glioxalase I) quando padronizada por volume (U.L⁻¹) foi determinada em homogenatos preparados com 50 mg de tecido fresco por mL.

Pré-tratamento dos animais foi feito utilizando-se salina ou MAAE (0,25 mL.kg⁻¹) durante 14 dias, duas vezes ao dia (8h e 18h), via ip. Os animais foram induzidos a desenvolver rabdomiólise pela injeção im de glicerol 50% (10 mL.kg⁻¹) (Grupo Glicerol) em três pontos das pernas (vide item 3.20). Animais controle (Grupo Salina) receberam injeção im (10 mL.kg⁻¹) de solução salina fisiológica. Valores indicados como média (± desvio padrão) (n = 3). ^{\$} diferença significativa com p-valor superior a 0,05.

Tabelas 5. Parâmetros bioquímicos de amostras de soro, fígado e rins de ratos pré-tratados com AAE e induzidos a rabdomiólise.

Grupo	CK	Fosf Alk	AST	ALT	GLOI fígado (U.mg prot ⁻¹)	GLOI rim (U.mg prot ⁻¹)	GLOI rim (U.L ⁻¹)
AAE + Glicerol	143,48 (26,68)	48,60 (6,48)	73,56 ^{\$} (5,77)	25,34 ^{\$} (12,11)	222,30 ^{\$} (4,92)	101,6 (22,97)	947,58 ^{\$} (31,83)
AAE + Salina	9,39 (2,69)	23,985 (4,42)	11,29 (2,75)	4,00 (1,45)	203,05 (16,0)	144,25 (8,00)	792,18 (51,45)
Salina + Glicerol	132,84 (26,57)	43,95 (8,40)	50,34 ^{\$} (6,67)	12,32 ^{\$} (1,26)	151,035 ^{\$} (5,84)	118,24 (26,35)	736,56 ^{\$} (67,14)
Salina + Salina	8,16 (2,91)	30,70 (6,83)	6,33 (1,21)	1,73 (0,43)	216,51 (11,22)	140,87 (6,60)	832,85 (60,692)

Grupo	Glicose	Cloretos	Potássio	BUN	Creatinina	Proteínas
AAE + Glicerol	19,52 ^{\$} (14,7)	214,12 (157,85)	21,05 (13,66)	97,58 (46,40)	34,44 (8,195)	28,90 (1,905)
AAE + Salina	41,65 (8,58)	93,71 (7,77)	4,85 (0,30)	23,78 (5,61)	9,96 (7,79)	19,05 (0,835)
Salina + Glicerol	13,37 ^{\$} (13,15)	101,38 (14,35)	18,13 (9,55)	110,63 (71,47)	29,72 (12,21)	24,40 (4,64)
Salina + Salina	64,94 (17,53)	82,84 (19,90)	4,65 (0,46)	28,28 (2,95)	6,49 (3,79)	22,78 (1,88)

Grupo	Ganho de peso (g)
Salina	17,16 (4,19)
AAE	11,83 (8,275)

Unidades e siglas: CK (creatina quinase), Fosf Alk (fosfatase alcalina), AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase) foram determinadas pela sua atividade sérica e padronizadas por U.L⁻¹. Concentração de glicose em soro foi determinada e expressa mg.dL⁻¹. Cloretos, potássio, BUN (compostos nitrogenados totais), creatinina e proteínas séricas foram determinados e estão expressos em mg.L⁻¹. Atividade de GLOI (glioxalase I) quando padronizada por volume (U.L⁻¹) foi determinada em homogenatos preparados com 50 mg de tecido fresco por mL.

Pré-tratamento dos animais foi feito utilizando-se salina ou AAE (0,25 mL.kg⁻¹) durante 14 dias, duas vezes ao dia (8h e 18h), via ip. Os animais foram induzidos a desenvolver rabdomiólise pela injeção im de glicerol 50% (10 mL.kg⁻¹) (Grupo Glicerol) em três pontos das pernas (vide item 3.20). Animais controle (Grupo Salina) receberam injeção im (10 mL.kg⁻¹) de solução salina fisiológica. Valores indicados como média ± desvio padrão (n = 3). ^{\$} indica diferença significativa p-valor superior a 0,05.

4.11. Estudos-modelo de citotoxicidade de ferrilMb com culturas de células, e cultura muscular *ex vivo*, ambos induzidos ou agravados por β -cetoácidos

Estes experimentos visaram demonstrar o potencial citotóxico de ferrilMb contra as células endoteliais de aorta bovina (BAEOC), e o possível papel citotóxico sinérgico de AA. Aventamos que radicais livres centrados em carbono e espécies tripletes derivados de AA poderiam exacerbar a citotoxicidade de ferrilMb, trazendo contribuições para o entendimento sobre rabdomiólise e o desenvolvimento de lesão renal crônica.

Naquela ocasião, utilizamos o ensaio de MTT para verificar a viabilidade celular das culturas expostas por 4 h a Mb 50 μ M, GOX 50 mU.mL⁻¹ e AAE 20 mM (Figura 75). Claramente pode-se notar que Mb protege as células da perda de viabilidade celular induzida pelo fluxo de espécies reativas de oxigênio (EROs), notadamente H₂O₂, gerado por GOX no meio de cultura (Figura 75 a). Acetoacetato de etila (AAE), quando presente no meio de cultura, inibe a queda de viabilidade celular, e apresenta citotoxicidade aditiva quando na presença de GOX ou Mb, mas não parece ter qualquer papel citotóxico sinérgico.

Após tratamento de Mb com AAE e GOX, em comparação ao tratamento com somente GOX, os espectros de absorção de luz (Figura 75 c) mostraram claramente aumento de descoramento da hemeproteína, bem como aumento de espécies pseudo-poliméricas de Mb, na análise por *Western blotting* (Figura 75 d). Estas modificações atestam que ferrilMb gerada no meio de cultura catalisou a oxidação de AAE, e como esperado, foi vitimizada pelos produtos e intermediários da reação. Deste modo, embora Mb não pareça ser um fator importante no efeito citotóxico aditivo de AAE e GOX em células de aorta (BAEOC), é possível afirmar que ferrilMb gerada no sistema reagiu com AAE quando adicionado ao meio de cultura.

A determinação de GSH nestas células corroborou o papel citotóxico de AAE aditivo ao de GOX, independente da adição de Mb no meio de cultura (Figura 75 b).

Entretanto, é interessante notar que as culturas-controle (sem AAE ou GOX) apresentam menores níveis de GSH quando comparadas às culturas expostas a AAE. Este efeito provavelmente é devido ao aumento de coenzimas reduzidas, NAD(P)H, nestas células, possibilitando a reciclagem de GSSG a GSH.

Decidimos, então, utilizar modelos de células musculares que apresentassem Mb intracelular como alvo de espécies reativas, visando atestar o potencial efeito citotóxico de espécies triplete e radicais livres centradas em carbono gerados por ferrilMb e compostos β -cetoácidos no meio intracelular. Nosso objetivo principal era demonstrar o envolvimento destas reações e seus produtos no disparo ou agravamento de rabdomiólise.

Figura 75. Atividade citotóxica de AAE, Mb e GOX contra células epiteliais bovinas de aorta (BAEOC, Cell Applications®). Após 4 h de tratamento, as células foram avaliadas com respeito (a) à viabilidade celular pelo teste de MTT e (b) aos níveis de GSH. Foram traçados os espectros de absorção UV-Vis (c) e realizado o *Western blotting* (d) dos meios de cultura das células tratadas com Mb. Utilizou-se células BAEOC confluentes cultivadas em placas de 6 poços, cujos meios de cultura para manutenção (sem adição de vermelho de fenol ou SFB, Cell Applications®) continham Mb 50 μM , GOX 50 mU.mL^{-1} e AAE 20 mM solubilizados/ diluídos em PBS estéril. Após 4 h de tratamento, as células e os meios de cultura foram utilizados para os diversos ensaios.

Na literatura, o modelo mais bem caracterizado é o das células C2C12 [150]. Esta linhagem murina, inicialmente isolada de rhabdomiosarcoma, é caracterizada como célula satélite miogênica e largamente utilizada em experimentos de eletrofisiologia muscular, metabolismo de glicose e ácidos graxos, já que é uma

célula sensível a insulina, e amplamente estudada para a caracterização molecular da programação da diferenciação de células satélites em fibras musculares. Apresenta fenótipo bastante preservado, e sua manutenção em laboratório é bastante simples, sendo que sua diferenciação pode ser induzida a tecido ósseo pela disponibilidade de fatores osteogênicos, ou a fibras musculares quando cultivadas a baixa concentração de SFB (vide item 3.22).

O aumento da atividade enzimática do marcador de diferenciação muscular creatina quinase (CK) evidencia que esta cultura, após cerca de 8 dias, encontra-se completamente diferenciada a fibras musculares (Figura 76). Neste período, as células, antes fibroblásticas, fusionam-se a células multinucleadas formando os miotubos.

Figura 76. Perfil de atividade de creatina quinase (CK) em células C2C12 induzidas à diferenciação a miotubos. A diferenciação foi induzida nas células sob 80% de confluência pela troca de seu meio de cultura pelo meio de diferenciação (DMEM adicionado de SFB 5%).

Os miotubos, então, foram expostos a diferentes concentrações de MAA, AA, MAAE e AAE, adicionados ao meio de cultura por 24 h, na presença de H₂O₂. Após 24 h foi avaliada a viabilidade celular pelo ensaio de MTT. Os tratamentos com os

sais de sódio dos β -cetoácidos estudados (Figura 77 a-b) resultaram numa maior tendência à citotoxicidade quanto maior a concentração utilizada, inesperadamente, sem que H_2O_2 eliciasse maior citotoxicidade. Acreditamos que a não observância de efeito potencializador de citotoxicidade de H_2O_2 deva-se à perturbação do balanço osmótico ao meio de cultura, resultante da adição de altas concentrações dos sais. Talvez este efeito supere o potencial citotóxico de H_2O_2 , já que MAAE e AAE (Figura 77 c-d) apresentaram comportamento sinérgico ao do H_2O_2 ao diminuir a viabilidade celular de maneira dose-dependente às concentrações de ambos compostos. Há diferença estatística significativa para AAE e MAAE adicionados em concentrações acima de 2,5 mM na presença de H_2O_2 62,5 μ M. Nesta concentração de H_2O_2 , não se verifica qualquer perda de viabilidade celular, nem mesmo com apenas AAE ou MAAE 2,5 mM.

Figura 77. Efeito dos β -cetoácidos AA e MA, seus ésteres, e H_2O_2 sobre a viabilidade de miotubos C2C12. Tratamento consistiu no tratamento das células C2C12 após 7 dias da diferenciação, por 24 h com diferentes concentrações de compostos β -cetoésteres e H_2O_2 , seguido da avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT (vide item 3.23). (a) MAA, (c) MAAE, (b) AA e (d) AAE foram adicionados nas seguintes concentrações: 1 – 0,16 mM, 2 – 0,32 mM, 3 – 0,62 mM, 4 – 1,25 mM, 5 – 2,5 mM, 6 – 5,0 mM, 7 – 10 mM, e 8 – 20 mM. H_2O_2 foi adicionado nas concentrações: 1 – 3,9 μ M, 2 – 7,8 μ M, 3 – 16 μ M, 4 – 31 μ M, 5 – 62 μ M, 6 – 125 μ M, 7 – 250 μ M, e 8 – 500 μ M.

Foi notável que a adição de GOX, 10 mU.mL⁻¹ não induz perda da viabilidade celular, nem mesmo em combinação com AAE e AA, ou MAAE e MAA (dados não mostrados).

Utilizando-se H_2O_2 (500 μ M) e os ésteres etílicos de AA e MAA (20 mM), foi possível verificar a perda da integridade celular pela liberação de lactato desidrogenase e sua correlação com a perda da viabilidade celular avaliada pelo

ensaio de MTT. Nestes ensaios, MAAE e AAE administrados junto com H_2O_2 induziram a maior liberação de lactato desidrogenase aliada à menor viabilidade celular, quando comparadas a células-controle, ou adicionadas isoladamente de H_2O_2 , MAAE ou AAE (Figura 78).

Figura 78. Efeito de AAE e MAAE na morte celular de miotubos C2C12. Tratamento: após 7 dias da diferenciação, por 24 h com MAAE e AAE (20 mM) e H_2O_2 (500 μ M), as células foram avaliadas em termos de liberação de lactato desidrogenase para o meio de cultura (a) e viabilidade celular pelo ensaio de MTT (b) (Vide item 3.23).

Para que se pudesse conectar a Mb intracelular com o efeito citotóxico de MAAE e AAE sinergicamente a H_2O_2 , determinou-se o conteúdo de Mb nos miotubos sob vários tratamentos. Surpreendentemente, os resultados foram negativos. Estas células não contêm quantidades mensuráveis de Mb quando avaliadas por ELISA ou *Western blotting* anti-Mb (item 3.24), ou ainda pela atividade peroxidásica dos extratos celulares. Corroborando estes resultados, quando tentamos detectar produtos α -dicarbonílicos advindos da oxidação de AA ou MAA, não foi possível detectar metilglioxal ou biacetilo em nenhum tratamento feito.

Optamos então por usar o tecido muscular retirado cirurgicamente (vide item 3.25) e intacto de ratos Wistar, mantidos em banho de órgãos sob constante

borbulhamento de gás carbogênio (vide item 3.26). Este modelo é utilizado para estudos de eletrofisiologia da contração e estudos de drogas bloqueadoras da contração mecânica de músculos. Atualmente, vários trabalhos utilizam este modelo para estudo *ex vivo* do metabolismo do tecido muscular típico, em associação com os estudos em seus correlatos em culturas celulares [151 , 152].

Estes ensaios foram reproduzidos cinco vezes com 30% de erro. Os resultados aqui mostrados referem-se a um único experimento e são representativos do conjunto de resultados.

Os protocolos relatados na literatura descrevem o uso de CaCl_2 na formulação do meio de manutenção de órgãos [151]. Experimentos com esta formulação de meio mostraram alta liberação de Mb na sua forma oxigenada. Os músculos mantinham-se contraídos durante todo o experimento e a adição de H_2O_2 diminuía a contração do tecido. Facilmente, falsos positivos ocorreriam com a utilização de CaCl_2 no meio de manutenção, pois não haveria direta correlação entre a concentração de H_2O_2 adicionado, lesão muscular evidenciada pela liberação de componentes intracelulares do tecido muscular, e ainda efeito de AAE e MAAE sobre todo este processo.

Como se pretendia avaliar a liberação de componentes intracelulares ao meio de cultura, preferiu-se não utilizar albumina na formulação do meio de cultura. Utilizou-se manitol 32 mM adicionado ao meio Krebs-Hanseleit sem CaCl_2 , o que se mostrou efetivo na manutenção dos músculos em cultura durante todo o tempo necessário ao experimento.

Em experimentos prévios, determinou-se que a concentração 5 mM de H_2O_2 eliciava lesão tecidual detectável em níveis cerca de 10 vezes superior aos de

amostras-controle, verificada pela liberação de proteína e lactato desidrogenase ao meio de manutenção dos músculos (Figura 79).

As análises de liberação de lactato desidrogenase revelaram que, em músculo sóleo (Figura 79 a), constituído majoritariamente de fibras tipo I, não houve diferença entre os músculos tratados com H_2O_2 , ou a combinação de H_2O_2 com AAE ou MAAE. Já para músculo plantar (Figura 79 b), constituído de fibras IIa e IIb quase em mesma proporção, houve maior liberação de lactato desidrogenase para a combinação de H_2O_2 com AAE, do que somente H_2O_2 , ou ainda mais, comparado a H_2O_2 com MAAE. Interessante notar que AAE e MAAE foram fracamente tóxicos aos músculos estudados, mas claramente mais letais ao músculo plantar (Figura 79).

Figura 79. Efeito de AAE, MAAE e H₂O₂ sobre marcadores de morte celular (liberação de proteína e atividade de lactato desidrogenase no meio de cultura) de músculos sóleo e plantar de ratos Wistar. Foram determinadas a concentração de proteína (Figuras a.1 e b.1) e atividade de lactato desidrogenase (Figuras a.2 e b.2) no meio de manutenção de músculos sóleo (Figuras a) e plantar (Figuras b) após 2 h do tratamento com MAAE (20 mM), AAE (20 mM) e H₂O₂ (5 mM). Demais condições experimentais descritas em 3.26.

Utilizando-se GOX (50 mU.mL⁻¹) foram obtidos resultados diferentes (Figura 80). Os β-cetoésteres (20 mM) protegeram ambos os músculos da liberação de proteínas e aumento de atividade de lactato desidrogenase no meio de manutenção dos músculos, sendo que AAE (20 mM) (Figura 80 a2) protegeu cerca de 50% e MAAE (20 mM) (Figura 80 b2) eliminou completamente a lesão induzida por GOX (50 mU.mL⁻¹) em músculo sóleo.

Figura 80. Efeito de AAE, MAAE e GOX sobre marcadores de morte celular (liberação de proteína e atividade de lactato desidrogenase no meio de cultura) de músculos sóleo e plantar de ratos Wistar. Determinação da concentração de proteína (Figuras a.1 e b.1) e atividade de lactato desidrogenase (Figuras a.2 e b.2) no meio de manutenção de músculos sóleo (Figuras a) e plantar (Figuras b) após 2 h do tratamento com MAAE (20 mM), AAE (20 mM) e GOX (50 mU.mL⁻¹). Demais condições experimentais descritas em 3.26.

Analisando-se outros marcadores mais específicos para lesão muscular, como a creatina quinase (CK) e a aspartato aminotransferase (AST), verificou-se que AAE e MAAE (20 mM) protegem o músculo sóleo da ação tóxica de H₂O₂ (5 mM) e GOX (50 mU.mL⁻¹) (Figura 81).

A atividade de CK (Figura 81 a) em meio de manutenção do músculo sóleo exposto a H₂O₂ foi quase 15 vezes maior que o dos músculos expostos a H₂O₂ e MAAE, e cerca de 1,5 vezes maior que aos expostos a H₂O₂ e AAE. A atividade enzimática de AST no meio de cultura mostrou o mesmo perfil de proteção maior

para MAAE do que AAE (Figura 81 b), embora as diferenças tenham sido mais discretas.

Quando os músculos foram expostos a GOX (50 mU.mL⁻¹), não houve alteração da atividade de CK no meio de cultura para os diferentes tratamentos (Figura 81 a). Já no caso da AST (Figura 81 b), verifica-se que MAAE (20 mM) aboliu completamente lesão do músculo sóleo por GOX, enquanto que AAE (20 mM) exerceu 50% de proteção.

Figura 81. Efeito de AAE, MAAE, H₂O₂ e GOX sobre marcadores de morte celular (atividade de creatina quinase (CK) e aspartato aminotransferase (AST) no meio de cultura) de músculos sóleo de ratos Wistar. Determinação das atividades das enzimas creatina quinase (CK) (Figura a) e aspartato aminotransferase (AST) (Figura b) no meio de manutenção de músculos sóleo após 2h do tratamento com MAAE (20 mM), AAE (20 mM), H₂O₂ (5 mM) e GOX (50 mU.mL⁻¹). Demais condições experimentais descritas em 3.26.

Os espectros de absorção de luz dos meios de manutenção dos músculos sóleo e plantar nos diversos tratamentos com H₂O₂ (5 mM) (Figura 82 a.1 e 2) ou GOX (50 mU.mL⁻¹) (Figura 82 b.1 e 2), MAAE (20 mM) e AAE (20 mM), sugerem que diversas espécies de Mb encontram-se presentes. Por exemplo, no tratamento do músculo sóleo com MAAE, e H₂O₂ e MAAE (Figura 82 a.1), aparentemente, o desvio

para o azul da banda *Soret* indica que Mb deva estar na forma Fe^{2+} , ou oxiMb, enquanto que o tratamento com H_2O_2 , H_2O_2 e AAE, e AAE somente, mesmo que numa escala decrescente, apresentam banda *Soret* com máximo em 415 nm, coincidente com uma possível espécie ferrilMb, ou Fe^{4+} .

Os espectros dos meios de manutenção dos músculos sóleo tratados com GOX (50 mU.mL⁻¹), MAAE (20 mM) ou AAE (20 mM) indicam que MAAE protege mais do que AAE contra a presença de Mb alteradas induzida por GOX.

Com o músculo plantar (Figura 82 b.2), os resultados são similares, entretanto, verifica-se que a amostra-controle tem banda *Soret*, mais intensa. Porém, observa-se decréscimo gradativo da banda em amostras de GOX e MAAE, GOX e AAE, e GOX somente, acredita-se, devido à destruição e descoramento da hemeproteína.

Figura 82. Espectros de absorção de luz UV-Vis dos meios de manutenção dos músculos sóleo e plantar tratados com β -cetoésteres e H_2O_2 ou GOX. Condições experimentais: meio de manutenção do músculo sóleo (Figuras a) e plantar (Figuras b) tratados com MAAE (20 mM), AAE (20 mM), (Figuras a.1 e b.1) H_2O_2 (5 mM) ou (Figuras a.2 e b.2) GOX ($50 \text{ mU} \cdot \text{mL}^{-1}$). Demais condições experimentais descritas em 3.26.

A baixa concentração de mioglobina nas células, bem como a pluralidade de suas espécies em diferentes estados de oxidação, nos remete ao estudo da concentração da proteína por imunoenaios de *Western blotting* e ELISA.

O gel SDS-PAGE (Figura 83 a.1) e o *Western blotting* anti-Mb (Figura 83 b.1) de amostras de meio de manutenção dos músculo plantar mostram que há maior liberação de Mb no tratamento com H_2O_2 e AAE, quando comparado aos tratamentos somente com H_2O_2 , ou H_2O_2 e MAAE.

Da mesma forma, os géis SDS-PAGE (Figura 83 a.2) e o *Western blotting* anti-Mb (Figura 83 b.2) de amostras de meio de manutenção dos músculos Sóleo

mostraram que há maior liberação de Mb no tratamento com H_2O_2 , sendo que MAAE (20 mM) protege mais contra esta liberação do que AAE (20 mM).

Figura 83. Caracterização de Mb no meio de cultura de manutenção dos músculos sóleo e plantar tratados com β -cetoésteres e H_2O_2 ou GOX. Tratamentos: Géis SDS-PAGE (Figuras a) de amostras de meio de manutenção de músculos plantar (Figuras 1) e sóleo (Figuras 2) tratados com MAAE (20 mM), AAE (20 mM) e H_2O_2 (5 mM) por 2 h. *Western blots* anti-Mb (Figuras b) foram feitos e a densitometria das bandas ao longo dos tratamentos revelam seus valores de concentração relativa. Demais condições experimentais descritas em 3.26, 3.27 e 3.10.

Com o intuito de mostrar que o MAA ou AA adicionados reagem com ferrilMb gerada intracelularmente em músculos, determinou-se biacetilo em músculos sóleo e plantar expostos a MAAE, H_2O_2 , ou MAAE e H_2O_2 (Figura 84). Biacetilo foi detectado somente em amostras de homogenato do tecido muscular, sendo que no músculo

sóleo ($5,6 \text{ nmol.mg proteína}^{-1}$) sua concentração é mais que o dobro da encontrada no músculo plantar ($2,5 \text{ nmol.mg proteína}^{-1}$). Os meios de cultura, bem como amostras de músculos tratados somente com um dos reagentes, não continham biacetilo.

Figura 84. Perfil da concentração de biacetilo em meio de manutenção e homogenatos de músculos sóleo e plantar de ratos Wistar tratados com MAAE e H_2O_2 . Tratamento: Determinação de biacetilo em meio de manutenção e homogenatos de músculos sóleo e plantar tratados por 2 h com MAAE (20 mM) e H_2O_2 (5 mM). Demais condições experimentais descritas em 3.26 e análise realizada de acordo como descrito em 3.8.

5. Conclusões

Esta tese demonstra que tal como a HRP, Mb é capaz de catalisar a oxidação aeróbica dos metabólitos AA e MAA quando na presença de H_2O_2 equimolar (Figuras 18 e 19). Nesta reação, os compostos β -cetoácidos, como sugerido pela quimioluminescência direta observada (item 4.6), provavelmente sofrem clivagem carbono-carbonila, mediada pela formação de dioxetano e sua termólise, gerando produtos α -dicarbonílicos (metilglioxal e biacetilo, respectivamente) no estado excitado triplete (Figura 87). A vida média de biacetilo triplete, e provavelmente de metilglioxal, é relativamente longa mesmo em meio aerado ($\tau \sim 20 \mu\text{s}$), cerca de 10 vezes maior que de acetona triplete, o que aumenta sobremaneira seu potencial lesivo sobre biomoléculas devido ao seu comportamento biradicalar [147, 106].

A eosina Y mostrou-se um bom sensibilizador dos produtos tripletes (item 4.6), pois amplificou a emissão de luz deste composto quando presente no meio reacional. Embora eosina também emita luz quando oxidada por intermediários oxidantes do sistema [111], esta emissão é mais fraca e menos duradoura, além de apresentar uma cinética de emissão diferente, o que possibilita discriminar a origem da emissão, se mediada por transferência ou por oxidação, como descrito a seguir (baseado em Kamiya e colaboradores (1966) [111], e Duran, Cilento e colaboradores (1978) [153]):

Intersystem crossing e emissão de fluorescência de eosina:

Processo competitivo: supressão radicalar de $\text{Eos}^{3*} (T_2)$ por AA, seguida de dismutação do radical de eosina a produto excitado, que decai por emissão fluorescente:

Figura 85. Mecanismo proposto de oxidação do β -cetoácido AA catalisada por Mb, com peróxido iniciador e na presença de O_2 . A iniciação da oxidação (a) ocorre por abstração de hidrogênio do substrato pela $\text{Mb}/\text{H}_2\text{O}_2$, (b) adição de O_2 no radical centrado no carbono 2 do radical formado, (d) ciclização do hidroperóxido, proveniente da propagação da reação (c) ao dioxetano intermediário. Homólise do dioxetano formando metilglioxal tripleto (e), clivagem Norrish tipo 1 ao radical acetila (f), que poderia modificar estruturalmente o catalisador Mb (g). Biacetilo é o produto da reação quando o substrato for MAA.

A análise de produtos α -dicarbonílicos gerados no sistema (itens 4.4), suporta a via de oxidação proposta por este trabalho (Figura 87). A forte correlação vista para os sistemas Mb, tanto oxi- quanto meta-forma, adicionadas de H_2O_2 , atestam a participação de intermediários oxidantes da hemoproteína na geração dos α -

dicarbonílicos, contribuindo para a elucidação do mecanismo proposto neste trabalho. O consumo acelerado de ferril-Mb conforme se aumenta a concentração de MAA (Figura 21) é consistente com a participação de um intermediário ferril (Composto I) na oxidação de MAA. No sistema oxiMb/H₂O₂, como relatado na literatura [57, 77], acredita-se que a espécie ferrilMb seja a intermediária da oxidação do β -cetoácido. Desta forma a velocidade da reação está condicionada ao decaimento de oxiMb a metaMb para posterior entrada no ciclo peroxidásico da proteína [57, 77]. Ao utilizarmos metaMb nos ensaios, obtivemos rendimentos de compostos α -dicarbonílicos na ordem de 900 vezes maior do que para oxiMb nas mesmas condições experimentais (Figuras 39 e 40).

Neste estudo, a caracterização de espécies reativas apoproteicas de Mb de coração de cavalo (Figuras 22, 23 e 24) evidenciou a intermediação de radicais apoprotéicos nestes experimentos: triptofanila 14 (seqüestrado quando utilizado o DNBBS como agente de captação de spin [141]) e tirosinila 103 (seqüestrado com DMPO [77]). Entretanto, como não há transferência completa de elétron, mesmo quando o substrato se encontra em excesso de mais de 3.000 vezes a concentração de hemeproteína, acreditamos que a oxidação do β -cetoácido ocorra também direta e concomitante pelo radical hemínico. Isto é sugerido pelo fato de que há descoramento da hemeproteína bem como dose-dependência no decaimento da espécie ferrilMb em paralelo à oxidação dos compostos β -cetoácidos estudados.

O perfil de pH avaliado pelo rendimento de biacetilo e consumo de O₂ mostram maior rendimento da reação em pH ácido (item 4.6), condição em que é mais expressiva a atividade peroxidásica de Mb [62].

Os dados de consumo de AA por Mb e H₂O₂ (1:10) sugerem que a queda do consumo de AA acima de 30 mM (Figura 27) deve-se ao descoramento da

hemeproteína pelo produto triplete inicialmente gerado em alta quantidade, ou ainda devido a reciclagem de $AA^\bullet$.

A velocidade de consumo de O_2 mostrou-se dependente da concentração do β -cetoácido e da hemeproteína (Figuras 33, 34 e 35). Além disso, amostras de MAA/Mb/ H_2O_2 consumiram oxigênio 2 vezes mais rápido com Mb: H_2O_2 1:10 em comparação a 1:1. Utilizando como peróxido iniciador *tert*-butilhidroperóxido (Figuras 37, 38 e 39), observou-se dependência da velocidade inicial de consumo de O_2 para a concentração de peróxido. Os dados ajustados e analisados por regressão indicaram que MAA consome O_2 8 vezes mais rapidamente que AA.

Importante notar que H_2O_2 em largo excesso a concentração de Mb resulta em liberação de O_2 , parcialmente no estado excitado singlete segundo Cadenas [142], pela reação do Composto I com H_2O_2 (Figura 36), desta maneira subestimando a resposta do sistema em termos de oxigênio consumido ao aumento da concentração de substrato. Assim, pode-se justificar a falta de linearidade da velocidade inicial de consumo de O_2 por AA, que por ser menos reativo, pode resultar em maior taxa de produção de O_2 pela atividade catalásica de Mb. Por outro lado, radicais advindos da homólise de *tert*-butilhidroperóxido podem funcionar como uma nova fonte de radicais iniciadores da oxidação dos β -cetoácidos, ainda que esta reatividade seja dependente da natureza do substrato, como mostrado.

Os experimentos de EPR com captação de spin por MNP exibiram sinais com baixa relação sinal/ruído, o que possibilitou a aferição precisa dos valores de desdobramento hiperfino para todos os adutos-radicaís de MNP gerados por AA e MAA na presença de Mb/ H_2O_2 (Figuras 65, 66 e 69).

A exploração do efeito de substituição isotópica dos átomos de carbono dos substratos permitiu identificar inequivocamente os radicais de AA como centrados no

C2 (Figura 69), tal como esperado, advindo da abstração de hidrogênio enólico dos β -cetoácidos (Figura 87).

A supressão do aduto-radical MNP-acetila pelo sorbato, um eficiente supressor de cetonas tripletes [112] (Figura 70) de amostras de MAA/Mb/H₂O₂, evidencia a natureza fotoquímica desta espécie, proveniente da clivagem Norrish tipo 1 de biacetilo triplete gerado pela reação [147]. Ressaltamos que o rendimento mensurado de biacetilo está subestimado já que foi determinada apenas a taxa de biacetilo excitado que decaiu para o estado fundamental sem sofrer clivagem *alfa*.

Não se detectou radical acetila nos experimentos de EPR com AA/Mb/H₂O₂, esperado da clivagem de metilgloxal excitado como produto de reação. Entretanto, mostramos acetilação dose-dependente de Mb por AA (Figura 66), bem como dose-dependência do sinal de MNP-AA[•] no consumo de AA (Figuras 67) e à concentração de H₂O₂ (Figuras 71).

Possivelmente os compostos tripletes intermediários da reação são responsáveis pelo aumento de descoloramento na hemeproteína quando exposta a AA ou MAA (Figuras 52 e 55) e H₂O₂, já que tais espécies excitadas apresentam reatividade dirigida a duplas ligações, além de serem capazes de transferir energia a aceptores ou abstrair um átomo de hidrogênio de várias moléculas (Figura 6) [106, 112].

Nas amostras em que H₂O₂ foi gerado em fluxo por glicose/GOX, pode-se notar que a Mb foi extensivamente modificada pelos radicais gerados na oxidação de AA. Devido a profundas alterações na estrutura protéica, haveria alteração na coordenação do heme ao arcabouço protéico (Figura 57). As modificações estruturais que induziram a possível polimerização de Mb detectados por *Western blot* (Figura 55) devem ser analisados no futuro por espectrometria de massas, pois

sabe-se que alterações profundas da estrutura primária da proteína podem levar à exposição de regiões hidrofóbicas da proteína e agregação, que não é revertida pelo tratamento com o desnaturante SDS utilizado na eletroforese.

Modificações estruturais de Mb são mais evidentes quando da adição *in bolus* de H_2O_2 , pois claramente H_2O_2 é um substrato para ferrilMb, que espelha a atividade catalásica de Mb (Figuras 47 e 48).

O conjunto destes resultados permite concluir que, de fato, os β -cetoácidos AA e MAA são oxidados pela abstração de hidrogênio da sua forma enólica por ferrilMb, gerando um intermediário dioxetânico do substrato que por homólise gera produto α -dicarbonílico triplete (Figura 87).

Mostramos também que AA e MAA ao reagir com Mb na presença de H_2O_2 , com adição *in bolus* ou em fluxo (Figuras 57, 63 e 64), vitimiza a proteína, induzindo alterações estruturais, diminuindo sua temperatura de desnaturação (Figura 54) e acúmulo de adutos fluorescentes da oxidação do heme. Acetoacetato mostrou-se um pró-oxidante da Mb, acelerando o descoramento e desorganização de sua estrutura secundária (Figuras 58, 60 e 61), bem como sua acetilação (Figura 53). Já MAA atuou como um antioxidante reduzindo a extensão do descoramento (Figuras 52 e 62) e das alterações de estrutura secundária da hemeproteína (Figura 59 e 60). Entretanto, ambos os substratos interceptam o radical protéico de ferrilMb reduzindo os níveis de clivagem protéica (Figuras 49 e 50), principalmente com AA em altas concentrações. Tratando-se da mesma reação, é paradoxal o efeito redox inverso de AA (pró-oxidante) *versus* MAA (antioxidante). A diferença fundamental entre estes dois substratos é o potencial de redução cerca de 500 mV mais negativo de MAA em relação ao AA devido a sua α -metilação [107]. Esta propriedade o tornaria um redutor, portanto um aniquilador de radicais, mais efetivo que o AA.

Experimentos com ratos nos quais foi administrada uma única injeção ip de AAE ou MAAE (1 g.kg^{-1}) mostraram que houve alterações pouco expressivas nos parâmetros bioquímicos analisados no soro destes animais (Tabelas 2 e 3). Interessante notar que houve aumento estatisticamente significativo na atividade de creatina quinase sérica (CK) para injeção de ambos β -cetoésteres, aludindo a lesão muscular.

Por outro lado, mostramos que o modelo experimental de rabdomiólise largamente utilizado para evidenciar a toxicidade de Mb ao tecido renal [62, 84, 132, 148, 149, 154] não exclui outros fatores ou outras hemoproteínas como agentes etiológicos da lesão renal crônica. Apesar de a concentração de Mb no tecido renal apresentar-se elevada após a indução da rabdomiólise, este aumento é bastante discreto frente à abundância de agregados protéicos (Figura 75). Foi interessante a detecção de aumento massivo de Hb no tecido renal, que pode ser proveniente de maior infiltração de hemácias a este tecido ou hemólise e agregação desta hemoproteína nos *casts* avermelhados acumulados no rim destes animais (Figura 73).

Não houve indução de rabdomiólise ou alteração na indução da rabdomiólise pela injeção im de glicerol em animais que receberam pré-tratamento com MAAE ou AAE em dose crônica ($0,25 \text{ mL.kg}^{-1}$) por 14 dias. Entretanto, os animais pré-tratados com os β -cetoésteres sofreram agravamento da hepatopatia que acompanha o desenvolvimento e recuperação da rabdomiólise (Tabelas 4 e 5).

Sabe-se há muito tempo que tecido hepático não utiliza corpos cetônicos para seu metabolismo basal. Entretanto, neste tecido, a enzima acetoacetato sintase converte AA e coenzima A a acetoacetilCoA acoplada à hidrólise de ATP. A ativação de AA bem como de MAA na forma de seus tioésteres dirige estes compostos à

síntese de colesterol ou oxidação pelas enzimas de degradação de ácidos graxos, altamente expressas neste tecido.

Ao verificarmos que animais pré-tratados com AAE, mas não MAAE, quando induzidos a rabdomiólise, tiveram aumento significativo da atividade de GLOI no tecido hepático, levantamos a possibilidade de que metilglioxal superproduzido pelo estresse hepático induzido por AAE pudesse contribuir para o estabelecimento de rabdomiólise, pois é sabido que metilglioxal é um potente eletrófilo agregador de proteínas pela formação de bases de Schiff [155]. No caso do tecido renal, da mesma forma, houve aumento da atividade desta enzima quando expressa por peso fresco de tecido. Acreditamos que a normalização por peso fresco da atividade enzimática em amostras de rins de animais acometidos de rabdomiólise seja mais precisa, pois com o desenvolvimento da doença há acúmulo de múltiplas proteínas neste tecido.

É importante notar que assim como a oxidação de AA e MAA depende da interação de Mb com H_2O_2 , os prováveis efeitos citotóxicos de AAE e MAAE devem se revelar apenas em situações acopladas a eventos de estresse oxidativo, como da indução de rabdomiólise.

O modelo experimental de rabdomiólise descrito na literatura (injeção im de glicerol 50% na dose de 10 mL.kg^{-1}), apesar de resultar em aumento significativo da concentração de Mb no tecido renal, carece de evidências de que a lesão renal crônica típica da doença seja mediada exclusivamente ou majoritariamente por Mb. Hemoglobina acumula-se mais expressivamente nos rins. Quando na forma de suas sub-unidades, Hb é facilmente confundida com Mb se analisada por técnicas espectroscópicas, largamente utilizadas nos trabalhos da literatura com este modelo animal [132]. Mioglobina encontra-se acumulada em células musculares estriadas

cardíacas ou esqueléticas, fibras vermelhas. Notadamente, outras células ricas em heme-peroxidases poderiam ser estudadas como potencialmente alvo/geradoras de espécies reativas derivadas de AA e MAA, tais como neutrófilos, ricos em peroxidases específicas, e eosinófilos, ricos em mieloperoxidase.

Outra contribuição importante foi o estudo da taxa de consumo de AA ou MAA como substratos fisiológicos por tais células. Quanto mais glicolíticas, ou menos oxidativas, mais propensas ao acúmulo intracelular de AA ou MAA, resultando na reação destes compostos com peroxidases endógenas. As peroxidases endógenas devem estar ativadas por peróxidos a reciclarem entre seus estados variados de oxidação: Mb Fe^{II}, ferro; Mb Fe^{III}, ferri; Mb Fe^{IV}, ferril; Mb Fe^V, perferril. Sob este aspecto, AA e MAA seriam pró- ou antioxidantes, respectivamente, frente a um estresse anterior.

Os estudos com células BAEOC (Figura 76), objetivaram demonstrar o potencial citotóxico de ferrilMb adicionada ao meio de cultura destas células endoteliais, e um possível papel deletério sinérgico deste agente quando na presença de AA. Entretanto, verificamos que a queda de viabilidade celular e citotoxicidade para estas células mediada por AAE e Mb/H₂O₂ não se distinguiu do efeito de Mb/H₂O₂. Daí a escolha de culturas de células ricas em Mb, cujo objetivo seria estudar o possível potencial citotóxico desta proteína atuando como peroxidase intracelular durante a cetogênese.

Células em cultura de laboratório são mantidas sob hiperóxia e sabe-se que a expressão de Mb em células musculares é incitada pela hipóxia e contração, via mobilização de cálcio [156]. Por isso a cultura de células C2C12, tentativamente utilizadas neste trabalho, embora consideradas modelo confiável de fibras brancas, com metabolismo mais glicolítico e pobres em Mb, não se prestou àqueles objetivos.

O estudo com os músculos plantar e sóleo isolados de pernas de ratos indicaram que AAE e MAAE administrados ao meio de cultura são incorporados às células, onde devem sofrer hidrólise catalisada por esterases intracelulares, liberando AA e MAA. Estes compostos, em músculo sóleo, exerceram efeito antioxidante frente ao desafio com H_2O_2 (5 mM) ou glicose/GOX (100 mU.mL^{-1}). Finalmente, ressaltamos a detecção de biacetilo em homogenatos de músculos tratados *ex vivo* com MAAE e H_2O_2 , o que era esperado dos estudos da oxidação *in vitro* de MAA a bicetilo triplete por Mb/ H_2O_2 . Não se detectou biacetilo em músculos que foram tratados apenas com MAAE ou H_2O_2 , nem em seus meios de cultura, o que denota, claramente, que biacetilo é oriundo da reação de MAA com ferrilMb disponibilizados intracelularmente. Estes resultados mostraram convergência entre a hipótese inicial de tese, abordada através de experimentos *in vitro*, e a constatação *in vivo* dos efeitos citotóxicos de β -cetoácidos acumulados no músculo em altos níveis mediados por Mb.

6. Referências Bibliográficas

-
- ¹ Jain, SK; Mc Vie, R; Bocchini Jr, JA. Hyperketonemia (ketosis), oxidative stress and type 1 diabetes. *Pathophysiology* 13: 163-70; 2006.
- ² Peyroux, J; Sternberg, M. Advanced glycation endproducts (AGEs): pharmacological inhibition in diabetes. *Patholog. Biol.* 54: 405-19; 1996.
- ³ Baynes, JW; Thorpe, SR. Role of Oxidative stress in diabetic complications: A new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 48: 1-9; 1999.
- ⁴ Jain, SK; McVie, R; Jaramillo, JJ; Chen, Y. Hyperketonemia (acetoacetate) increases the oxidizability of LDL/VLDL in type-I diabetic patients. *Free Radic. Biol. Med.* 24: 175-181; 1998.
- ⁵ Jain, SK; McVie, R. Hyperketonemia can increase lipid peroxidation and lower glutathione levels in human erythrocytes in vitro and in type 1 diabetic patients. *Diabetes* 48: 1850-5; 1999.
- ⁶ Jain, SK; Kannan, K; Lim, G. Ketosis (acetoacetate) can generate oxygen radicals and cause increased lipid peroxidation and growth inhibition in human endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 25: 1083-8; 1998.
- ⁷ Jain, SK; McVie, R; Jackson, R; Levine, SN; Lim, G. Effect of hyperketonemia on plasma lipid peroxidation levels in diabetic patients. *Diabetes Care.* 22: 1171-5; 1999.

-
- ⁸ Goto, J; Ishii, N; Mizuno, A; Takamatsu, K. Enhancement of fat metabolism by repeated bouts of moderate endurance exercise. *J. Appl. Physiol.* 102: 2158-64; 2007.
- ⁹ Malik, VS; Hu, FB. Popular weight-loss diets: from evidence to practice. *Nature Clin. Pract.* 4: 34-41; 2007.
- ¹⁰ Adam-Perrot, A; Clifton, P; Brouns, F. Low-carbohydrate diets: nutritional and physiological aspects. *Obesity Rev.* 7: 49-58; 2006.
- ¹¹ Sankar, R; Menezes, MS. Metabolic and endocrine aspects of the ketogenic diet. *Epilepsy Res.* 37: 191-201; 1999.
- ¹² Scott, CR. The genetic tyrosinemias. *Am. J. Med. Gen.* 142: 121-6; 2006.
- ¹³ Abdelmegeed, MA; Kim, SK; Woodcroft, KJ; Novak, RF. Acetoacetate activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase in primary cultured red hepatocytes: role of oxidative stress. *J. Pharm. Exp. Ther.* 310: 728-36; 2004.
- ¹⁴ Guarino, MP; Afonso, RA; Raimundo, N; Raposo, JF; Macedo, MP. Hepatic glutathione and nitric oxide are critical for hepatic insulin-sensitizing substance action. *Am. J. Physiol.* 284: G-588-94; 2003.

-
- ¹⁵ Nosadini, R; Brocco, E. Relationships among microalbuminuria, insulin resistance and renal-cardiac complications in insulin dependent and non insulin dependent diabetes. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 105: 1-7; 1997.
- ¹⁶ Jin, SM; Noh, CI; Yang, SW; Bae, EJ; Shin, CH; Chung, HR; Kim, YY; Yun, YS. Endothelial dysfunction and microvascular complications in type 1 diabetes mellitus. *J. Korean Med. Sci.* 23: 77-82; 2008.
- ¹⁷ Peyroux, J; Sternberg, M. Advanced glycation endproducts (AGEs): pharmacological inhibition in diabetes. *Pathol. Biol.* 54: 405-19; 2006.
- ¹⁸ Thomalley, PJ. Dicarbonyl intermediates in the *Maillard* reaction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1043: 111-7; 2005.
- ¹⁹ Miyata, T; Inagi, R; Asahi, K; Yamada, Y; Horie, K; Sakai, H; Uchida, K; Kurokawa, K. Generation of protein carbonyls by glycoxidation and lipoxidation reactions with autoxidation products of ascorbic acid and polyunsaturated fatty acids. *FEBS Lett.* 437: 24-8; 1998.
- ²⁰ Singh, R; Barden, A; Beilin, L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 44: 129-46; 2001.
- ²¹ Berlett, BS; Stadtman, ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 272: 20313-6; 1997.

-
- ²² Okado-Matsumoto, A; Fridovich, I. The role of α,β -dicarbonyl compounds in the toxicity of short chain sugars. *J. Biol. Chem.* 275: 34853-7; 2000.
- ²³ Knott, HM; Brown, BE; Davies, MJ; Dean, RT. Glycation and glycooxidation of low-density lipoproteins by glucose and low-molecular mass aldehydes. *Eur. J. Biochem.* 270: 3572-82; 2003.
- ²⁴ Turk, Z; Nemet, I; Varga-Defteardarović, L; Car, N; Elevated level of methylglyoxal during diabetic ketoacidosis and its recovery phase. *Diabetes Metab.* 32: 176-80; 2006.
- ²⁵ Wondrak, GT; Cervantes-Laurean, D; Roberts, MJ; Qasem, JG; Kim, M; Jacobson, EL; Jacobson, MK. Identification of α -dicarbonyl scavengers for cellular protection against carbonyl stress. *Biochem. Pharm.* 63: 361-73; 2002.
- ²⁶ Beisswenger, PJ; Drummond, KS; Nelson, RG; Howell, SK; Szwergold, BS; Mauer, M. Susceptibility to diabetic nephropathy is related to dicarbonyl and oxidative stress. *Diabetes* 54: 3274-81; 2005.
- ²⁷ Manini, P; La Pietra, P; Panzella, L; Napolitano, A; d'Ischa, M. Glyoxal formation by Fenton-induced degradation of carbohydrates and related compounds. *Carbohydr. Res.* 341: 1828-33; 2006.

-
- ²⁸ Ahmed, N; Babaei-Jadidi, R; Howell, SK; Beisswenger; Thornalley, PJ. Degradation products of proteins damaged by glycation, oxidation and nitration on clinical type 1 diabetes. *Diabetologia* 48: 1590-603; 2005.
- ²⁹ Pereira, B; Costa Rosa, LFB; Safi, DA; Bechara, EJH; Curi, R. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in the lymphoid organs of diabetic rats. *J. Endocrinol.* 142: 161-5; 1994.
- ³⁰ Noh, HS; Hah, YS; Nilufar, R; Han, J; Bong, J; Kang, SS; Cho, GJ; Choi, WS. Acetoacetate protects neuronal cells from oxidative glutamate toxicity. *J. Neurosc. Res.* 83: 702-9; 2006.
- ³¹ Squires, JE; Sun, J; Caffrey, JL; Yoshishige, D; Mallet, RT. Acetoacetate augments β -adrenergic inotropism of stunned myocardium by an antioxidant mechanism. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 284: H1340-7; 2003.
- ³² Mallet, RT; Sun, J. Antioxidant properties of myocardial fuels. *Mol. Cel. Biochem.* 253: 103-11; 2003.
- ³³ Stafstrom, CE. Animal models of the ketogenic diet: what have we learned, what can we learn? *Epilepsy Res.* 37: 241-59; 1999.

-
- ³⁴ Melo, TM; Nehlig, A; Sonnewald, U. Neuronal–glial interactions in rats fed a ketogenic diet. *Neurochem. Int.* 48: 498-507; 2006.
- ³⁵ Roy, A; Sen, S; Chakraborti, AS. In vitro nonenzimatic glycation enhances the role of myoglobin as a source of oxidative stress. *Free Rad. Res.* 38: 139-46; 2004.
- ³⁶ Harrison, JE; Saeed, FA. Acetoacetate is an electron donor to myeloperoxidase and a promoter of myeloperoxidase-catalysed fatty acid peroxidation. *Biochem. Med.* 26: 339-55; 1981.
- ³⁷ Milligan, LP; Baldwin, RL. The conversion of acetoacetate to pyruvaldehyde. *J. Biol. Chem.* 242: 1095-1101; 1967.
- ³⁸ Takayama, K; Nakano, M; Zinner, K; Vidigal, CCC; Durán, N; Shimizu, Y; Cilento, G. Generation of electronic energy in the myoglobin-catalysed oxidation of acetoacetate to methylglyoxal. *Arch. Biochem. Biophys.* 176: 663-70; 1976.
- ³⁹ Wang, Z; Qin, H. Reaction of 1,3-dicarbonyl compounds with o-phenylenediamine or 3,3'-diaminobenzidine in water or under solvent-free conditions via microwave irradiation. *J. Heterocyclic Chem.* 42: 1001-5; 2005.
- ⁴⁰ Saha, AK; Vavvas, D; Kurowski, TG; Apazidis, A; Witters, LA; Shafrir, E; Ruderman, NB. Malonyl-CoA regulation in skeletal muscle: its link to cell citrate and the glucose-fatty acid cycle. *Am. J. Physiol.* 272: E641-8; 1997.

⁴¹ Ruderman, NB; Goodman, MN; Berger, M; Hagg, S. Effect of starvation on muscle glucose metabolism: studies with the isolated perfused rat hindquarter. *Fed. Proc.* 36: 171-6; 1977.

⁴² Ohmori, H; Kawai, K; Yamashita, K. Enhanced ketone body uptake by perfused skeletal muscle in trained rats. *Endocrinol. Jpn.* 37: 421-9; 1990.

⁴³ Jeffrey, FM; Diczku, V; Sherry, AD; Malloy, CR. Substrate selection in the isolated working rat heart: effects of reperfusion, afterload, and concentration. *Basic Res. Cardiol.* 90: 388-96; 1995.

⁴⁴ Taegtmeyer, H. On the inability of ketone bodies to serve as the only energy providing substrate for rat heart at physiological work load. *Basic Res. Cardiol.* 78: 435-50; 1983.

⁴⁵ Russell, RR 3rd; Taegtmeyer, H. Coenzyme A sequestration in rat hearts oxidizing ketone bodies. *J. Clin. Invest.* 89: 968-73; 1992.

⁴⁶ Russell, RR 3rd; Taegtmeyer H. Changes in citric acid cycle flux and anaplerosis antedate the functional decline in isolated rat hearts utilizing acetoacetate. *J. Clin. Invest.* 87: 384-90; 1991.

-
- ⁴⁷ Kashiwaya, Y; Sato, K; Tsuchiya, N; Thomas, S; Fell, DA; Veech, RL; Passonneau, JV. Control of glucose utilization in working perfused rat heart. *J. Biol. Chem.* 269: 25502-14; 1994.
- ⁴⁸ Weidemann, MJ; Krebs, HA. The fuel of respiration of rat kidney cortex. *Biochem. J.* 112: 149-66; 1969.
- ⁴⁹ Cook, WM; Purchase, R; Ford, GP; Creasy, DM; Brantom, PG; Gangolli, SD. A 28-day feeding study with ethyl acetoacetate in rats. *Food Chem. Toxicol.* 30: 567-73; 1992.
- ⁵⁰ Owen, OE; Reichard, GA; Markus, H; Boden, G; Mozzoli, MA; Shuman, CR. Rapid intravenous sodium acetoacetate infusion in man. Metabolic and kinetic responses. *J. Clin. Invest.* 52: 2606-16; 1973.
- ⁵¹ Tidwell, HC; Axelrod, HE. Blood sugar after injection of acetoacetate. *J. Biol. Chem.* 172: 179-84; 1948.
- ⁵² Tidwell, HC; Nagler, ME. Effect of acetoacetate upon utilization of carbohydrate. *J. Biol. Chem.* 201: 727-33; 1953.
- ⁵³ Milder, JB; Liang, LP; Patel, M. Acute oxidative stress and systemic Nrf2 activation by the ketogenic diet. *Neurobiol. Dis.* 40: 238-44; 2010.

-
- ⁵⁴ Nazarewicz, RR; Ziolkowski, W; Vaccaro, PS; Ghafourifar, P. Effect of short-term ketogenic diet on redox status of human blood. *Rejuvenation Res.* 10: 435-40; 2007.
- ⁵⁵ Nantes, IL; Zucchi, MR; Nascimento, OR; Faljoni-Alario, A. Effect of heme iron valence state on the conformation of cytochrome c and its association with membrane interfaces. *J. Biol. Chem.* 276: 153-8; 2001.
- ⁵⁶ Belikova, NA; Vladimirov, YA; Osipov, NA; Kapralov, AA; Tyurin, VA; Potapovich, MV; Basova, LV; Peterson, J; Kurnikov, IV; Kagan, VE. Peroxidase activity and structural transitions of cytochrome c bound to cardiolipin-containing membranes. *Biochemistry* 45: 4998-5009; 2006.
- ⁵⁷ Reeder, BJ; Svistunenko, DA; Sharpe, MA; Wilson, MT. Characteristics and mechanism of formation of peroxide-induced heme to protein cross-linking in myoglobin. *Biochemistry* 41: 367-75; 2002.
- ⁵⁸ Hiner, ANP; Raven, EL; Thorneley, RNF; García-Cánovas, F; Rodríguez-López, JN. Mechanisms of compound I formation in heme peroxidases. *J. Inorg. Biochem.* 91: 27-34; 2002.

-
- ⁵⁹ Yokota, KJ; Yamazaki, I. Analysis and computer simulation of aerobic oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide catalyzed by horseradish peroxidase? *Biochemistry* 16: 1913-20; 1977.
- ⁶⁰ DeLano, WL. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA. Disponível em: <http://www.pymol.org>.
- ⁶¹ Herleth, HP; Ryde, U; Rydberg, P; Görbitz, CH; Andersson, KK. Structures of the high-valent metal-ion haem-oxygen intermediates in peroxidases, oxygenases and catalases. *J. Inorg. Biochem.* 100: 460-76; 2006.
- ⁶² Reeder, BJ; Wilson, MT. The effects of the pH on the mechanism of hydrogen peroxide and lipid hydroperoxide consumption by myoglobin: a role for the protonated ferryl species. *Free Radic. Biol. Med.* 30: 1311-8; 2001.
- ⁶³ Rydberg, P; Sigfridsson, E; Ryde, U. On the role of the axial ligand in heme proteins: a theoretical study. *J. Biol. Inorg. Chem.* 9: 203-23; 2004.
- ⁶⁴ Baader WJ, Bohn C, Cilento G, Dunford HB. Peroxidase-catalyzed formation of triplet acetone and chemiluminescence from isobutyraldehyde and molecular oxygen. *J. Biol. Chem.* 260: 10217-25; 1985.

-
- ⁶⁵ Gunther, MR. Probing the free radicals formed in the metmyoglobin-hydrogen peroxide reaction. *Free Radic. Biol. Med.* 36: 1345-54; 2004.
- ⁶⁶ Kelman, DJ; DeGray, JA; Mason, RP. Reaction of myoglobin with hydrogen peroxide forms a peroxy radical which oxidizes substrates. *J. Biol. Chem.* 269: 7458-63; 1994.
- ⁶⁷ Harris, MN; Burchiel, SW; Winyard, PG; Engen, JR; Mobarak, CD; Timmins, GS. Determining the site of spin trapping of the equine myoglobin radical by combined use of EPR, electrophoretic purification, and mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* 15: 1589-94; 2002.
- ⁶⁸ Reeder, BJ; Svistunenko, DA; Sharpe, MA; Wilson, MT. Characteristics and mechanism of formation of peroxide-induced heme to protein cross-linking in myoglobin. *Biochemistry* 41: 367-75; 2002.
- ⁶⁹ Catalano, CE; Choe, YS; de Montellano, PRO. Reactions of the protein radical in peroxide-treated myoglobin. Formation of a heme-protein cross-link. *J. Biol. Chem.* 264: 10534-41; 1989.
- ⁷⁰ Sadrzadeh, SMH; Graf, E; Panter, SS; Hallaway, PE; Eaton, JW. Hemoglobin. A biological Fenton reagent. *J. Biol. Chem.* 259: 14354-6; 1984.

⁷¹ Gutteridge, JMC. Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. *FEBS Letters*. 201: 291-5; 1986.

⁷² Keszler, A; Mason, RP; Hogg, N. Immuno-spin trapping of hemoglobin and myoglobin radicals derived from nitrite-mediated oxidation. *Free Radic. Biol. Med.* 40: 507-15; 2006.

⁷³ Ranguelova, K; Mason, RP. New insights into the detection of sulfur trioxide anion radical by spin trapping: radical trapping versus nucleophilic addition. *Free Radic. Biol. Med.* 47: 128-34; 2009.

⁷⁴ Stadler, K; Bonini, MG; Dallas, S; Duma, D; Mason, RP; Kadiiska, MB. Direct evidence of iNOS-mediated in vivo free radical production and protein oxidation in acetone-induced ketosis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295:E456-62; 2008.

⁷⁵ Chatterjee, S; Ehrenshaft, M; Bhattacharjee, S; Deterding, LJ; Bonini, MG; Corbett, J; Kadiiska, MB; Tomer, KB; Mason, RP. Immuno-spin trapping of a post-translational carboxypeptidase B1 radical formed by a dual role of xanthine oxidase and endothelial nitric oxide synthase in acute septic mice. *Free Radic. Biol. Med.* 46: 454-61; 2009.

-
- ⁷⁶ Ramirez, DC; Gomez Mejiba, SE; Mason, RP. Mechanism of hydrogen peroxide-induced Cu,Zn-superoxide dismutase-centered radical formation as explored by immuno-spin trapping: the role of copper- and carbonate radical anion-mediated oxidations. *Free Radic. Biol. Med.* 38: 201-14; 2005.
- ⁷⁷ Detweiler, CD; Lardinois, OM; Deterding, LJ; de Montellano, PR; Tomer, KB; Mason, RP. Identification of the myoglobin tyrosyl radical by immuno-spin trapping and its dimerization. *Free Radic. Biol. Med.* 38: 969-76; 2005.
- ⁷⁸ Nagy, P; Kettle, AJ; Winterbourn, CC. Superoxide-mediated formation of tyrosine hydroperoxides and methionine sulfoxide in peptides through radical addition and intramolecular oxygen transfer. *J. Biol. Chem.* 284: 14723-33; 2009.
- ⁷⁹ Das, AB; Nagy, P; Abbott, HF; Winterbourn, CC; Kettle, AJ. Reactions of superoxide with the myoglobin tyrosyl radical. *Free Radic. Biol. Med.* 48: 1540-7; 2010.
- ⁸⁰ Szuchman-Sapir, AJ; Pattison, DI; Ellis, NA; Hawkins, CL; Davies, MJ; Witting, PK. Hypochlorous acid oxidizes methionine and tryptophan residues in myoglobin. *Free Radic. Biol. Med.* 45: 789-98; 2008.
- ⁸¹ Cossins, A; Berenbrink, M. Physiology: Myoglobin's new clothes. *Nature* 454: 416-7, 2008.

-
- ⁸² Poderoso, JJ; Peralta, JG; Lisdero, CL; Carreras, MC; Radisic, M; Schöpfer, F; Cadenas, E; Boveris, A. Nitric oxide regulates oxygen uptake and hydrogen peroxide release by the isolated beating rat heart. *Am. J. Physiol.* 274: C112-9; 1998.
- ⁸³ Tota, B; Quintieri, AM; Angelone, T. The emerging role of nitrite as an endogenous modulator and therapeutic agent of cardiovascular function. *Curr. Med. Chem.* 17:1915-25; 2010.
- ⁸⁴ Hendgen-Cotta, UB; Flögel, U; Kelm, M; Rassaf, T. Unmasking the Janus face of myoglobin in health and disease. *Exp. Biol.* 213:2734-40; 2010.
- ⁸⁵ Hendgen-Cotta, UB; Kelm, M; Rassaf, T. A highlight of myoglobin diversity: the nitrite reductase activity during myocardial ischemia-reperfusion. *Nitric Oxide* 22:75-82; 2010.
- ⁸⁶ Nicolis, S; Pennati, A; Perani, E; Monzani, E; Sanangelotoni, AM; Casella, L. Easy Oxidation and nitration of human myoglobin by nitrite and hydrogen peroxide. *Chemistry* 12: 749-57; 2006.
- ⁸⁷ Herold S. Nitrotyrosine, dityrosine, and nitrotryptophan formation from metmyoglobin, hydrogen peroxide, and nitrite. *Free Radic. Biol. Med.* 36: 565-79; 2004.

-
- ⁸⁸ Herold, S; Shivashankar, K; Mehl, M. Myoglobin scavenges peroxynitrite without being significantly nitrated. *Biochemistry* 41: 13460-72; 2002.
- ⁸⁹ Nicolis, S; Zucchelli, M; Monzani, E; Casella, L. Myoglobin modification by enzyme-generated dopamine reactive species. *Chemistry* 14: 8661-73; 2008.
- ⁹⁰ Krishna, MC; Samuni, A; Taira, J; Goldstein, S; Mitchell, JB; Russo, A. Stimulation by nitroxides of catalase-like activity of hemeproteins. Kinetics and mechanism. *J. Biol. Chem.* 271: 26018-25; 1996.
- ⁹¹ Galaris, D; Cadenas, E; Hochstein, P. Redox cycling of myoglobin and ascorbate: a potential protective mechanism against oxidative reperfusion injury in muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* 273: 497-504; 1989.
- ⁹² Monzani, E; Nicolis, S; Roncone, R; Barbieri, M; Granata, A; Casella, L. Protein self-modification by heme-generated reactive species. *IUBMB Life* 60: 41-56; 2008.
- ⁹³ Giulivi, C; Cadenas, E. The reaction of ascorbic acid with different heme iron redox states of myoglobin. Antioxidant and prooxidant aspects. *FEBS Lett.* 332: 287-90; 1993.
- ⁹⁴ Egawa, T; Shimada, H; Ishimura, Y. Formation of compound I in the reaction of native myoglobins with hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 275: 34858-66; 2000.

-
- ⁹⁵ Gunther, MR. Probing the free radicals formed in the metmyoglobin-hydrogen peroxide reaction. *Free Rad. Biol. Med.* 36: 1345-54; 2004.
- ⁹⁶ Mehlhorn, RJ; Swanson, CE. Nitroxide-stimulated H₂O₂ decomposition by peroxidases and pseudoperoxidases. *Free Radic. Res. Commun.* 17:157-75, 1992.
- ⁹⁷ Lardinois, OM; Maltby, DA; Medzihradsky, KF; de Montellano, PR; Tomer, KB; Mason, RP; Deterding, LJ. Spin scavenging analysis of myoglobin protein-centered radicals using stable nitroxide radicals: characterization of oxoammonium cation-induced modifications. *Chem. Res. Toxicol.* 22: 1034-49, 2009.
- ⁹⁸ Stadtman, ER. Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 928: 22-38; 2001.
- ⁹⁹ Stadtman, ER; Levine, RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25: 207-18; 2003.
- ¹⁰⁰ Requena, JR; Levine, RL; Stadtman, ER. Recent advances in the analysis of oxidized proteins. *Amino Acids* 25: 221-6; 2003.
- ¹⁰¹ Oettl, K; Marsche, G. Redox state of human serum albumin in terms of cysteine-34 in health and disease. *Methods Enzymol.* 474: 181-95; 2010.

¹⁰² Rahmanto, AS; Morgan, PE; Hawkins, CL; Davies, MJ. Cellular effects of peptide and protein hydroperoxides. *Free Radic. Biol. Med.* 48: 1071-8; 2010.

¹⁰³ Quijano, C; Castro, L; Peluffo, G; Valez, V; Radi, R. Enhanced mitochondrial superoxide in hyperglycemic endothelial cells: direct measurements and formation of hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293: H3404-14; 2007.

¹⁰⁴ Indig, G; Campa, A; Bechara, EJH; Cilento, G. Conjugate diene formation promoted by triplet acetone acting upon arachidonic acid. *Photochem. Photobiol.* 48: 719-23; 1988.

¹⁰⁵ Bohne, C; MacDonald, D; Dunford, B. Transient state kinetics of the reactions of isobutyraldehyde with Compounds I and II of horseradish peroxidase. *J. Biol. Chem.* 262: 3572-8; 1987.

¹⁰⁶ Cilento, G; Adam, W. From free radical to electronically excited species. *Free Radic. Biol. Med.* 19: 103-14; 1995.

-
- ¹⁰⁷ Royer, LO; Knudsen, FS; Oliveira, MA; Tavares, MFM; Bechara, EJJ. Peroxynitrite-initiated oxidation of acetoacetate and 2-methylacetoacetate esters by oxygen: potential sources of reactive intermediates in keto acidoses. *Chem. Res. Toxicol.* 17: 1726-32; 2004.
- ¹⁰⁸ Grande, KD; Rosenfeld, SM. Tautomeric equilibrium in acetoacetic Acid. *J. Org. Chem.* 45: 1626-1628; 1980.
- ¹⁰⁹ Adkins, H; Cox, FW. Relative oxidation-reduction reactivities of ketones and aldehydes and applications in synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 60: 1151-9; 1938.
- ¹¹⁰ Knudsen, FS; Penatti, CA; Royer, LO; Bidart, KA; Christoff, M; Ouchi, D; Bechara, EJJ. Chemiluminescent aldehyde and α -diketone reactions promoted by peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* 13: 317-26; 2000.
- ¹¹¹ Kamiya, I; Iwaki, R. Studies of chemiluminescence of several xanthene dyes. 1. Kinetic studies of uranine and eosine chemiluminescence. *Bull. Chem. Soc. Japan* 39: 257-63; 1966.
- ¹¹² Velosa, AC; Baader, WJ; Stevani, CV; Mano, CM; Bechara, EJ. 1,3-diene probes for detection of triplet carbonyls in biological systems. *Chem. Res. Toxicol.* 20: 1162-9; 2007.

-
- ¹¹³ Hardman, KD; Eylar, EH; Ray, DK; Banaszak, LJ; Gurd, FRN. Isolation of sperm whale myoglobin by low temperature fractionation with ethanol and metallic ions. *J. Biol. Chem.* 241: 432-42; 1966.
- ¹¹⁴ Hapner, KD; Bradshaw, RA; Hartzel, DR; Gurd, FRN. Comparison of myoglobins from harbor seal, porpoise, and sperm whale. I. Preparation and characterization. *J. Biol. Chem.* 243: 683-9; 1968.
- ¹¹⁵ Krebs, HA; Eggleston, LV. Metabolism of acetoacetate in animal tissues 1. *Biochem. J.* 39: 408-19; 1945.
- ¹¹⁶ Kaur, H. A Water Soluble C-Nitroso-Aromatic Spin-Trap 3,5-Dibromo-4-Nitrosobenzenesulphonic Acid. The Perkins Spin-Trap. *Free Rad. Res.* 24: 409-20; 1996.
- ¹¹⁷ Wolff, SP. Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. *Methods Enzymol.* 233: 182-9; 1994.
- ¹¹⁸ Bou, R; Codony, E; Tres, A; Decker, EA; Guardiola, F. Determination of hydroperoxides in foods and biological samples by the ferrous oxidation-xylenol orange method: a review of the factors that influence the method's performance. *Anal. Biochem.* 377: 1-15; 2008.
- ¹¹⁹ Walker, PG. A colorimetric method for the estimation of acetoacetate. *Biochem. J.* 58: 699-704, 1954.

¹²⁰ Robinson, J; Cooper, JM. Method of determining oxygen concentration in biological media, suitable for calibrations of the oxygen electrode. *Anal. Biochem.* 33: 390-9; 1970.

¹²¹ Bednarski, W; Jedrychowski, L; Hammond, EG; Nikolov, ZL. A method for the determination of α -dicarbonyl compounds. *J. Dairy Sci.* 72: 2474-7; 1989.

¹²² Ferreira, ACS; Reis, S; Rodrigues, C; Oliveira, C; Pinho, PG. Simultaneous determination of ketoacids and dicarbonyl compounds, key Maillard intermediates on the generation of aged wine aroma. *J. Food Sci.* 72: S314-8; 2007.

¹²³ Heukeshoven, J; Demick, R. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 6: 103-12; 1985.

¹²⁴ Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254; 1976.

¹²⁵ Zor, T; Selinger, Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal. Biochem.* 236: 302-8; 1996.

-
- ¹²⁶ Grant, KB; Patabhi, S. Use of a fluorescence microplate reader for the detection and characterization of metal-assisted peptide hydrolysis. *Anal. Biochem.* 15: 196-201; 2001.
- ¹²⁷ Nagababu, E; Rifkind, JM. Reaction of Hydrogen Peroxide with Ferrylhemoglobin: Superoxide Production and Heme Degradation. *Biochemistry* 39: 12503-11; 2000.
- ¹²⁸ Olsen, KW. Thermal denaturation procedures for hemoglobin. *Methods Enzymol.* 231: 514-24; 1994.
- ¹²⁹ Kelly, SM; Jess, TJ; Price, NC. How to study protein by circular dichroism. *Biochem. Biophys. Acta.* 1751: 119-39; 2005.
- ¹³⁰ Mottley, C; Robinson, RE; Mason, RP. Free radical formation in the oxidation of malondialdehyde and acetylacetone by peroxidase enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 15: 153-60; 1991.
- ¹³¹ Durling, DR. Simulation of Multiple Isotropic Spin Trap EPR Spectra. *J. Magn. Reson. B.* 104: 105-110, 1994.

¹³² Moore, KP; Holt, SG; Patel, RP; Svistunenko, DA; Zackert, W; Goodier, D; Reeder, BJ; Clozel, M; Anand, R; Cooper, CE; Morrow, JD; Wilson, MT; Darley-Usmar, V; Roberts, LJ 2nd. A causative role for redox cycling of myoglobin and its inhibition by alkalinization in the pathogenesis and treatment of rhabdomyolysis-induced renal failure. *J. Biol. Chem.* 273: 31731-7; 1998.

¹³³ McLellan, AC; Thornalley, PJ; Benn, J; Sonksen, PH. Glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications. *Clin. Sci. (Lond.)* 87: 21-9; 1994.

¹³⁴ Lowry, OH; Rosebrough, NJ; Farr, AL; Randall, RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-75; 1951.

¹³⁵ Blau, HM; Pavlath, GK; Hardeman, EC; Chiu, CP; Silberstein, L; Webster, SG; Miller, SC; Webster, C. Plasticity of the differentiated state. *Science* 230: 758-66; 1985.

¹³⁶ Berridge, MV; Tan, AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* 303: 474-82; 1993.

-
- ¹³⁷ O'Brien, PJ; Shen, H; McCutcheon, LJ; O'Grady, M; Byrne, PJ; Mirsalimi, MS; Julian, RJ; Sargeant, JM; Tremblay, RR. Rapid, simple and sensitive microassay for skeletal and cardiac muscle myoglobin and hemoglobin: use in various animals indicates functional role of myohemoproteins. *Mol. Cell. Biochem.* 112: 45-52; 1992.
- ¹³⁸ Bouskila, M; Hirshman, MF; Jensen, J; Goodyear, LJ; Sakamoto, K. Insulin promotes glycogen synthesis in the absence of GSK3 phosphorylation in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 294: E28-E35; 2008.
- ¹³⁹ Edwards, JN; Macdonald, WA; Van der Poel, C; Stephenson, DG. $O_2^{\cdot -}$ production at 37°C plays a critical role in depressing titanic force of isolated rat and mouse skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 293: C650-C660; 2007.
- ¹⁴⁰ Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685; 1970.
- ¹⁴¹ Gunther, MR; Tschirret-Guth, RA; Lardinois, OM; Ortiz de Montellano, PR. Tryptophan-14 is the preferred site of DNBBS spin trapping in the self-peroxidation reaction of sperm whale metmyoglobin with a single equivalent of hydrogen peroxide. *Chem. Res. Toxicol.* 16: 652-60; 2003.
- ¹⁴² Cadenas, E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 79-110; 1989.

-
- ¹⁴³ Kaganskii, MM; Dvoryantseva, GG; Sokolova, IV; Danilova, VI. Electronic spectra of quinoxaline 1-N-oxides. *Chem. Heterocyclic Comp.* 11: 102-107; 1975.
- ¹⁴⁴ Wang, Z; Qin, H. Reaction of 1,3-dicarbonyl compounds with o-phenylenediamine or 3,3'-diaminobenzidine in water or under solvent-free conditions via microwave irradiation. *J. Heterocyclic Chem.* 42: 1001-5; 2005.
- ¹⁴⁵ Catalani, LH; Wilson, T; Bechara, EJH. Two water soluble fluorescence probes for chemiexcitation studies: sodium 9,10-dibromo- and 9,10-diphenylanthracene-2-sulfonate. Synthesis, properties and application to triplet acetone and tetramethyldioxetane. *Photochem. Photobiol.* 45: 273-81; 1987.
- ¹⁴⁶ Kajiyoshi, M; Anan, FK. Conformation of biological macromolecules. Circular dichroism and magnetic circular dichroism studies of metmyoglobin and its derivatives. *J. Biochem.* 78: 1087-95; 1975.
- ¹⁴⁷ Soares, CL; Bechara, EJH. Enzymatic generation of triplet biacetyl. *Photochem. Photobiol.* 36: 117-9; 1982.
- ¹⁴⁸ Vivino, G; Antonellu, M; Moro, ML; Cottini, F; Conti, G; Bufi, M; Cannata, F; Gasparetto, A. Risk factors for acute renal failure in trauma patients. *Intensive Care Med.* 24: 808-14; 1998.

-
- ¹⁴⁹ Leblanc, M; Kellum, JA; Gibney, RT; Lieberthal, W; Tumlin, J; Mehta, R. Risk factors for acute renal failure: inherent and modifiable risks. *Curr. Opin. Crit. Care.* 11: 533-6; 2005.
- ¹⁵⁰ Yaffe, D; Saxel, O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* 270: 725-7; 1977.
- ¹⁵¹ Bouskila, M; Hirshman, MF; Jensen, J; Goodyear, LJ; Sakamoto, K. Insulin promotes glycogen synthesis in the absence of GSK3 phosphorylation in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 294: E28-35; 2008.
- ¹⁵² Edwards, JN; Macdonald, WA; Van der Poel, C; Stephenson, DG. $O_2^{\cdot -}$ production at 37°C plays a critical role in depressing titanic force of isolated rat and mouse skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 293: C650-60; 2007.
- ¹⁵³ O'Brien, P; Bechara, EJ; O'Brien, CR; Durán, N; Cilento, G. Generation of bio-electronic energy by electron transfer: reduction of peroxidase compound I and compound II by eosine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81: 75-81; 1978.
- ¹⁵⁴ Goldman, DW; Breyer, RJ 3rd; Yeh, D; Brockner-Ryan, BA; Alayash, AI. Acellular hemoglobin-mediated oxidative stress toward endothelium: a role for ferryl iron. *Am. J. Physiol.* 275: H1046-53; 1998.

¹⁵⁵ Thornalley, PJ. Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems – role in ageing and disease. *Drug. Metabol. Interact.* 23: 125-50; 2008.

¹⁵⁶ Kanatous, SB; Mammen, PP; Rosenberg, PB; Martin, CM; White, MD; DiMaio, JM; Huang, G; Muallem, S; Garry, DJ. Hypoxia reprograms calcium signaling and regulates myoglobin expression. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 296: C393-C402; 2009.

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – Certificado para uso de animais em experimentação.....	192
<i>ANEXO B – Artigo: “Myoglobin-H_2O_2 catalyzes the aerobic oxidation of acetoacetate and 2-methyl acetoacetate to α-dicarbonyls: chemical mechanism and implications in ketosis”.....</i>	<i>193</i>
ANEXO C – Súmula curricular.....	235

ANEXO A – Certificado para uso de animais em experimentação

Universidade de São Paulo
Instituto de Química

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto “Estresse Redox e Carbonílico de α -Aminoacetonas e β -Cetoácidos endógenos: Mecanismos e Bioindicadores (FAPESP Temático: 06/56530-4)”, desenvolvido sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Etelvino José Henriques Bechara** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Cuidados e Uso Animal (CECUA) do IQ-USP em 31/07/08.

We attest that the project entitled “Estresse Redox e Carbonílico de α -Aminoacetonas e β -Cetoácidos endógenos: Mecanismos e Bioindicadores (FAPESP Temático: 06/56530-4)” developed under the responsibility of **Prof. Dr. Etelvino José Henriques Bechara** in agreement with the Ethical Principals in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and has been approved by the Internal Animal Care and Use Committee of the Institute of Chemistry, University of São Paulo, on 07/31/08.

São Paulo, 31/07/08.

Prof. Dra. Alicia Juliana Kowaltowski
Coordenadora CECUA

ANEXO B – Artigo: *Myoglobin-H₂O₂ catalyzes the aerobic oxidation of acetoacetate and 2-methyl acetoacetate to α -dicarbonyls: chemical mechanism and implications in ketosis*

Submetido a Revista *Free Radical Biology & Medicine*

3/1/2011

Correio :: Caixa de Entrada: Fwd: Free Rad...

From: **FRBM** <frbm@elsevier.com>

Date: Tue, Mar 1, 2011 at 4:38 PM

Subject: Free Radical Biology & Medicine Submission: Ms. Nbr. Assigned: FRBM-D-11-00201

To: ebechara@ig.usp.br

Manuscript No.: FRBM-D-11-00201

Title: Myoglobin-H₂O₂ catalyzes the oxidation of <beta>-ketoacids to <alpha>-dicarbonyls: mechanism and implications in ketosis

Corresponding Author: Dr. Etelvino J.H. Bechara

All Authors: Etelvino J.H. Bechara; Douglas Ganini, BSc Biology; Marcelo Christoff, PhD; Marilyn Ehrenshaft, PhD; Maria B Kadiiska, PhD; Ronald P Mason, PhD

Dear Dr. Bechara,

Your submission, referenced above, has been assigned the following manuscript number:
FRBM-D-11-00201

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author:

<http://ees.elsevier.com/frbm/>

Your username is: EBECHARA

If you need to retrieve password details, please go to:

http://ees.elsevier.com/frbm/automail_query.asp

On behalf of the Editors, we thank you for submitting your work to Free Radical Biology & Medicine.

Sincerely,

Editorial Office

Free Radical Biology & Medicine

For further assistance, please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>

Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

**Myoglobin-H₂O₂ catalyzes the oxidation of β -ketoacids to α -dicarbonyls:
mechanism and implications in ketosis**

Douglas Ganini^a, Marcelo Christoff^a, Marilyn Ehrenshaft^b, Maria B Kadiiska^b, Ronald P
Mason^b, Etelvino JH Bechara^{a,c,*}

^a Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

^b Free Radical Metabolism Group, Laboratory of Toxicology and Pharmacology, National Institute of Environmental Health Sciences, NIH, Research Triangle Park, NC 27709, USA.

^c Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, SP, Brazil.

* Corresponding author: Etelvino JH Bechara, Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Rua Prof. Artur Riedel, 275, 09972-270 Diadema, SP, Brazil. Tel. 55-11-33193300; Fax: 55-11-4043-6428; ejhbechara@gmail.com.

Abstract

Acetoacetate (AA) and 2-methylacetoacetate (MAA) are accumulated in metabolic disorders such as diabetes and isoleucinemia. Here we examine the mechanism of AA and MAA aerobic oxidation initiated by myoglobin (Mb)/H₂O₂. We propose a chemiluminescent route involving a dioxetanone intermediate whose thermolysis yields triplet α -dicarbonyl species (methylglyoxal and diacetyl). The observed ultraweak chemiluminescence increased linearly upon raising the concentration of either Mb (10-500 μ M) or AA (10-100 mM). Oxygen uptake studies revealed that MAA is almost a hundred-fold more reactive than AA. EPR spin-trapping studies with MNP/MAA revealed the intermediacy of an α -carbon-centered radical and acetyl radical. The latter radical, probably derived from triplet diacetyl, is totally suppressed by sorbate, a well-known quencher of triplet carbonyls. Furthermore, an EPR signal assignable to MNP-AA^{*} adduct was observed and confirmed by isotope effects. Oxygen consumption and α -dicarbonyl yield showed to be dependent on AA or MAA concentrations (1-50 mM) and on H₂O₂ or *tert*-butOOH added to the Mb-containing reaction mixtures. That ferrylMb is involved in a peroxidase cycle acting on the substrates is suggested by the reaction pH profiles and *immuno*-spin trapping experiments. The generation of radicals and triplet dicarbonyl products by Mb/H₂O₂/ β -ketoacids may contribute to the adverse health effects of ketogenic unbalance.

Key words: myoglobin, acetoacetate, 2-methylacetoacetate, free radicals, triplet carbonyls, methylglyoxal, diacetyl, ketosis.

Introduction

Acetoacetate (AA) is a carbohydrate, protein, and lipid catabolite that is normally found in human plasma at concentrations below 0.5 mM, but can reach 6-10 mM during ketosis, a characteristic of diabetes *mellitus* types 1 and 2 [1], strenuous physical exercise [2], and the Atkins diet [3]. Another β -ketoacid, 2-methylacetoacetate (MAA), accumulates in isoleucinemic patients, whose 2-methylacetoacetyl-CoA thiolase is defective [4], leading to massive urinary excretion of MAA, triglylglycine and 2-methyl-3-hydroxybutyrate [5]. Isoleucinemic patients are characterized by recurrent ketoacidosis, lethargy, vomiting, and usually manifest mental retardation, convulsions and coma [6].

AA is reportedly toxic to cells in culture due to generation of free radicals and activation of pro-oxidant signaling pathways. For example, exposure of monocyte cultures to AA (2-3 mM) results in higher secretion of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and depletion of reduced glutathione (GSH) [7,8], and in higher interleukin-6 secretion when in the presence of phorbol 12-myristate 13-acetate [9]. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) increases in AA (0.5-20 mM)-treated primary rat hepatocyte cultures [10], and endothelial cells exposed to AA (5-20 mM) display higher levels of malondialdehyde and undergo growth inhibition [11]. Paradoxically, AA was also shown to exhibit antioxidant properties, for example, in neurons stressed by glutamate or hypoxia [12]. In addition, AA increases the contractile performance of stunned myocardium by acting as a β -adrenergic inotropic substance due to its utilization as carbon fuel [13] and NAD(P)⁺-linked substrate [14].

It has long been known that myoglobin catalyzes the chemiluminescent oxidation of AA to formate and triplet methylglyoxal, probably via a dioxetane intermediate [15]. Myeloperoxidase [16] and, more recently, peroxynitrite [17] were also shown to trigger the oxidation of β -ketoacids, in the latter case demonstrated to yield methylglyoxal and diacetyl from AA and MAA as substrates, respectively (Scheme 1). Noteworthy in this regard is that clinical studies with diabetic patients show a high correlation between plasma levels of AA and methylglyoxal, but not glucose [18].

Reactive carbonyl species such as methylglyoxal, an α -oxoaldehyde, can aggregate proteins and generate protein and DNA adducts [19], reportedly leading to activation of pro-oxidant signaling cascades [20], cellular malfunction and aging [21,22]. Various pathological states, such as diabetes type I and II, cardiovascular diseases, inflammation and chronic renal failure are shown to be related to accumulation of methylglyoxal and carbonyl protein adducts, collectively named “advanced glycated end products” (AGEs) [23]. The progression of diabetic micro- and macrovascular manifestations such as retinopathy and chronic kidney failure are shown in different animal models and humans to be correlated to indexes of AGEs such as carboxyethyl- ϵ -amine-lysine (CML), pentosidine, glyoxal-derived lysine dimer, and methylglyoxal-derived lysine dimer [24,25,26,27]. Recently, a receptor for AGEs, RAGE, was characterized and described to be directly associated with the initiation of microvascular diseases [28]. Soluble AGEs, such as the well-characterized CML, induce receptor expression and lead to the activation of signaling cascades through MAPK and NF κ B [29].

Here, we aim to clarify the mechanism of the Mb/peroxide-catalyzed oxidation of AA and MAA through free radicals to methylglyoxal and diacetyl, respectively, in normally aerated buffer (Scheme 2). This may shed light on the molecular bases of the clinical complications of ketoacidosis and rhabdomyolysis. Acting as a peroxidase in the presence of H₂O₂, the very unstable Compound I form of Mb is stabilized by electron transfer from the heme moiety to the Tyr103 residue, giving rise to Mb Compound II [30,31,32]. One or more of these species is expected to oxidize AA or MAA yielding a resonance stabilized enoyl radical (AA $\cdot$ or MAA $\cdot$) (Scheme 2). Reaction of these radicals with dioxygen would form the corresponding alkylperoxyl radicals that can propagate the chain reaction to the α -hydroperoxides AAOOH or MAAOOH. The hydroperoxides might then undergo cyclization to dioxetane intermediates followed by their thermolysis to methylglyoxal or diacetyl products in the triplet state. Both ground state [19,20] and excited state [33] α -dicarbonyl products are very reactive towards proteins, DNA and a wide spectrum of biomolecules. Myoglobin is therefore expected to be damaged by the AA and MAA radical intermediates and dicarbonyl products. In this regard, we emphasize here that the reaction of Mb with lipid peroxides in

kidneys of rats intramuscularly injected with glycerol seems to contribute to the acute kidney failure caused by rhabdomyolysis [34].

Material and Methods

Reagents

Ethyl acetoacetate and ethyl 3-methylacetoacetate were from Aldrich Co. (Saint Louis, MO, USA). Glyoxal (40%), methylglyoxal, diacetyl, quinoxalinol, 2-methylquinoxaline, 2,3-dimethylquinoxaline, xlenol orange, horse myoglobin (Mb), sorbic acid, sodium pyruvate, glucose oxidase (from *Aspergillus niger*), *o*-phenylenediamine (OPD), butanone, methyl nitrosopropane (MNP), catalase (CAT), Cu,Zn-superoxide dismutase (SOD) (from bovine erythrocytes) and 70% *tert*-butyl hydroperoxide were from Sigma Co. (St. Louis, MO, USA). Hydrogen peroxide (30%), methanol, acetonitrile, phosphoric acid (85%), acetic acid, HPLC grade solvents, and salts used for buffer preparation of the highest purity available were from Merck Co. (Darmstadt, Germany). DMPO was from Dojindo Co. (Kumamoto, Japan). All solutions were prepared with water from MilliQ® or PicoPure® systems. Phosphate buffers were treated with Chelex® before use. Ethyl acetoacetate and ethyl 3-methylacetoacetate were distilled, aliquoted, and kept at -20°C until use. H₂O₂ solutions ($\epsilon_{240\text{nm}} = 0.0436 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [35]) were prepared in water.

Sodium AA and sodium MAA were prepared daily by saponification of ethyl acetoacetate or ethyl 3-methylacetoacetate 1.0 mol.L⁻¹ in water with 20% excess of NaOH for 1 h at 25°C [36]. The solutions were neutralized with HCl 2.0 mol.L⁻¹ and diluted to 0.25 mol.L⁻¹ before use.

Myoglobin preparation

Ferri- and ferromyoglobin were prepared by the addition of potassium ferricyanide or sodium dithionite 10% (w/w), respectively, to the protein solution (50 mg.mL⁻¹) in phosphate buffer 20 mM, pH 7.0 equilibrated with N₂ [37]. After 10 min the protein was desalted in a

diethylammonium ethyl-cellulose column equilibrated with phosphate buffer 20 mM, pH 7.0. The pooled protein fraction was chromatographed in a Sephadex G25 column, eluted with phosphate buffer 20 mM, pH 7.4. The ferri- and ferromyoglobin concentration were determined ($\epsilon_{630} = 2.1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ and $\epsilon_{580} = 14.4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, respectively [30]), and aliquots were stored at -20°C until use. Ferrylmyoglobin was determined in reaction mixtures as described by Cadenas and Giulivi [30] using a spectrophotometer Varian™, 50 BIO UV-VIS. Unless otherwise stated, all experiments were performed with ferrimyoglobin, abbreviated here as Mb. The reactions were carried on under constant stirring in closed vials.

Light emission measurements

Ultra-weak chemiluminescence was detected in a photocounter Hamamatsu, model TVC 767, coupled to a photomultiplier Thorn EMI, model 9658AM, kept at -8°C by a thermoelectric refrigerator EMI, model FACT50.

Myoglobin immuno-spin trapping experiments

Samples were prepared in 100 mM phosphate buffer, pH 7.4, containing 10 μM Mb, 50 mM DMPO, with (i) 1.0-50 mM AA or MAA and 100 μM H_2O_2 , or (ii) 10 mM AA or MAA and 1.0 μM -1.0 mM H_2O_2 . The reaction was stopped after 2 h by the addition of 250 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ CAT. After 5 min at 25°C , the samples were diluted to (i) ice-cold buffer for denaturing gel electrophoresis (1.25 μg of protein per lane) or (ii) binding buffer for ELISA (2.25 μg of protein per well in 200 mM carbonate buffer, pH 9.4).

Denaturing gel electrophoresis was run with supplies from a NuPAGE® system (Invitrogen Co., USA) according to the manufacturer's instructions.

Western blotting and ELISA were conducted using standard procedures. Rabbit primary antibody anti-DMPO nitron adduct, polyclonal, was used at 1:5,000 for Western blot (2 h at 25°C) and ELISA (1 h at 37°C). Anti-rabbit secondary antibody, alkaline phosphatase conjugated (Santa Cruz®), was used at 1:500 for ELISA (1 h at 37°C), and anti-rabbit, IRDye® 800CW conjugated (Li-Cor®) was used at 1:10,000 for Western blot (1 h at 25°C).

CDP-Star® (Tropix™) was used as an alkaline phosphatase chemiluminescent substrate for the ELISA development, and the membranes were scanned using the 800 nm laser of a Li-Cor® infrared scanner Odyssey® for the Western blot detection.

Oxygen consumption

Oxygen uptake was monitored using a Clark type electrode system from Hansatech™ (Oxygraph® system). The O₂ concentrations were assumed to be 240 µM and 210 µM under normal atmosphere pressure at 25°C and 37°C, respectively [38].

EPR spin trapping studies

EPR spectra were obtained in a Bruker EMX spectrometer with a High Q cavity at 25°C. Spectra were recorded 3 min after the addition of H₂O₂. Spectra were acquired using the software WinEPR. Instrumental conditions were as follows: microwave power 20 mW, time constant 83 ms, sweep time 1 G.s⁻¹, modulation of amplitude 0.5 G and gain 2.0 x 10⁴. The spin trapping agent MNP was prepared in an amber vial using acetonitrile as solvent [39]. The solution was prepared 3 h before use. Samples deprived of β-ketoacids did not display any MNP adduct signal, possibly originated by oxidation of the solvent by Mb and H₂O₂. Spectral simulations were made using the free software WinSim, version 0.96.

Determination of α-dicarbonyls

α-Dicarbonyl products from AA or MAA/Mb/H₂O₂ were derivatized with *o*-phenylenediamine (OPD) and the resulting quinoxalines analyzed by HPLC as follows [40,41]. Before addition of OPD (0.038%, w/v, prepared in water), the pH of samples obtained from the reaction mixture in phosphate buffer 0.10 M, pH 7.4 was adjusted with acetic acid (62 mM) to about 5.0. The samples were incubated with OPD for 1 h under continuous agitation at 60°C, and filtered through 0.45 µm PVDF-syringe filters (Millipore™) to be injected into the HPLC. Twenty µL of OPD-treated solutions were injected into a model 515 Waters™ apparatus equipped with two pumps, an automatic injector model 717 Plus

and a photodiode array detector (model 996), with a C18 precolumn (0.5 cm x 4.6 mm) and column (25 cm x 4.6 mm), particle size of 50 μm (Supelco™).

Isocratic separation was employed using as a mobile phase 20 mM acetate buffer, pH 4.2, added to acetonitrile 6:4 (V/V). Better resolution was achieved in the gradient mode using 30 to 90% methanol in 20 mM acetate buffer, pH 4.2, over 30 min, followed by the initial conditions for 5 min.

Quinoxaline HPLC peaks were characterized by the retention times and the absorption spectra of quinoxalines reported elsewhere [42]. Peaks were quantified using a standard curve ($R^2 > 0.995$) obtained with samples prepared of 5.0 μM -5 mM methylglyoxal or diacetyl treated with OPD by the same procedure used for the reaction mixtures. Chromatograms extracted from the data acquired by the photodiode array detector at 314 nm were used for peak integration and quantification.

Acetoacetate determination

Acetoacetate was determined according to Walker [43], modified as follows. The diazonium salt of *p*-nitroaniline (0.04%, w/v) in 70 mM acetate buffer, pH 5.5 reacts with AA yielding an orange adduct that was measured at 450 nm for 5 min. The curved slope was used to calculate the concentration of AA in the reaction sample. The high assay sensitivity allowed calculating AA consumption as the difference between AA concentration in aliquots prior to and after H_2O_2 addition to the reaction mixtures.

MAA, glyoxal, diacetyl, methylglyoxal, sodium pyruvate, and sodium oxalate (5 mM each) did not result in any absorbance increase at 450 nm.

H₂O₂ determination

Hydrogen peroxide was determined every 2 min by the ferrous oxidation of xylenol orange (FOX1) method [44]. Notably, iron ions liberated by Mb in the presence of hydroperoxides could result in overestimation of the FOX assay [45]; however, addition of CAT (10 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) 5 min prior to the H_2O_2 assay completely abolishes the FOX signal.

Results

Spectrophotometric and immuno-spin trapping studies

To demonstrate that MAA and AA behave as substrates for ferrylMb acting as a peroxidase, heme hyperoxidation and Tyr 103 primary protein radical formation were monitored by a spectrophotometric assay of ferrylMb and an immuno-spin trapping experiment (Fig. 1). Both β -ketoacids – AA (2.0-50 mM), used in ferrylMb evaluation, and AA or MAA (0.50-50 mM), used in the immuno-spin trapping experiments – were shown to be electron donors in phosphate buffer, pH 7.4, to Mb intermediates generated upon addition of H_2O_2 . Myoglobin and H_2O_2 were tested at ratios of 1:1 for measuring ferrylMb content and 1:10 in the immuno-spin trapping experiments. The immuno-spin trapping studies showed that MAA is roughly 5-fold more effective than AA in inhibiting the antibody binding, revealing a higher reactivity for MAA. This difference is predicted by the lower oxidation potential of the enol forms of α -alkylated β -diketones and β -ketoesters as compared to their dealkylated homologues [46].

Reaction kinetics as a function of AA concentration

Acetoacetate oxidation by Mb/ H_2O_2 was accompanied by H_2O_2 , O_2 and AA consumption (Fig. 2). Uptakes of O_2 and H_2O_2 were roughly correlated and exhibited a biphasical increase as a function of AA concentration. The exponential consumption of both O_2 and H_2O_2 occurred at low AA concentrations, but was followed by a slower near linear consumption above 10 mM.

EPR spin trapping studies

In EPR spin trapping with MNP, the Mb/ H_2O_2 /AA reaction mixtures displayed a 6-line spectrum with coupling constants $a^N = 1.46$ mT and $a_\beta^H = 0.33$ mT assignable to an MNP-secondary carbon-centered radical adduct (Fig. 3A). The doubly integrated area of the signal

increased upon raising the concentration of both Mb (50-500 μM) and AA (5-50 mM) (Fig. 3B and C). The hyperfine coupling constants in the EPR spectral simulation of this MNP-radical adduct are similar to those found by Mottley and Robinson (2001) [47] for the acetylacetone oxidation by HRP/H₂O₂ ($a^N = 1.46$ mT and $a^H_\beta = 0.34$ mT) ascribed to $\cdot\text{CH}$ -, vicinal to the two carbonyl electron withdrawing groups. Superoxide anion radical, eventually generated by electron transfer from AA radical intermediates to O₂, is not involved in the chain reaction, as indicated by the absence of an SOD (4,000 U.mL⁻¹) effect (data not shown). Indeed, considerable evidence reveals that monoenoyl radicals like AA $\cdot$ tend to insert molecular oxygen to form an alkylperoxyl radical intermediate (AAOO $\cdot$) and ultimately a dioxetane by cyclization, whereas dienoyl radicals and semiquinones are prone to electron transfer to O₂ yielding O₂ $\cdot^-$ radical and an α -dicarbonyl product or a quinone, respectively [48].

Using ¹³C-enriched AA, along with spectral simulations, it was possible to unequivocally identify the 6-line MNP adduct signal as derived from the AA radical centered on C2 (Fig. 4).

When MAA was investigated as the substrate for the Mb/H₂O₂ system, two triplet MNP radical adducts were detected by EPR. The signal with $a^N = 0.83$ mT can be ascribed to the MNP adduct with acetyl radical, and the other ($a^N = 1.54$ mT) to one derived from a tertiary carbon-centered radical (Fig. 5). With regard to the detection of an acetyl radical MNP adduct in the reaction mixture, it is worth mentioning similar previous work carried out with 3-methylacetoacetone/HRP [46] and ethyl 2-methylacetoacetate/peroxynitrite [17]. Therein, the intermediacy of a putative MNP adduct with an acetyl radical derived from α -cleavage of triplet diacetyl formed by the thermolysis of a hypothetical dioxetane intermediate was demonstrated as well.

Product analysis associated with ferrylmyoglobin intermediacy

Two experimental protocols were used to demonstrate and quantify the generation of methylglyoxal and diacetyl by AA and MAA oxidation, respectively, mediated by the

peroxidase activity of Mb. First, H_2O_2 was produced continuously by glucose (5 mM)/glucose oxidase (GOX) ($1\text{--}500\text{ mU}\cdot\text{mL}^{-1}$) added to the buffer. Diacetyl and methylglyoxal were found in the spent reaction mixtures of MAA and AA, respectively, in a dose-dependent fashion. At lower GOX concentrations ($1\text{--}10\text{ mU}\cdot\text{mL}^{-1}$), the yield of α -dicarbonyl products increases linearly upon raising the β -ketoacid concentration (Fig. 6). Furthermore, at identical experimental conditions, the yield of diacetyl product was about 9-fold that of methylglyoxal, thereby confirming the higher reactivity of MAA due to the electronic effect of the α -methyl substituent. Accordingly, the rate of oxygen uptake by the MAA/Mb system was about 9 times faster than with AA when H_2O_2 generated by glucose/GOX was replaced by a bolus addition of *tert*-butOOH (not shown). Because methylglyoxal can strongly bind to proteins, its concentration in the Mb-containing reaction mixture is probably underestimated.

A second protocol for determining products consisted of the addition of H_2O_2 at various concentrations to the Mb/ β -ketoacid-containing buffer (Fig. 7). Maximal amounts of the α -dicarbonyl product were found with 1:25 Mb: H_2O_2 . Under these conditions, the diacetyl yield from MAA oxidation was almost 60 times higher than that of methylglyoxal obtained from AA. Interestingly, lower yields of α -dicarbonyl products were found when the highest concentrations of H_2O_2 were used (1:50 and 1:100). In agreement, the amplitude of the MNP spin trapping signal of AA was suppressed in a dose-dependent manner when catalase ($0.16\text{--}400\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) was added (data not shown). Taken together, these results indicate that the substrates undergo oxidation mediated by the redox cycling of holoMb, and not from iron or heme released by the protein.

To confirm participation of ferrylMb as the primary MAA oxidant, the pH profiles (pH 5.8 – 8.0) of oxygen consumption (Fig. 8A) and diacetyl production (Fig. 8B) were traced using MAA and Mb/ H_2O_2 1:1. Ferrylmyoglobin is known to be more reactive at lower pH [34,49]. Both parameters were shown to decrease exponentially upon raising the pH and to be strongly correlated. These findings support the involvement of ferrylMb in electron abstraction from MAA yielding the $\text{MAA}^\bullet$ radical, thereby initiating the $\text{MAA}\text{OO}^\bullet$ -propagated oxidation of the substrate by dissolved molecular oxygen and ultimately producing diacetyl.

In order to further demonstrate a direct connection between ferrylMb and one-electron oxidation of AA and MAA, the double integrated EPR peak areas for AA[•], MAA[•] and acetyl adducts with MNP were studied as a function of the ratio Mb: H₂O₂ (Fig. 9). The highest radical concentrations were found for a ratio of Mb: H₂O₂ 1:25. Higher peroxide concentrations led to a decrease in the signal area for the radical adducts, probably due to Mb oxidative degradation. Altogether, the areas of the radical adducts, pH profile data and α -dicarbonyl yields are consistent with a catalytic peroxidase activity of Mb.

Chemiluminescence studies

To investigate whether the oxidation of β -ketoacids indeed proceeds via a dioxetane intermediate, whose thermal cleavage yields electronically excited triplet products [33], the AA or MAA/Mb/H₂O₂-containing reaction mixtures were examined in a highly sensitive photcounter for ultra-weak chemiluminescence emission (Fig. 10). Alkyl-substituted dioxetanes and dioxetanones like the hypothetical AA and MAA-derived peroxide intermediates have long been known to cleave into two carbonyl products, one of them predominantly in the triplet, phosphorescent state [50,51,58,33]. Triplet carbonyls are efficiently quenched by dissolved (triplet) molecular oxygen and thermally deactivated by solvent molecules, hence the detection of ultra-weak direct chemiluminescence.

Although very weak, the intensity of light emission detected in the photcounter from the AA/Mb/H₂O₂ system was strongly correlated to the concentration of AA or Mb added in the reaction mixture (Fig. 10A-C). Because (i) methylglyoxal is the product expected from the homolysis of the hypothetical 1,2-dioxetanone derived from AA cleavage and (ii) the reaction is chemiluminescent, it is conceivable that the reaction emitter is indeed triplet methylglyoxal. If this actually happens, then triplet methylglyoxal should undergo α -cleavage (Norrish Type I reaction) yielding acetyl radical, as mentioned above in the EPR spin-trapping studies. Suppression of the MNP-acetyl radical adduct signal upon addition of sorbate, a diffusional triplet carbonyl quencher [52], was accordingly observed when using MAA as a substrate for Mb/H₂O₂ (Fig. 10D). (Fig. 10D). The EPR signal attributed to the MNP-acetyl radical adduct

was affected, whereas that derived from the MAA[•] intermediate was not. Furthermore, addition of sorbate did not interfere with ferrylMb generation or the ferrylMb reaction with MAA (data not shown).

Discussion

Acetoacetate and MAA are two β -ketoacid catabolites long known to be elevated at millimolar concentrations in the plasma of individuals exhibiting ketoacidoses resulting from such conditions as diabetes, fasting, and protein and fat rich diets. They are shown here to undergo chemiluminescent myoglobin/H₂O₂-catalyzed oxidation in normally aerated phosphate buffer, pH 7.4, yielding methylglyoxal and diacetyl respectively as final products. Evidence is provided here in favor of a reaction mechanism (Scheme 2) by the following consecutive steps: (i) hydrogen abstraction from the enolate form of AA or MAA by ferrylMb yielding a resonance-stabilized enoyl radical at the substrate C2; (ii) oxygen insertion in the substrate radical intermediate to form the respective α -peroxyl AAOO[•] and MAAOO[•] radicals; (iii) reaction propagation by the alkylperoxyl radicals yielding AA or MAA α -hydroperoxides until dissolved oxygen depletion; (iv) α -hydroperoxide cyclization to the corresponding dioxetanones, whose thermal cleavage produces methylglyoxal or diacetyl, respectively, in the electronically excited triplet state; and (v) triplet carbonyl decay by light emission, deactivation by solvent, and quenching by oxygen to their ground state or Norrish cleavage to acetyl radicals are competing processes that destroy the excited product.

β -Dicarbonyl compounds and β -ketoacids and esters have long been known to exist in aqueous medium in a phosphate-catalyzed dynamic equilibrium with their enolic forms, stabilized by an intramolecular hydrogen bond (Scheme 1). Consequently, the enolization constants of β -dicarbonyls (*e.g.*, ethyl acetoacetate, $K_e = 0.053$; acetoacetone, $K_e = 0.34$) [53] are much higher than those of monoketones (*e.g.*, acetone, $K_e = 6.0 \times 10^{-9}$) [54], or monoaldehydes (*e.g.*, isobutanal, $K_e = 1.7 \times 10^{-4}$) [55]. In addition, α -alkylation of enols and phenols renders them more prone to electron donation. Thus, the oxidation potential of pentan-2-one, pentan-2,4-dione (acetoacetone), and 3-methylpentan-2,4-dione (3-

methylacetoacetone) decreases in this same order [56]. Therefore, the ease of both enolization and one-electron oxidation is expected to contribute to the reactivity of carbonyl compounds with oxygen initiated by peroxidase-acting hemeproteins in the presence of peroxides. Accordingly, isobutanal [57] and 3-methylacetoacetone [58] were unequivocally shown to yield acetone and diacetyl, respectively, in the triplet state, when treated in aerated phosphate buffer with HRP (horseradish peroxidase) in the presence of traces of peroxides. Formation of these products was supported by the complete matching of the chemiluminescence spectrum of the isobutanal or 3-methylacetoacetone reaction with the phosphorescence spectra of acetone and diacetyl, respectively. Triplet carbonyls are potentially biological toxicants due to their chemical reactivity, similar to that of alkoxy radicals [33]: hydrogen abstraction from polyunsaturated fatty acids, isomerization, cleavage to radicals, and addition to double bonds, for example. In addition, triplet carbonyls can transfer electronic energy to ground state oxygen yielding the very highly electrophilic excited $O_2 (^1\Delta_g)$ [59].

Here, methylglyoxal-generating and oxygen consuming AA was also shown to be chemiluminescent in the presence of Mb/H₂O₂ (Figs. 2, 7 and 10), which may attest to the intermediacy of a dioxetane-type intermediate. That ferrylMb acts as an electron acceptor from AA and MAA is demonstrated by DMPO immuno-spin trapping (Fig. 1B) and the importance of the ratio of Mb:H₂O₂ in product yields and radical intermediate production (Figs. 8 and 9). The intermediacy of resulting AA-secondary carbon radical (Figs. 3, 4 and Table 1) and the MAA-tertiary radical (Fig. 5) centered at carbon 2 was obtained by EPR spin trapping with MNP, combined with isotopic labeling in the case of AA (Fig. 4). The EPR spin trapping studies revealed the presence of the distinctive acetyl radical MNP adduct (Figs. 5 and 9) in the reaction mixture containing MAA, probably formed by Norrish cleavage of triplet diacetyl formed from the dioxetanone intermediate of the substrate oxidation. Accordingly, the signal of the MNP-acetyl radical adduct was quenched upon addition of sorbic acid (Fig. 10), a well-known conjugated diene that acts as a collisional quencher of triplet ketones [52].

Product analysis and kinetics data showed that MAA is about one order of magnitude more reactive than AA for oxidation by the Mb/H₂O₂ system (Figs. 6 and 7), as predicted by the effect of α -methylation that makes MAA easier to be oxidized [17,46,56]. Replacement of H₂O₂ by *tert*-butOOH to produce ferrylMb corroborated these data (not shown).

The role of ferrylMb as initiator of the oxygen-consuming reaction of AA and MAA was shown here by the spectrophotometric detection of heme hyperoxidation and by an immunospin trapping experiment which detects the primary Mb Tyr 103 radical (Fig. 1). Accordingly, the pH profiles of oxygen consumption and diacetyl production by the Mb/H₂O₂-catalyzed oxidation of MAA revealed that the reaction rates are higher at lower pH, as expected for ferrylMb acting as the primary one-electron oxidant of the β -ketoacid (Fig. 8). When higher amounts of H₂O₂ were added (Mb:H₂O₂ > 1:25) (Figs. 7 and 9), the yield of products and of substrate radicals decreased significantly, which was attributed to the observed bleaching and destruction of the heme protein (data not shown).

Biological implications

The findings of the present work alert us to the potential adverse effects of peroxidase-acting Mb in ketogenesis. For example, ketogenesis is largely accepted as a risk factor for rhabdomyolysis due to osmotic imbalance [60,61,62], but there may also be a contribution from free radicals, reactive α -dicarbonyl products, and excited states generated by Mb-catalyzed peroxidation of β -ketoacids such as AA and MAA. Carbon-centered radicals and triplet methylglyoxal produced by Mb/peroxide acting as a peroxidase on AA have the potential to modify a large spectrum of biomolecules. Furthermore, methylglyoxal is an α -oxoaldehyde that is extremely reactive with amino groups of proteins by virtue of the electron-withdrawing effect from a neighboring carbonyl group, leading to advanced glycated end products (AGEs), such as ϵ -carboxyethyl lysine (CEL) and methylglyoxal-derived lysine dimer (MOLD) [63]. These carbonyl adducts accumulate and are proposed as biomarkers in age related diseases such as diabetes [64], uremia [65], Alzheimer's [66], atherosclerosis [67] and aging [68]. It is tempting to propose that the Mb-catalyzed oxidation of AA operates

in ketoacidotic patients, and is thus responsible for the higher methylglyoxal levels detected in plasma from these patients [69].

Receptors for AGEs, named RAGEs, have been shown to be involved in the development of macro and micro-vascular diseases associated with diabetes and aging [21,28,29], where α -dicarbonyl catabolite Schiff reactions with protein amino acid residues have been implicated. In conclusion, we hypothesize here that Mb and other peroxidase-acting heme proteins induce the aerobic oxidation of β -ketocids accumulated in ketoacidosis yielding reactive radicals, α -dicarbonyls, and excited triplet species which spark adverse biological responses.

Abbreviations: AA, acetoacetate; AGEs, advanced glycated end products; CAT, catalase; DMPO, 5,5'-dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide; ELISA, enzyme-linked immuno-sorbent assay; EPR, electron paramagnetic resonance; FOX1, ferrous oxidation of xylenol orange; GSH, reduced glutathione; HPLC, high performance liquid chromatography; HRP, horseradish peroxidase; MAA, 2-methylacetoacetate; Mb, myoglobin; MNP, methylnitrosopropane; NK κ β , nuclear factor κ β ; OPD, *o*-phenylenediamine; RAGE, AGE receptor; SOD, superoxide dismutase; *tert*-ButOOH, *tert*-butyl hydroperoxide; TNF- α , tumor necrosis factor α .

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) Redoxoma, and Intramural Research Program of the National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS). We would like to acknowledge Dr Ann Motten for editing this manuscript.

Table 1. Hyperfine coupling constants (mT) of the MNP radical adducts obtained from AA and MAA oxidized by the Mb/H₂O₂ system in aerated 100 mM phosphate buffer pH 7.4, at 25°C.

	a^N	a_{β}^H	a_{α}^{13C}	a_{β}^{13C}	a_{γ}^{13C}
$ \begin{array}{c} \text{O} \quad \text{H} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \quad \parallel \\ \text{H}_3 - \text{C} - \text{C} - \text{C} - \text{O}^- \\ \gamma \quad \quad \beta \end{array} $	1.458	0.334	0.68	1.284	0.076
$ \begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{H}_3 - \text{C} - \text{C} - \text{C} - \text{O}^- \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $	1.58				
$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_3 - \text{C} \cdot \end{array} $	0.83				

Legends to Figures and Schemes

Fig. 1. Peroxidase activity of myoglobin/ H_2O_2 on AA and MAA substrates in normally aerated 100 mM phosphate buffer, pH 7.4. A. Ferrylmyoglobin ($15\ \mu\text{M}$) decay induced by MAA (2.0-50 mM). B. Abatement of DMPO-Tyr103 Mb yield promoted by AA and MAA (0.50-50 mM). Ratio Mb: H_2O_2 is 1:1 in A and 1:10 in B. Experimental conditions are described in Material and Methods. Data are representative of at least 3 independent experiments.

Fig. 2. Aerobic oxidation of AA catalyzed by Mb upon adding H_2O_2 accompanied by O_2 (-●-), H_2O_2 (-■-), and AA (-▲-) consumption. Reactions were prepared in 100 mM phosphate buffer, pH 7.4. Other experimental conditions are described in the Material and Methods. Data are representative of three independent experiments.

Fig. 3. EPR spin trapping experiments with MNP, AA and Mb in the presence of H_2O_2 . The 6-line signal of the putative MNP-AA $^{\bullet}$ adduct is detected in the presence of both Mb ($250\ \mu\text{M}$) and AA (50 mM), MNP 50 mM (A), and its doubly integrated area responds linearly to the reagent concentrations (B and C). Experimental conditions are described under Material and Methods.

Fig. 4. EPR spectra of MNP-AA $^{\bullet}$ radical adduct assigned to the AA secondary carbon-centered radical. Reaction mixture: 100 mM MNP, and 50 mM ^{13}C -enriched AA, $500\ \mu\text{M}$ Mb and 5 mM H_2O_2 in aerated 100 mM phosphate buffer pH 7.4 at 25°C . Other experimental conditions were as shown in Materials and Methods.

Fig. 5. EPR spin trapping experiments using MAA as substrate for the peroxidase-acting Mb/ H_2O_2 system. Experimental conditions: MNP (100 mM), MAA (50 mM), and Mb ($250\ \mu\text{M}$)

in the presence of H_2O_2 (1:10, 2.5 mM). Other experimental details were as shown in Material and Methods.

Fig. 6. Effect of H_2O_2 concentration produced by the glucose/GOX system on the yields of methylglyoxal and diacetyl produced by AA and MAA, respectively, upon treatment with Mb. Reaction mixture: 5.0 mM glucose, 50 mM AA or MAA, and 50 μM Mb in aerated 100 mM phosphate buffer pH 7.4 stirred for 2 hours at 25°C in closed vials.

Fig. 7. Yield of methylglyoxal (A) and diacetyl (B) treated with Mb/ H_2O_2 . Reaction mixture: AA (A, 50 mM) and MAA (B, 50 mM) with Mb (A, 50 μM and B, 250 μM) treated with H_2O_2 at various ratios of Mb: H_2O_2 , in 100 mM phosphate buffer, pH 7.4, at 37°C. Data are representative of three independent experiments.

Fig. 8. pH profile of oxygen consumption and diacetyl production by MAA treated with Mb/ H_2O_2 . Oxygen consumption (A) and diacetyl yield (B) were determined for MAA (20 mM) treated with Mb (50 μM) in the presence of H_2O_2 (500 μM) in phosphate buffer at various pH's. Panel C depicts the correlation between the extent of oxygen uptake and diacetyl production. Other experimental conditions are described under Material and Methods.

Fig. 9. EPR spin trapping studies of the effect of the Mb: H_2O_2 concentration ratio on the oxidation of AA and MAA. Spectra were traced for reaction mixtures containing 25 mM MNP and (A) AA or (B) MAA (50 mM) treated with increasing ratios of Mb (25 μM): H_2O_2 . Panels C and D: dependence of the doubly integrated areas for the peaks attributed to $\text{AA}^\bullet$ or $\text{MAA}^\bullet$ (plus MNP-acetyl radical adduct in the latter case), respectively, on the Mb: H_2O_2 ratio. See Figs 3-5 for EPR radical signal assignments.

Fig. 10. Ultra-weak chemiluminescence elicited by the AA/Mb/H₂O₂ system. A. Temporal course of light emission from Mb (500 μ M) and H₂O₂ 1:1 (500 μ M) with added AA (100 mM). B and C. Dose-dependent light intensity vs. AA and Mb concentrations, respectively. D. Quenching effect of sorbate (50 mM) on the MNP-acetyl radical adduct EPR signal observed with Mb (250 μ M) added to H₂O₂ 1:100 (25 mM) and MAA (50 mM) in the presence of MNP (50 mM). Other experimental conditions were as described in the Material and Methods.

Scheme 1. Chemical structures of acetoacetate (AA) and 2-methylacetoacetate (MAA) anions and of their oxidation products: methylglyoxal and diacetyl, respectively.

Scheme 2. Proposed reaction mechanism for the chemiluminescent oxidation of AA by Mb/H₂O₂.

Scheme 1.

Fig.1.

Fig. 2.

Fig. 3.

Fig. 4.

Fig. 5.

Fig. 6.

Fig. 7.

Fig. 8.

Fig. 9.

Fig. 10.

Scheme 2.

References

- [1] Jain, S. K.; Mc Vie, R.; Bocchini Jr, J. A. Hyperketonemia (ketosis), oxidative stress and type 1 diabetes. *Pathophysiology* **13**:163-70; 2006.

- [2] Goto, K.; Ishii, N.; Mizuno, A.; Takamatsu, K. Enhancement of fat metabolism by repeated bouts of moderate endurance exercise. *J. Appl. Physiol.* **102**:2158-64; 2007.

- [3] Adam-Perrot, A.; Clifton, P.; Brouns, F. Low-carbohydrate diets: nutritional and physiological aspects. *Obesity Rev.* **7**:49-58; 2006.

- [4] Kornman, S. H. Inborn errors of isoleucine degradation: a review. *Mol. Genet. Metab.* **89**:289-99; 2006.

- [5] Aramaki, S.; Lehotay, D.; Sweetman, L.; Nyhan, W. L.; Winter, S. C.; MmDleton, B. Urinary excretion of 2-methylacetoacetate, 2-methyl-3-hydroxybutyrate and triglylglycine after isoleucine loading in the diagnosis of 2-methylacetoacetyl-CoA thiolase deficiency. *J. Inher. Metab. Dis.* **14**:63-74; 1991.

- [6] Rosa, R. B.; Schuck, P. F.; de Assis, D. R.; Latini, A.; Dalcin, K. B.; Ribeiro, C. A.; da S. Ferreira, G.; Maria, R. C.; Leipnitz, G.; Perry, M. L.; Filho, C. S.; Wyse, A. T.; Wannmacher, C. M.; Wajner, M. Inhibition of energy metabolism by 2-methylacetoacetate and 2-methyl-3-hydroxybutyrate in cerebral cortex of developing rats. *J. Inherit. Metab. Dis.* **28**:501-15; 2005.

- [7] Jain, S. K.; Kannan, K.; Lim, G.; McVie, R.; Bocchini, J. A. Jr. Hyperketonemia increases tumor necrosis factor-alpha secretion in cultured U937 monocytes and Type 1 diabetic patients and is apparently mediated by oxidative stress and cAMP deficiency. *Diabetes* **51**:2287-93; 2002.

-
- [8] Jain, S. K.; Kannan, K.; MacVie, R. Effect of hyperketonemia on blood monocytes in type-I diabetic patients and apoptosis in cultured U937 monocytes. *Antioxid. Redox. Signal.* **1**:211-20; 1999.
- [9] Jain, S. K.; Kannan, K.; Lim, G.; Matthews-Greer, J.; McVie, R.; Bocchini, J. A. Jr. Elevated blood interleukin-6 levels in hyperketonemic type 1 diabetic patients and secretion by acetoacetate-treated cultured U937 monocytes. *Diabetes Care* **26**:2139-43; 2003.
- [10] Abdelmegeed, M. A.; Kim, S. K.; Woodcroft, K. J.; Novak, R. F. Acetoacetate activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase in primary cultured rat hepatocytes: role of oxidative stress. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **310**:728-36; 2004.
- [11] Jain, S. K.; Kannan, K.; Lim, G. Ketosis (acetoacetate) can generate oxygen radicals and cause increased lipid peroxidation and growth inhibition in human endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* **25**:1083-8; 1998.
- [12] Juge, N.; Gray, J. A.; Omote, H.; Miyaji, T.; Inoue, T.; Hara, C.; Uneyama, H.; Edwards, R. H.; Nicoll, R. A.; Moriyama, Y. Acetoacetate protects neuronal cells from oxidative glutamate toxicity. *Neuron* **68**:99-112; 2010.
- [13] Mallet, R. T.; Sun, J. Antioxidant properties of myocardial fuels. *Mol. Cell Biochem.* **253**:103-11; 2003.

-
- [14] Kushnareva, Y.; Murphy, N. A.; Andreyev, A. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *Biochem. J.* **368**:545-53; 2002.
- [15] Vidigal, C. C.; Cilento, G. Evidence for the generation of excited methylglyoxal in the myoglobin catalyzed oxidation of acetoacetate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **62**:184-90; 1975.
- [16] Harrison, J. E.; Saeed, F. A. Acetoacetate is an electron donor to myeloperoxidase and a promoter of myeloperoxidase-catalyzed fatty acid peroxidation. *Biochem. Med.* **26**:339-55; 1981.
- [17] Royer, L. O.; Knudsen, F. S.; de Oliveira, M. A.; Tavares, M. F.; Bechara, E. J. Peroxynitrite-initiated oxidation of acetoacetate and 2-methylacetoacetate esters by oxygen: potential sources of reactive intermediates in ketoacidoses. *Chem. Res. Toxicol.* **17**:1725-32; 2004.
- [18] Turk, Z.; Nemet, I.; Varga-Defteardarović, L.; Car, N. Elevated level of methylglyoxal during diabetic ketoacidosis and its recovery phase. *Diabetes Metab.* **32**:176-80; 2006.
- [19] Thornalley, P. Dicarbonyl intermediates in the Maillard reaction. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1043**:111-7; 2005.
- [20] Thornalley, P. Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems - role in ageing and disease. *Drug. Metabol. Drug. Interact.* **23**:125-15; 2008.

-
- [21] Fleming, T. H.; Humpert, P. M.; Nawroth, P. P.; Bierhaus, A. Reactive metabolites and AGE/RAGE-mediated cellular dysfunction affect the aging process - a mini-review. *Gerontology*. In press; 2010.
- [22] Desai, K. M.; Chang, T.; Wang, H.; Banigesh, A.; Dhar, A.; Liu, J.; Untereiner, A.; Wu, L. Oxidative stress and aging: is methylglyoxal the hidden enemy? *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **88**:273-84; 2010.
- [23] Ramasamy, R.; Yan, S. F.; Schmidt, A. M. Advanced glycation endproducts: from precursors to RAGE: round and round we go. *Amino Acids*. In press; 2010.
- [24] Karashalias, N.; Babaei-Jadidi, R.; Rabbani, N.; Thornalley, P. J. Increased protein damage in renal glomeruli, retina, nerve, plasma and urine and its prevention by thiamine and benfotiamine therapy in a rat model of diabetes. *Diabetologia* **53**:1506-16; 2010.
- [25] Nangaku, M.; Miyata, T.; Sada, T.; Mizuno, M.; Inagi, R.; Ueda, Y.; Ishikawa, N.; Yuzawa, H.; Koike, H.; van Ypersele de Strihou, C.; Kurokawa, K. Anti-hypertensive agents inhibit in vivo the formation of advanced glycation end products and improve renal damage in a type 2 diabetic nephropathy rat model. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**:1212-22; 2003.
- [26] Nangaku, M.; Izuhara, Y.; Usuda, N.; Inagi, R.; Shibata, T.; Sugiyama, S.; Kurokawa, K.; van Ypersele de Strihou, C.; Miyata, T. In a type 2 diabetic nephropathy rat model, the improvement of obesity by a low calorie diet reduces oxidative/carbonyl stress and prevents diabetic nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* **20**:2661-9; 2005.
- [27] Mostaf, A. A.; Randell, E. W.; Vasdev, S. C.; Gill, V. D.; Han, Y.; Gadag, V.; Raouf, A. A.; El Said, H. Plasma protein advanced glycation end products, carboxymethyl cysteine,

and carboxyethyl cysteine, are elevated and related to nephropathy in patients with diabetes. *Mol. Cell. Biochem.* **302**:35-42; 2007.

[28] Reiniger, N.; Lau, K.; McCalla, D.; Eby, B.; Cheng, B.; Lu, Y.; Qu, W.; Quadri, N.; Ananthakrishnan, R.; Furmanský, M.; Rosario, R.; Song, F.; Rai, V.; Weinberg, A.; Friedman, R.; Ramasamy, R.; D'Agati, V.; Schmidt, A. M. Deletion of the receptor for advanced glycation end products reduces glomerulosclerosis and preserves renal function in the diabetic OVE26 mouse. *Diabetes* **59**:2043-54; 2010.

[29] Liu, Y.; Liang, C.; Liu, X.; Pan, X.; Ren, Y.; Fan, M.; Li, M.; He, Z.; Wu, J.; Wu, Z. AGEs increased migration and inflammatory responses of adventitial fibroblasts via RAGE, MAPK and NF-kappaB pathways. *Atherosclerosis* **208**:34-42; 2010.

[30] Giulivi, C.; Cadenas, E. Ferrylmyoglobin: formation and chemical reactivity toward electron-donating compounds. *Methods Enzymol.* **233**:189-202; 1994.

[31] Gunther, M. R.; Sturgeon, B. E.; Mason, R. P. A long-lived tyrosyl radical from the reaction between horse metmyoglobin and hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* **28**:709-19; 2000.

[32] DeGray, J. A.; Gunther, M. R.; Tschirret-Guth, R.; Ortiz de Montellano, P. R.; Mason, R. P. Peroxidation of a specific tryptophan of metmyoglobin by hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* **272**:2359-62; 1997.

[33] Cilento, G.; Adam, W. *From free radicals to electronically excited species*. *Free Radic. Biol. Med.* **19**:103-14; 1995.

-
- [34] Moore, K. P.; Holt, S. G.; Patel, R. P.; Svistuneko, D. A.; Zackert, W.; Goodier, D.; Reeder, B. J.; Clozel, M.; Anand, R.; Cooper, C. E.; Morrow, J. D.; Wilson, M. T.; Darley-Usmar, V.; Roberts, L. J. 2nd. A causative role for redox cycling of myoglobin and its inhibition by alkalization in the pathogenesis and treatment of rhabdomyolysis-induced renal failure. *J. Biol. Chem.* **273**:31731-7; 1998.
- [35] Noble, R. W.; Gibson, Q. H. The reaction of ferrous horseradish peroxidase with hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* **245**:2409-13; 1970.
- [36] Krebs, H. A.; Eggleston, L. V. Metabolism of acetoacetate in animal tissues 1. *Biochem. J.* **39**:408-19; 1945.
- [37] Hardman, K. D.; Eylar, E. H.; Ray, D. K.; Banaszak, L. J.; Gurd, F. R. N. Isolation of sperm whale myoglobin by low temperature fractionation with ethanol and metallic ions. *J. Biol. Chem.* **241**:432-42; 1966.
- [38] Robinson, J.; Cooper, J. M. Method of determining oxygen concentration in biological media, suitable for calibrations of the oxygen electrode. *Anal. Biochem.* **33**:390-9; 1970.
- [39] Mottley, C.; Robinson, R. E.; Mason, R. P. Free radical formation in the oxidation of malondialdehyde and acetylacetone by peroxidase enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* **15**:153-60; 1991.
- [40] Bednarski, W.; Jedrychowski, L.; Hammond, E. G.; Nikolov, Z. L. A method for the determination of α -dicarbonyl compounds. *J. Dairy Sci.* **72**:2474-7; 1989.

-
- [41] Ferreira, A. C. S.; Reis, S.; Rodrigues, C.; Oliveira, C.; Pinho, P. G. Simultaneous determination of ketoacids and dicarbonyl compounds, key Maillard intermediates on the generation of aged wine aroma. *J. Food Sci.* **72**:S314-8; 2007.
- [42] Takagi, M.; Ono, S. Polarigraphic studies on quinoxalines for the determination of carbonyl groups in starches. *Bull. Univ. Osaka Pref., Ser. B* **21**:77-122; 1969.
- [43] Walker, P. G. A colorimetric method for the estimation of acetoacetate. *Biochem. J.* **58**:699-704, 1954.
- [44] Wolff, S. P. Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. *Methods Enzymol.* **233**:182-9; 1994.
- [45] Bou, R.; Codony, E.; Tres, A.; Decker, E. A.; Guardiola, F. Determination of hydroperoxides in foods and biological samples by the ferrous oxidation-xylenol orange method: a review of the factors that influence the method's performance. *Anal. Biochem.* **377**:1-15; 2008.
- [46] Knudsen, F. S.; Penatti, C. A.; Royer, L. O.; Bidart, K. A.; Christoff, M.; Ouchi, D.; Bechara, E. J. Chemiluminescent aldehyde and beta-diketone reactions promoted by peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* **13**:317-26; 2000.

[47] Mottley, C.; Robinson, R. E.; Mason, R. P. Free radical formation in the oxidation of malondialdehyde and acetylacetone by peroxidase enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* **289**:153-60; 1991.

[48] Bechara, E. J.; Dutra, F.; Cardoso, V. E.; Sartori, A.; Olympio, K. P.; Penatti, C. A.; Adhikari, A.; Assunção, N. A. The dual face of endogenous α -aminoketones: pro-oxidizing metabolic weapons. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **146**:88-110; 2007.

[49] Silaghi-Dumitrescu, R.; Reeder, B. J.; Nicholls, P.; Cooper, C. E.; Wilson, M. T. Ferryl haem protonation gates peroxidatic reactivity in globins. *Biochem. J.* **403**:391-5; 2007.

[50] Adam, W.; Sternmetzer, H. C. (1-Adamantyl)- α -peroxylactone: Synthesis, Kinetics, and Luminescence. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **11**:540-2; 1972.

[51] Kopecky, K. L.; Mumford, C. Luminescence in the thermal decomposition of 3,3,4-trimethyl-1,2-dioxetane. *Can. J. Chem.* **47**:709; 1969.

[52] Velosa, A. C.; Baader, W. J.; Stevani, C. V.; Mano, C. M.; Bechara, E. J. 1,3-diene probes for detection of triplet carbonyls in biological systems. *Chem. Res. Toxicol.* **20**:1162-9; 2007.

[53] Iglesias, E. Determination of keto–enol equilibrium constants and the kinetic study of the nitrosation reaction of β -dicarbonyl compounds. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2.* **3**:431-9; 1997.

-
- [54] Chiang, Y.; Kresge, A. J.; Tang, Y. S.; Wirz, J. The pKa, and keto-enol equilibrium constant of acetone in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* **106**:460-2; 1984.
- [55] Bohne, C.; MacDonald, D.; Dunford, B. Transient state kinetics of the reactions of isobutyraldehyde with Compounds I and II of horseradish peroxidase. *J. Biol. Chem.* **262**:3572-8; 1987.
- [56] Adkins, H.; Cox, F. W. Relative oxidation-reduction reactivities of ketones and aldehydes and applications in synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **60**:1151-9; 1938.
- [57] Indig, G.; Campa, A.; Bechara, E. J. H.; Cilento, G. Conjugate diene formation promoted by triplet acetone acting upon arachidonic acid. *Photochem. Photobiol.* **48**:719-23; 1988.
- [58] Soares, C.; Bechara, E. Enzymatic generation of triplet biacetyl. *Photochem. Photobiol.* **36**: 117-9; 1982.
- [59] Wilkinson, F.; McGarvey, D. J.; Olea, A. F. Excited triplet state interactions with molecular oxygen: influence of charge transfer on the bimolecular quenching rate constants and the yields of singlet oxygen ($^1\Delta_g$) for substituted naphthalenes in various solvents. *J. Phys. Chem.* **98**:3762-9; 1994.
- [60] Cervellin, G.; Comelli, I.; Lippi, G. Rhabdomyolysis: historical background, clinical, diagnostic and therapeutic features. *Clin. Chem. Lab. Med.* **48**:749-56; 2010.
- [61] Tanaka, M.; Miyazaki, Y.; Ishikawa, S.; Matsuyama, K. Alcoholic ketoacidosis associated with multiple complications: report of 3 cases. *Intern. Med.* **43**:955-9; 2004.

-
- [62] Casteels, K.; Beckers, D.; Wouters, C.; Van Geet, C. Rhabdomyolysis in diabetic ketoacidosis. *Pediatr. Diabetes* **4**:29-31; 2003.
- [63] Degenhardt, T. P.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. Chemical modification of proteins by methylglyoxal. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. **44**:1139-45; 1998.
- [64] Jakus, V.; Riebrock, N. Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. *Physiol. Res.* **53**:131-42; 2004.
- [65] Semba, R. D.; Fink, J. C.; Sun, K.; Bandinelli, S.; Guralnik, J. M.; Ferrucci, L. Carboxymethyl-lysine, an advanced glycation end product, and decline of renal function in older community-dwelling adults. *Eur. J. Nutr.* **48**:38-44; 2009.
- [66] Sato, T.; Shimogaito, N.; Wu, X.; Kikuchi, S.; Yamagishi, S.; Takeuchi, M. Toxic advanced glycation end products (TAGE) theory in Alzheimer's disease. *Am. J. Alzheimers Dis. Other Dement.* **21**:197-2008; 2006.
- [67] Kislinger, T.; Fu, C.; Huber, B.; Qu, W.; Taguchi, A.; Du Yan, S.; Hofmann, M.; Yan, S. F.; Pischetsrieder, M.; Stern, D.; Schmidt, A. M. N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. *J. Biol. Chem.* **274**:31740-9; 1999.
- [68] Schlotterer, A.; Kukudov, G.; Bozorgmehr, F.; Hutter, H.; Du, X.; Oikonomou, D.; Ibrahim, Y.; Pfisterer, F.; Rabbani, N.; Thornalley, P.; Sayed, A.; Fleming, T.; Humpert, P.; Schwenger, V.; Zeier, M.; Hamann, A.; Stern, D.; Brownlee, M.; Bierhaus, A.; Nawroth, P.; Morcos, M. *C. elegans* as model for the study of high glucose-mediated life span reduction. *Diabetes* **58**:2450-6; 2009.

[69] Turk, Z.; Nemet, I.; Varga-Defteardarović, L.; Car, N. Elevated level of methylglyoxal during diabetic ketoacidosis and its recovery phase. *Diabetes Metab.* **32**:176-80; 2006.

ANEXO C – Súmula curricular

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Douglas Ganini da Silva

Local e data de nascimento: São Paulo, 05 de novembro de 1985

EDUCAÇÃO

Ensino Fundamental e Médio:

EMEFM Darcy Ribeiro, Rua Daniel Bernardo, 105 – São Miguel Paulista – CEP 08010-000, até 12/2003.

Ensino técnico: Técnico em Turismo

ETEC Professor Aprígio Gonzaga, Av. Dr. Orêncio Vidigal, 212 – Penha – CEP 03540-010, de 01/2002 a 06/2003.

Graduação: Licenciatura em Ciências Biológicas

Universidade Cruzeiro do Sul, Av. Dr. Ussiel Cirilo, 225 – São Miguel Paulista – CEP 08060-070, de 01/2004 a 12/2006.

Pós-graduação: Doutorado Direto em Ciências (Bioquímica)

Universidade de São Paulo, Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, Avenida Professor Lineu Prestes, 748 – Butantã – CEP 05343-000, de 03/2007 até o presente.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Diagnóstico e Resolução de Problemas em HPLC (20h teóricas, 12h práticas), Waters, de 28 a 31/07/2008.

The Humane Care and Use of Animals in Research (4h), NIEHS (Durham, NC, USA), em 18/06/2009.

OCUPAÇÃO

Bolsista de Doutorado Direto, FAPESP (Processo número 07/56301-8) “Geração de intermediários reativos pela oxidação aeróbica de β -cetoácidos catalisada por hemeproteínas”, 01/02/2008 a 28/02/2011.

Professor (80h) do IV Curso de Verão em Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, 12/01/2009 a 23/01/2009.

Monitor do III Curso de Inverno, Temas Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, 21/07/2008 a 01/08/2008.

Bolsista de Doutorado Direto, institucional CNPq (Processo número 140229/2007-8) “Geração de intermediários reativos pela oxidação aeróbica de β -cetoácidos catalisada por hemeproteínas”, 01/03/2007 a 01/02/2008.

Bolsista de Iniciação Científica, institucional CNPq (Processo número 112419/2005-4) “Peróxido de hidrogênio e óxido nítrico como mediadores do encistamento celular do dinoflagelado *Lingulodinium polyedrum*”, 01/07/2005 a 01/02/2007.

Monitor (80 h/a) da Disciplina de Histologia, Universidade Cruzeiro do Sul, Curso de Ciências Biológicas, de agosto a dezembro de 2005.

Monitor (64 h/a) da Disciplina de Biologia Celular, Universidade Cruzeiro do Sul, Curso de Ciências Biológicas, de abril a junho de 2005.

PUBLICAÇÕES

Artigo submetido a revista Free Radical Biology & Medicine “Myoglobin- H_2O_2 catalyzes the aerobic oxidation of acetoacetate and 2-methyl acetoacetate to α -dicarbonyls: chemical mechanism and implications in ketosis”, em fevereiro de 2011.

Resumo “Mechanism of myoglobin/ H_2O_2 -catalyzed oxidation of acetoacetate and 2-methyl acetoacetate” apresentado na modalidade pôster, durante a XXXIX Reunião

Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq (Foz do Iguaçu/PR, Brasil) realizado de 18 a 21 de maio de 2010.

Resumo “Mechanism of myoglobin/H₂O₂-catalyzed oxidation of acetoacetate and 3-methyl acetoacetate” apresentado na modalidade pôster, durante a 16ª Reunião Anual da *Society of Free Radical in Biology and Medicine - SFRBM* (Washington, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC, Brasil) realizado de 18 a 22 de novembro de 2009.

Resumo “Kinetics of cyst formation mediated by hydrogen peroxide and nitric oxide in the dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum*” apresentado na modalidade pôster, durante a XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq (Águas de Lindóia, São Paulo/SP, Brasil) realizado de 1 a 4 de julho de 2006.

Resumo “Peróxido de hidrogênio e óxido nítrico como mediadores de encistamento celular do dinoflagelado *Lingulodinium polyedrum*” apresentado na modalidade pôster, durante a 58ª Reunião Anual da SBPC (Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC, Brasil) realizado de 16 a 21 de julho de 2006.

Resumo “Peróxido de hidrogênio e óxido nítrico como mediadores de encistamento celular do dinoflagelado *Lingulodinium polyedrum*” apresentado na modalidade pôster, durante o 5º Congresso Nacional de Iniciação Científica CONIC-SEMESP (Centro Universitário Monte Serrat, Santos/SP, Brasil) realizado em 6 e 7 de novembro de 2005.