BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo
80647

110 721.44.47 /
Lilacs OK
Dadalus: 1363308
DBDQ: 26374
Terminal 012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Oxidação de urato e tirosina por peroxinitrito

Implicações para o desenvolvimento de seqüestradores e
biomarcadores de peroxinitrito

CÉLIO XAVIER DA COSTA DOS SANTOS

TESE DE DOUTORADO

Orientadora: Profa. Dra. OHARA AUGUSTO

SÃO PAULO

2002

Ficha Catalográfica

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

Santos, Célio Xavier da Costa dos
S231o Oxidação de urato e tirosina por peroxinitrito: implicações
para o desenvolvimento de seqüestradores e biomarcadores de
peroxinitrito / Célio Xavier da Costa dos Santos. -- São
Paulo, 2002.
91p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Augusto, Ohara

I. Oxidação biológica 2. Purina : Metabolismo 3.
Aminoácido : Metabolismo I. T. II. Augusto, Ohara,
orientador.

574.19258 CDD

*“Oxidação de Urato e Tirosina por Peroxinitrito
Implicações para o Desenvolvimento de
Seqüestradores e Biomarcadores de Peroxinitrito”*

**CÉLIO XAVIER DA COSTA
DOS SANTOS**

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências – Área: Bioquímica.

Aprovada por:

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

Prof. Dr. PAULO DI MASCIO
IQ – USP

Profa. Dra. ALICIA JULIANA KOWALTOWSKI
IQ – USP

Profa. Dra. ANA CAMPA
FCF – USP

Prof. Dr. FRANCISCO RAFAEL MARTINS LAURINDO
INCOR – FM – USP

SÃO PAULO
23 DE OUTUBRO 2002.

Meus agradecimentos

À **Ohara**, pela orientação exigente e a oportunidade de aprender muito durante o desenvolvimento deste trabalho.

À **Maria Júlia Manso Alves** do IQ/USP pela colaboração na produção do anticorpo monoclonal e na participação e discussão de experimentos com os parasitos. Também pela amizade e apoio constantes durante os últimos anos da realização deste trabalho.

À Profa. Selma Giorgio do ICB/UNICAMP pela colaboração nos experimentos com os parasitos.

Aos professores Renato A Mortara, Sérgio F Oliveira, Massuo J Kato pelo acesso dos equipamentos e ajuda na histologia.

Ao Leandro pela ajuda com o massa e à Elaine da Profa Ana Campa pelo auxílio com os neutrófilos.

Aos professores **Francisco E Martinez, Ethel LB Novelli e Ana Lúcia Ferreira dos Anjos** da UNESP/Botucatu pelos ensinamentos inicial e incentivo na carreira científica.

À minha **família** pelo incentivo.

À Doutora **Maria Goretti** pelo apoio e incentivo.

A todos os amigos de laboratório: **Berê, Lia, Denise, Angélica, Marcelo, Edlaine, Roberto Salinas, Humbertinho, Fernanda, Silvio, Sílvia, Leandro, Sônia e Reynaldo.**

À **Jeane, Tatiana, Sandrinho** e o **Martins** pela grande amizade, descontração e apoio nos momentos mais difíceis.

À agência financiadora **FAPESP**.

ÍNDICE

	pg
Abreviaturas.....	4
Resumo.....	5
Summary.....	6
1. Introdução.....	7
1.1. $\cdot\text{NO}$ e $\text{O}_2^{\cdot-}$: produção em células e propriedades.....	7
1.2. Formação do peroxinitrito em condições fisiológicas.....	8
1.3. Reatividade do peroxinitrito com biomolécula.....	9
1.4. Urato e estresse oxidativo.....	12
1.5. 3-nitrotirosina como biomarcador do peroxinitrito	13
2. Objetivos.....	14
3. Materiais e Métodos.....	15
3.1. Reagentes.....	15
3.2. Oxidação de lipossomas e LDL.....	16
3.3. Experimentos de consumo de oxigênio.....	17
3.4. Estudos de cinética rápida.....	17
3.5. Caracterização dos produtos de oxidação do urato e da tirosina.....	17
3.6. Cálculos.....	19
3.7. Produção de anticorpos monoclonais anti-DOPA.....	19
3.8. Parasitos e infecção.....	21
3.9. Determinação de nitrito.....	24
4. Resultados.....	25
4.1. Estudos da oxidação do urato pelo peroxinitrito.....	25
4.2. Estudos da oxidação da tirosina pelo peroxinitrito.....	38
4.3. Proteínas nitradas e hidroxiladas como biomarcadores de peroxinitrito?.....	44
5. Discussão.....	64
5.1. A oxidação do urato pelo peroxinitrito.....	64
5.2. Estudos da oxidação da tirosina pelo peroxinitrito.....	68
5.3. Proteínas nitradas e hidroxiladas como biomarcadores de peroxinitrito?.....	72
6. Conclusões.....	76
7. Referências bibliográficas.....	77
<i>CURRICULUM VITAE</i>.....	91

ABREVIATURAS

Apo-B 100 = apolipoproteína-B 100

BHT = 2, [6]-di-tert-butil-p-cresol

BSA = albumina sérica bovina

BSA-G-DOPA = albumina sérica bovina conjugado à DOPA via glutaraldeído

Cat = catalase

DAPI = 4',6-diamino-2-fenilindol

DBNBS: 3,5-dibromo-4-nitrosobenzeno sulfonato

DOPA = L-3-hidroxitirosina

DMPO = 5,5-dimetil-1-pirrolina-*N*-óxido

DMSO = dimetil sulfóxido

DTPA = dietilenotriamina-*N,N,N',N'*-pentaacetato

ELISA = ensaio de imunoadsorção

EPR: espectrometria de ressonância paramagnética eletrônica

FITC = isotiocianato de fluoresceína

FOX = método do laranja xilenol

HPLC = cromatografia líquida de alta performance

HRP/H₂O₂ = peroxidase de raiz forte /peróxido de hidrogênio

LDL = lipoproteína de baixa densidade

MPO = mieloperoxidase

NBT = 2,2',di-p-nitrofenil-5,5'-difetil-3,3'-dimetoxi-4,4'-difetileno

PBS = solução salina de fosfato

Peroxinitrito = refere-se a soma das formas do ânion peroxinitrito (ONOO⁻, oxoperoxonitrato (-1)) e do ácido peroxinitroso (ONOOH, oxoperoxonitrato de hidrogênio) a menos quando especificado no texto

PMA = 13-acetato de 12-miristato-forbol

SFB = soro fetal bovino

SMB = metabissulfito de sódio

UA = ácido úrico

RESUMO

Peroxinitrito ($\text{ONOO}^- + \text{ONOOH}$), o produto da rápida reação do óxido nítrico com o ânion radical superóxido, tem recebido muita atenção como possível mediador dos efeitos deletérios associados a uma superprodução de $^*\text{NO}$. O peroxinitrito é um potente oxidante que é capaz de oxidar e nitrar várias biomoléculas por mecanismos que contribuímos para esclarecer no decorrer desta tese. Especificamente, estudamos a oxidação de urato e tirosina por peroxinitrito. Demonstramos que o urato é oxidado por peroxinitrito a alantoina, aloxana e ao radical aminocarbonila. Como a reação direta entre urato e peroxinitrito tem uma constante de velocidade relativamente baixa ($k = 4,8 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) em comparação com àquelas de outras biomoléculas, sugerimos que o urato é um potente sequestrador dos radicais derivados do peroxinitrito ($^*\text{NO}_2$ e $\text{CO}_3^{\cdot-}$, na maioria dos ambientes biológicos; a pH ácido, o radical $^*\text{OH}$ também pode se tornar relevante). No caso da tirosina, confirmamos que ela não reage diretamente com o peroxinitrito mas com os radicais dele derivados. Como antecipado, o rendimento relativo dos produtos (3-nitrotirosina, 3,3-bitirosina e 3-hidroxitirosina (DOPA)) variou com o pH e a presença de CO_2 . Esses estudos nos levaram a propor a co-localização de proteínas nitradas e hidroxiladas como um possível biomarcador de peroxinitrito. Para testar essa hipótese, um anticorpo monoclonal anti-DOPA foi desenvolvido e utilizado em modelos de infecção por *Leishmania amazonensis* (macrófagos (J774), e camundongos resistentes (C56Bl/6) e suscetíveis (BALB/c). A co-localização de proteínas hidroxiladas e nitradas ficou evidenciada em todos os modelos testados e ocorreu concomitantemente a máxima produção de $^*\text{NO}$. Infelizmente, o anticorpo obtido perdeu a atividade e ainda não pudemos confirmar esses dados.

SUMMARY

Peroxynitrite ($\text{ONOO}^- + \text{ONOOH}$), which is formed by the fast reaction between nitric oxide and superoxide anion, has been receiving increasing attention as a mediator of the deleterious effects associated with an overproduction of $\cdot\text{NO}$. The compound is a strong oxidant that is able to oxidize and nitrate a variety of biotargets by mechanisms that this work has contributed to establish. Specifically, we studied the oxidation of urate and tyrosine by peroxynitrite. Urate oxidation produced allantoin, alloxan and the aminocarbonyl radical. Since the rate constant of the direct reaction between urate and peroxynitrite ($k = 4,8 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) is low in comparison with those of other biotargets, we proposed that urate is an efficient scavenger of peroxynitrite-derived radicals ($\cdot\text{NO}_2$ and $\text{CO}_3^{\cdot-}$ in most biological environments; at acid pH, the $\cdot\text{OH}$ radical may also become relevant). In the case of tyrosine, we confirmed that it does not react directly with peroxynitrite but, instead, with the radicals derived from it. As anticipated, the relative yield of the products (3-nitrotyrosine, 3,3-bityrosine and 3-hydroxytyrosine (DOPA)) varied with the pH and CO_2 presence. These results led us to propose that co-localization of nitrated and hydroxylated proteins could be a peroxynitrite biomarker. To test this hypothesis, a monoclonal anti-DOPA antibody was developed and tested in *Leishmania amazonensis* infection models (macrophages (J774), and resistant (C56Bl/6) and susceptible mice (BALB/c). It was possible to evidence co-localization of hydroxylated and nitrated proteins in all tested models in a time when $\cdot\text{NO}$ synthesis was maximum. Unfortunately, we were unable to confirm these results due to antibody inactivation; new antibody batches are being obtained.

1. INTRODUÇÃO

O envolvimento de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em uma série de processos fisiológicos e patológicos tem sido estudado extensivamente nos últimos anos (Halliwell e Gutteridge, 1999). A descoberta de que o óxido nítrico (NO), um radical livre sintetizado por células de mamíferos, é também um importante mensageiro celular mudou paradigmas importantes sobre a ação de radicais livres em Biologia. Tidos até recentemente como exclusivos promotores de danos (ver, por exemplo, Szabo e col., 1996), radicais livres e oxidantes atualmente são também considerados importantes reguladores da homeostase celular (Castro e col., 1998; Lee e col., 2000; van der Vliet e col., 1998).

O NO é uma espécie química conhecida e estudada há décadas como poluente ambiental. Somente nos últimos 20 anos, teve elucidado sua participação em processos fisiológicos, inclusive na comunicação celular e em mecanismos de transdução de sinal. Devido às suas reações biológicas, o NO trouxe atenção para outras espécies reativas até então pouco consideradas em Biologia como o peroxinitrito, o dióxido de nitrogênio (NO_2) e ânion radical carbonato ($\text{CO}_3^{\bullet-}$) (Augusto e col., 2002).

Inicialmente uma curiosidade química (Beckman e col., 1990), o peroxinitrito foi muito estudado na última década na etiologia de doenças, como toxina microbida e, também, como agente bioregulatório. É formado através da reação rápida entre o $\text{O}_2^{\bullet-}$ e o NO (eq. 1) (Kissner e col., 1997) e é fortemente reativo, sendo capaz de oxidar e nitrar uma série de biomoléculas (Hurst e Lyman, 1999). A co-produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e NO em células seria responsável pela formação de peroxinitrito *in vivo*, da qual existem hoje várias evidências (Radi e col., 2001 a e b), mas não provas inequívocas.

1.1. NO e $\text{O}_2^{\bullet-}$: Produção em células e propriedades

O NO é um radical livre pouco reativo ($t_{1/2}$ da ordem de segundos em sistemas biológicos) (Ignarro, 1990; Moncada e col., 1991) capaz de difundir em membranas biológicas devido à seu tamanho e caráter hidrofóbico. A relativa facilidade com que reage com grupos tiólicos, heme e ferro-enxofre determina sua importância como mensageiro biológico (Moncada, 1992; Bogdan, 2001). Sintetizado por uma família de enzimas denominadas de NO sintase (NOs) a partir do aminoácido L-arginina (para revisão ver Alderton e col., 2001), desempenha diferentes funções de acordo com a sua localização e

concentração, que pode ser muito aumentada em condições patológicas (Moncada e col., 1991).

O óxido nítrico tem sua reatividade aumentada ao formar o peroxinitrito (eq. 1), em uma reação cuja constante de velocidade é maior, inclusive, do que a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ ($k = 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) pela enzima superóxido dismutase (SOD). Macrófagos ativados produzem $^{\bullet}\text{NO}$ através de uma enzima NOs induzível (iNOs) e têm grande parte de seus efeitos citotóxicos a ele relacionados (MacMicking e col., 1997).

A produção do $O_2^{\bullet-}$ é um processo contínuo em células aeróbicas pelo vazamento de elétrons na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial e do retículo endoplasmático, e também pelo o *burst* respiratório de fagócitos ativados (Halliwell e Gutteridge, 1999). O fluxo de $O_2^{\bullet-}$ intracelular foi estimado como micromolar/seg e representa cerca de 1% do total do O_2 consumido em condições normais. Esse valor pode ser alterado pela ruptura do fluxo normal de elétrons, pelo aumento na tensão de oxigênio ou durante o *burst* respiratório de fagócitos (Naqui e col, 1986; Halliwell e Gutteridge, 1999; Jones e Cross, 1992).

1.2. Formação do peroxinitrito em condições fisiológicas

A formação do peroxinitrito a partir dos radicais $O_2^{\bullet-}$ e $^{\bullet}\text{NO}$ é muito rápida e ocorre no limite difusional (eq. 1) (Lyman e Hurst, 1998; Hue e Padajma, 1993), indicando que a co-produção destas espécies *in vivo* seria condição suficiente para sua formação. Aliás, o $^{\bullet}\text{NO}$ é presumivelmente a principal biomolécula capaz de competir com a SOD pelo $O_2^{\bullet-}$, devido à sua alta reatividade e ao fato de estar presente em altas concentrações nas células. Por exemplo, em condições fisiológicas (ca. 10 μM de SOD), uma concentração de 2 μM de óxido nítrico já seria capaz de reagir com cerca de 50 % do $O_2^{\bullet-}$ produzido (Radi e col., 2001; Sharma, e col., 1987). A concentração de estado estacionário do óxido nítrico em células é da ordem de nanomolar, o suficiente para suas funções como mensageiro celular. No entanto, em situações inflamatórias, sua concentração pode chegar à ordem de micromolar (Moncada e col., 1991; Alderton e col., 2001).

Assim, o fator determinante para a formação de peroxinitrito *in vivo* parece ser a co-geração de $^{\bullet}\text{NO}$ e $O_2^{\bullet-}$ em condições que permitam sua aproximação dentro de um mesmo compartimento celular (Radi e col., 2001). O $^{\bullet}\text{NO}$ é capaz de difundir rapidamente por membranas (Lancaster, 1997), enquanto o $O_2^{\bullet-}$ só é capaz de permeá-las através de canais aniônicos (Fridovich, 1995). Este fato faz com que a maior parte da formação de peroxinitrito em células deva ocorrer próxima aos sítios de produção de superóxido.

Existem ainda outros mecanismos que podem gerar peroxinitrito *in vivo*. Algumas enzimas da família das NOs, por exemplo, produzem $\cdot\text{NO}$ e $\text{O}_2\cdot$ em ausência de L-arginina, formando peroxinitrito através do desacoplamento entre consumo de NADPH e a oxidação do substrato (Vasquez-Vivar e Kalyanaraman, 2000). O $\cdot\text{NO}$ produzido por estas enzimas pode ainda reagir com oxi-mioglobina ou oxi-hemoglobina formando nitrato ($k = 3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) através da formação intermediária de peroxinitrito (Herold, 1999). Outra via possível é a reação entre o ânion nitroxila, obtido através da redução do óxido nítrico por um elétron ($E^0_{(\cdot\text{NO}/\text{NO}^-)} = 0,39 \text{ V}$), com oxigênio molecular (Sharpe e Cooper, 1998; Wink e col., 1998). Recentemente foi proposta a possibilidade de que peroxidases podem gerar peroxinitrito (Sampson e col., 1998; Brennan e col., 2002). Apesar de não estar claro o mecanismo pelo qual ocorre, a formação do oxidante foi inferida pela produção de produtos nitrados e hidroxilados (3-nitrotirosina e DOPA, respectivamente) *in vitro* (Brennan e col., 2002).

1.3. Reatividade do peroxinitrito com biomoléculas

Em pHs fisiológicos, o peroxinitrito pode reagir diretamente com diversas biomoléculas ou reagir indiretamente através de seus produtos de decomposição. Estes são produzidos por clivagem homolítica da forma protonada ou pela reação com o CO_2 (Esquema 1).

As reações diretas envolvem oxidações por dois elétrons promovidas tanto pela forma aniônica quanto pela protonada com constantes de velocidade de segunda ordem que variam de 10 a $10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Radi e col., 2001 a). Em sistemas biológicos, há uma série de moléculas que reagem rapidamente com peroxinitrito, particularmente tióis e hemoproteínas (Esquema 1).

Apesar de relativamente estável em meio alcalino, o peroxinitrito torna-se bastante reativo em pHs fisiológicos, pois a forma protonada (ONOOH) ($\text{pK}_a = 6,6$) sofre rápida decomposição ($t_{1/2} = 4,1 \text{ s}$ a pH 7,4; 25°C) produzindo cerca de 70% de NO_3^- e 30% de $\cdot\text{NO}_2$ e $\cdot\text{OH}$ ($k = 0,17 \text{ s}^{-1}$) (Esquema 1), sendo estas as espécies responsáveis pelas oxidações unimolecular medidas pelo peroxinitrito (Hurst e Lyman, 1999). Nestes casos, temos processos de primeira ordem em relação ao peroxinitrito mas de zero ordem em relação aos alvos biológicos mostrando que a formação destes radicais e, em última instância, a decomposição do peroxinitrito, será o fator limitante da reação.

É importante ressaltar que em ambientes biológicos a atividade do peroxinitrito vem sendo atribuída ao aduto putativo produzido pela sua reação com dióxido de carbono (Lyman e Hurst, 1998; Squadrito e Pryor, 1998; Bonini e col., 1999). O ânion peroxinitrito (ONOO^-), que é a forma predominante em pHs fisiológicos, reage rapidamente com dióxido de carbono, produzindo o aduto putativo nitrosoperoxycarboxilato (ONOOCO_2^-) (Esquema 2).

Modelagens cinéticas considerando os altos valores das concentrações de dióxido de carbono presentes em fluidos biológicos em equilíbrio com o bicarbonato (1-1,5 mM), sugerem que a maioria do peroxinitrito que pode ser formado nesses fluidos produzirá o aduto com dióxido de carbono antes de reagir com outros alvos biológicos (Lyman e Hurst, 1996; Squadrito e Pryor, 1998). Na presença de dióxido de carbono, o peroxinitrito decompõe-se formando 65% de NO_3^- e CO_2 e 35% de dióxido de $^*\text{NO}_2$ e $\text{CO}_3^{\cdot-}$ (Esquema 1) (Bonini e col., 1999). O dióxido de nitrogênio e o radical ânion carbonato oxidam uma série de biomoléculas em reações com constantes de segunda ordem na faixa de 10^5 - $10^8 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ (Augusto e col., 2002). O dióxido de carbono pode então competir com os demais alvos biológicos pelo peroxinitrito, inibindo suas oxidações por dois elétrons mas oxidando-os por um elétron pelos radicais $^*\text{NO}_2$ e $\text{CO}_3^{\cdot-}$ que escapam da gaiola de solvente (Esquema 1). Consequentemente, o dióxido de carbono redireciona as oxidações mediadas pelo peroxinitrito de dois elétrons para um elétron, principalmente em pHs neutros. Os radicais $^*\text{NO}_2$ e $\text{CO}_3^{\cdot-}$ devem ser as espécies reativas na maioria dos ambientes biológicos, contudo, em ambientes de pHs mais baixos, as reações via o radical $^*\text{OH}$ tornam-se importantes (Bonini e col., 1999; Bonini e Augusto, 2001; Augusto e col., 2002).

Esquema 1. As principais vias de oxidação de biomoléculas (BM) pelo peroxinitrito na ausência e em presença do CO₂. Os valores das constantes de velocidade são os referentes à pH 7,4, 25°C. BM corresponde a biomoléculas genéricas, BMNO₂ corresponde a biomoléculas nitradas e BMox a biomoléculas oxidadas. O CO₂ pode competir com algumas BM pelo peroxinitrito inibindo suas oxidações por dois elétrons mas estimulando as oxidações radicalares via os radicais •NO₂ e CO₃^{•-} que escapam da gaiola (“cage”) de solvente (Augusto e col., 2002).

1.4. Urato e estresse oxidativo

O ácido úrico está presente no plasma humano como monoânion urato ($pK_{a1}= 5,4$ e $pK_{a2}= 9,4$) (Simic e Janovic, 1989) e em altas concentrações (200-500 μM) quando comparada com as outras concentrações encontradas em outros primatas já que a enzima uricase é ausente em humanos (Cutler, 1984; Becker, 1993). O urato é considerado uma importante molécula antioxidante (Ames, 1981; Benzie, 2000) devido a sua capacidade de quelar metais de transição (Davies e col., 1986) e de reagir com radicais hidroxila (Massuda e col., 1975) e com radicais peroxila (Simic e Janovic, 1989), inibindo a iniciação e propagação de eventos oxidativos. O urato também pode desativar espécies ferril de hemoproteínas como peroxidases, meta-hemoglobina e citocromo-c (Goyal e col., 1992; Kaur e Halliwell, 1990; Martens e col., 1987). Em todas essas reações os principais produtos de oxidação do urato são alantoína, aloxana e ácido oxônico os quais já foram propostos como biomarcadores de estresse oxidativo em humanos (Kaur e Halliwell, 1990).

Apesar de ser considerado um antioxidante endógeno, altos níveis de ácido úrico também têm sido associados ao aumento de lesões oxidativas em algumas circunstâncias. Por exemplo, foi demonstrado que o urato aumenta a inativação da α_1 -antiproteínase (Aruoma, 1989) e da álcool desidrogenase (Kittridge, 1984) promovida por irradiação, e eleva a oxidação da LDL iniciada por radicais peroxila (Bowry e Stocker, 1993). Também existem estudos epidemiológicos que encontraram uma correlação positiva entre os níveis de urato plasmático e o risco de doenças cardiovasculares (Benzie e Strain, 1996).

Mais recentemente o urato tem sido considerado um importante sequestrador de peroxinitrito devido a sua capacidade de inibir eficientemente a formação de 3-nitrotirosina por peroxinitrito *in vitro* (Whiteman e Halliwell, 1996). *In vivo*, em modelos de esclerose múltipla e encefalomielite alérgica experimental a administração de um inibidor da uricase decresceu os níveis de proteínas nitradas e os resultados foram interpretados como uma indicação da participação do peroxinitrito nos processos neurodegenerativos (Kean, 2000; Hooper, 2000; Hooper, 1998; para revisão desses modelos, ver Scott e Hooper, 2001).

O peroxinitrito é capaz de oxidar o urato e outros derivados de purinas, como a xantina e hipoxantina (Skinner e col., 1998), e 8-oxodG (7,8-Dihidro-8-oxo-2'-deoxiguanosina) (Uppu e col., 1996; Tretyakova e col., 1999). No caso do ácido úrico, já haviam sido identificados parcialmente dois produtos de oxidação: um composto nitrado capaz de liberar óxido nítrico (Skinner e col., 1998) e um radical livre centrado em um átomo de carbono deficiente em elétrons (Vásquez-Vivar e col., 1996). Ambos os produtos foram detectados no plasma humano tratado com peroxinitrito (Skinner e col., 1998; Vásquez-Vivar e col., 1996), indicando que essas espécies podem ser produzidas *in vivo* e participar de algumas propriedades fisiológicas do ácido úrico. Por exemplo, nós levantamos a hipótese

de que o radical produzido no plasma humano tratado com peroxinitrito poderia ser capaz de propagar a oxidação da LDL mediada pelo peroxinitrito (Vásquez-Vivar e col., 1996). Essa possibilidade foi suportada por alguns estudos que demonstraram que o urato era capaz de elevar danos oxidativos iniciados pelo peroxinitrito em LDL humana (Thomas e col., 1998). Contudo, tanto os mecanismos para esse efeito pró-oxidante bem como a reação entre o urato e o peroxinitrito até o início de nossos estudos permaneciam pouco caracterizados (Santos e col., 1999).

1.5. 3-Nitrotirosina como biomarcador do peroxinitrito

Dentre as várias reações do peroxinitrito, tem sido amplamente estudada a sua capacidade de nitrar uma variedade de biomoléculas, especialmente resíduos aromáticos de proteínas. Essa reação foi explorada para o desenvolvimento de anticorpos anti-nitrotirosina (Ischiropoulos, 1998; Beckman e col., 1994) que foram utilizados para evidenciar a formação de peroxinitrito *in vivo*, inclusive em humanos (para revisão ver, Darley-Usmar e col., 1995). Tais evidências ficaram abaladas com a demonstração de que existem várias rotas biológicas para a nitração de proteínas, inclusive a oxidação de nitrito por peroxidases (van der Vliet col., 1997; Eiserich e col., 1998).

Hoje, o principal desafio em relação ao peroxinitrito é provar inequivocamente a sua formação *in vivo*. Como um oxidante altamente reativo, o peroxinitrito não pode ser isolado e detectado em ambientes celulares. Dessa forma, o uso de sequestradores e de biomarcadores seriam as únicas abordagens possíveis para inferir sobre a produção do oxidante *in vivo*. Nesta tese, estudamos a oxidação da tirosina e urato pelo peroxinitrito, avaliando a influência do par dióxido de carbono/bicarbonato no mecanismo das reações. Tais reações poderiam fornecer informações importantes sobre potenciais biomarcadores e sequestradores de peroxinitrito.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi estudar a oxidação do urato e tirosina por peroxinitrito em presença e ausência de CO₂. Tais estudos foram contemporâneos a uma grande controvérsia sobre a possibilidade da formação de radicais livres a partir do peroxinitrito *in vitro* (ver, por exemplo, Pryor e Squadrito, 1995; Goldstein e col., 1996; Pryor e col., 1996; Gatti e col., 1998) e contribuíram para a resolução da controvérsia (Augusto e col., 2002). Além disso, as conclusões dos estudos *in vitro* foram exploradas para o desenvolvimento de abordagens que pudessem ser empregadas para indicar a produção de peroxinitrito *in vivo*. Neste caso, o modelo utilizado foi a infecção por *Leishmania amazonensis* em macrófagos (J774) e em camundongos (BALB/c e C56Bl/6).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes

A água utilizada em todos os experimentos foi tratada com o sistema Nanopure da Barnstead e eventualmente com Chelex-100.

Chelex-100, POBN, DMPO, DTPA, EDTA, dióxido de manganês, formiato de amônio, antimicina A, streptomicina, ampicilina, pronase e os aminoácidos, foram obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA.

O peróxido de hidrogênio foi obtido da Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA, e sua concentração foi periodicamente determinada por espectrofotometria ($\epsilon_{240} = 43,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Kuthan e Ullrich, 1982).

O DMSO, o clorofórmio e outros solventes de grau cromatográficos e demais reagentes foram obtidos da Merck, Darmstadt, Alemanha.

As soluções de Fe(II) empregadas foram preparadas em solução de H_2SO_4 (0,5 M) para evitar a auto-oxidação do ferro (North e col., 1992).

As soluções estoque de urato (0,1 M) foram preparadas em 0,3 M de NaOH e usadas dentro de 12 horas.

O DMPO foi purificado por destilação e sua concentração determinada por UV ($\epsilon_{234} = 7.700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, em etanol).

O DBNBS foi sintetizado segundo protocolo descrito (Kaur e col., 1981)

O SFB e poli-etileno-glicol 4000 (PEG 4000) foram obtidos da Gibco BRL, USA.

Os meios de cultura RPMI-1640 e DMEM foram obtidos da Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA. O DMEM foi suplementado com arginina (800 μM), streptomicina (100 mg/ml) e ampicilina (25 mg/ml).

O peroxinitrito foi sintetizado segundo Beckman e col., 1994. Resumidamente, a síntese foi realizada a partir das soluções de nitrito de sódio (0,6 M) e peróxido de hidrogênio (0,65 M) em um reator "quenched-flow" (Beckman e col, 1990); um excesso de peróxido de hidrogênio foi usado para minimizar a contaminação por nitrito (Saha e col., 1998). O peróxido de hidrogênio remanescente foi removido com a adição de dióxido de manganês. O peroxinitrito sintetizado continha baixas contaminação de H_2O_2 (< 1 %) e de nitrito (10-30 %) que foram determinadas, respectivamente, como descritos previamente (Kissner e col., 1997) pelo método de titanil e pela absorbância medida em 354 nm ($\epsilon = 24,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A concentração de peroxinitrito foi determinada por espectrofotometria ($\epsilon_{302 \text{ nm}} = 1.670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

O anticorpo primário policlonal de ovelha anti-nitrotirosina utilizado foi obtido da Oxis International, USA. O anticorpo secundário anti-IgG de ovelha conjugado com rodamina foi obtido da Calbiochem-Novabiochem Corporation, São Diego, USA. O anticorpo policlonal de coelho anti-IgG de camundongo e conjugado com fosfatase alcalina e o anti-IgG de camundongo conjugado com FITC foram obtidos da Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA. Quando não especificadas, as diluições dos anticorpos foram as sugeridas pelos fabricantes.

3.2 Estudos da oxidação de lipossomas e LDL

a) Preparo dos lipossomas

Os lipossomas de fosfatidilcolina/cardioplipina (80:20%, g/g) foram preparados a partir de uma solução estoque (20 mg/ml) em tampão fosfato de potássio (10 mM, pH 7,0). A suspensão foi sonicada por três ciclos de 30 s à 65 W em banho de gelo com sonicador Branson 250 (Pick, 1981). Os lipossomas foram mantidos a 4°C no escuro e utilizados no período máximo de uma semana.

b) Isolamento de lipoproteína

A LDL (densidade=1,019-1,063 g/ml) foi isolada por ultracentrifugação seqüencial do plasma humano coletado em 1 mg/ml de EDTA (etilenodiamina,-N-N,N',N', tetracetato) e inibidores de proteases (benzamidina 2 mM, aprotinina 1 mg/ml, PMSF (fluoreto de α -tolueno sulfonil) (1 mM) (Havel e col, 1984). Ao final do isolamento as lipoproteínas foram exaustivamente dialisadas contra PBS. As preparações de LDL foram estocadas sob atmosfera de nitrogênio a 4°C e utilizadas dentro de uma semana.

c) Oxidação de lipossomas e LDL

Os lipossomas (2,5 mg/ml) ou a LDL (0,5 mg/ml de proteína) foram incubados em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4) em presença de urato (0,5 mM) e diferentes concentrações de peroxinitrito a 37°C sob agitação constante em diferentes intervalos de tempo. O peroxinitrito, devido sua alta reatividade, foi adicionado como o último reagente. A reação foi interrompida por transferência das amostras para gelo. As quantificações dos hidroperóxidos lipídicos e TBARS (substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico) foram realizadas como descrito abaixo.

Os hidroperóxidos lipídicos foram medidos segundo o método do laranja xilenol, conhecido como FOX (Wolff, 1994, Jiang e col., 1992). O método é baseado na oxidação de íons ferroso à férrico por hidroperóxidos. Os íons Fe^{3+} formam um complexo com o corante laranja xilenol [ácido o-cresolsulfonaftalina 3',3''-bis(metilamino) diacético] de cor azul púrpura. Em 0,1 ml de amostra foi adicionado 0,9 ml de reagente FOX (laranja xilenol 100 μM , sulfato ferroso de amônio 250 μM , ácido sulfúrico 25 mM, BHT 4 mM em solução 90%

de metanol/ água, v/v). Após 30 min, à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 6000 rpm por 6 min. A concentração de hidroperóxido lipídico determinada usando-se o coeficiente de extinção ($\epsilon_{560\text{ nm}} 4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Wolff, 1994).

Os produtos aldeídicos da lipoperoxidação foram medidos pelo método de TBARS. Amostras de incubações dos lipossomas ou LDL foram misturadas à solução aquosa de 0,38% de TBA (ácido tiobarbitúrico), contendo 1% de Triton X-100, 0,25 M de HCl e 0,05% de BHT e incubadas em água fervente por 40 min. Depois de resfriadas as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 min, filtradas e a concentração de TBARS foi determinada usando-se o coeficiente de extinção ($\epsilon_{532\text{ nm}} 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Bouge e Aust, 1978).

3.3 Experimentos de consumo de oxigênio

Os estudos de consumo de oxigênio foram realizados utilizando-se um eletrodo de oxigênio (Gilson 5/6 Oxygraph) a 30°C. A concentração de oxigênio molecular em solução nesta temperatura foi considerada como 220 μM (Robinson e Cooper, 1970).

3.4 Estudos de cinética rápida

A cinética de decomposição do peroxinitrito, na ausência e na presença de ácido úrico, foi acompanhada em um espectrofotômetro de cinética rápida (Applied photophysics SX-18 MV) e monitorada a 340 nm. Os tampões utilizados foram tratados com Chelex-100 por uma noite e exaustivamente sonicados antes dos experimentos serem realizados. As constantes de velocidade aparentes da reação do urato com o peroxinitrito k_{obs} (s^{-1}) foram determinadas por uma equação padrão do programa ajustada a uma função exponencial simples. Os valores determinados são a média de 7 determinações independentes. A temperatura foi mantida a $37 \pm 0,2^\circ\text{C}$ e os pHs das soluções finais foram controladas.

3.5 Caracterização dos produtos de oxidação do urato e da tirosina pelo peroxinitrito

a) Estudos de EPR

O estudo de EPR por fluxo foi realizado à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) em um espectrômetro Bruker EMX operando em 9.65 GHz e 100 KHz de modulação de campo e equipado com uma cavidade de fluxo (Bruker ER4117 D-MTV). As soluções saturadas de tirosina (3,7 mM) foram preparadas em tampões apropriados (300 mM) aos quais bicarbonato de sódio (50 mM) foi adicionado ou não. Essas soluções foram incubadas por 15 min para permitir o equilíbrio entre o par dióxido de carbono/bicarbonato. As soluções contendo tirosina e peroxinitrito foram transferidas para seringas de plástico (60 ml) e colocadas em um bomba injetora (Harvard apparatus pump 22). Os espectros foram obtidos 18 ms após a mistura em fluxo contínuo de 4 ml/min. O campo magnético foi calibrado com

4-hidroxi-2,2,6,6,-tetrametil-1-piperidiniloxi ($g = 2.0056$) (Mehlhorn e Keith, 1972). As constantes de desdobramento hiperfino do radical tirosila foram obtidos a partir da simulação do espectro experimental utilizando o programa descrito por Duling, 1994.

Nos casos em que utilizamos EPR associado à captação de *spin*, as misturas de reação foram transferidas para uma cela e os espectros foram obtidos 1 min após a adição de peroxinitrito à temperatura ambiente.

b) Análise cromatográfica por HPLC e espectometria de massa dos produtos oxidados do urato

Uma vez que o captador de *spin* DMPO apresenta uma excelente partição para solventes orgânicos, realizamos a extração do aduto gerado em fase aquosa na incubação de urato (3 mM), peroxinitrito (6mM) e captador de *spin* DMPO (40 mM) a pH 7,4 (tampão fosfato 0,1 M) para benzeno. Após a extração, o solvente foi evaporado e o resíduo suspenso em água e injetado em um sistema de HPLC da Waters (constituído por uma bomba 501, acoplada a um detector de UV 486 e um integrador 746). Para a separação utilizamos uma coluna BONDAPAK C₁₈ (Waters 3,9 x 300 mm). A eluição foi acompanhada por medidas de absorbância a 225 nm. Como fase móvel, utilizamos acetonitrila 5% em água, em fluxo 0,5 ml/min. O composto de tempo de retenção de 23,4 min foi coletado de várias injeções, concentrado e dissolvido em ácido fórmico (0,1%, v/v) e injetado (ca. 5 ng/ μ l) no espectrômetro de massa. As análises espectrométricas por ionização de *spray* de elétrons foram realizadas em um espectrômetro de massa Micromass UK Quadrupolo II, operando em módulo positivo de ionização. Os dados foram processados pelo programa Mass Lynx (versão 2,22).

Outros produtos de oxidação do urato pelo peroxinitrito foram isolados de 2 ml das incubações contendo urato (3 mM) e peroxinitrito (6 mM) em tampão fosfato (3mM, pH 7,8). A mistura de incubação foi injetada no sistema de HPLC descrito acima conectado ao espectrômetro de massa. Como fase móvel, utilizou-se formiato de amônio (20 mM, pH 3,3), em fluxo de 0,3 ml/min.

c) Análise cromatográfica por HPLC dos produtos oxidados da tirosina

As soluções contendo tirosina (2 mM) foram pré-incubadas por 15 min em ausência e presença de bicarbonato de sódio (25 mM) em tubos fechados com *septo* de borracha antes da adição de peroxinitrito (1mM). Após 15 min de incubação as amostras foram mantidas em gelo a 0°C até a análise. As soluções foram injetadas em um sistema de HPLC como descrito acima. As separações cromatográficas foram realizadas usando uma coluna Supelcosil LC-18S (4.5 x 250 mm). Como fase móvel foi utilizada 40 mM KH₂PO₄ (pH 3,1) com 2% metanol (v/v) e fluxo de 0.6 ml/min. A eluição dos compostos foram monitoradas por UV a 274 nm. Os produtos foram identificados pela comparação de seus tempos de

retenção e espectro de UV com padrões autênticos submetidos às mesmas condições cromatográficas.

3.6 Cálculos da influência do par dióxido de carbono/bicarbonato na constante de decaimento do peroxinitrito

A constante de velocidade de decaimento do peroxinitrito em presença (eq. 2) ou em ausência (eq. 3) do par dióxido de carbono/bicarbonato foi calculada por equações previamente descritas (Goldstein e Czapki, 1999). Na ausência do par o valor calculado corresponde a 1,1 e 0,17 s⁻¹ em pH 5,4 e 7,4, respectivamente. Na presença de dióxido de carbono equilibrado com os 25 mM de bicarbonato (pK_a= 6,4) utilizados em nossos experimentos (Dean, 1979), os valores são 40,0 e 64,7 s⁻¹ em pH 5,4 e 7,4, respectivamente. Consequentemente, a fração máxima de peroxinitrito que decai ao radical hidroxila na presença de 25 mM de bicarbonato pode ser estimada em 2,8 e 0,26 % a pH 5,4 e 7,4, respectivamente.

$$k_{\text{CO}_2} = 3 \times 10^4 [\text{CO}_2] K_a / (K_a + [\text{H}^+]) \quad (\text{eq. 2})$$

$$k = 1,2 [\text{H}^+] / (k_a + [\text{H}^+]) \quad (\text{eq. 3})$$

3.7 Produção de anticorpos monoclonais anti-DOPA

a) Síntese do imunógeno

Como imunógeno foi utilizado a hemocianina (KLH) de *Megathura crenulata* conjugada com DOPA via glutaraldeído (Mons e Geffard, 1987). Resumidamente, foram dissolvidos 5 mg de DOPA em 1 ml de solução de acetato de sódio (1M, pH 7,5) contendo metabissulfito de sódio (SMB) (10 mg). A solução de proteína (5 mg/ml) foi preparada em 1 ml de solução de acetato de sódio (1M, pH 8). À solução contendo DOPA foi adicionado 1 ml de glutaraldeído (0,1M) sob agitação por 20 segundos e então foi adicionada a solução de proteína e a mistura foi incubada por 15 min. Após esse período a solução se tornou intensamente amarela, indicando o término da reação de acoplamento. Em seguida foi adicionado boroidreto de sódio (8 mM concentração final). A mistura foi então dialisada por 2 dias a 4°C contra solução de metabissulfito de sódio (9 g/L), pH 5,5.

Como antígeno para os testes de ELISA foi utilizada BSA conjugada com DOPA via glutaraldeído como descrito acima.

A concentração de DOPA conjugada às proteínas foi monitorada pelo teste NBT/glicina (Paz e col., 1991). Para cada 100 µl de amostra foram adicionados 300 µL de Glicina (2 M, pH 10), 100 µL de solução de BSA (10 mg/ml) e 1 mL de NBT (0,24 mM) em 2 M de glicina. Os reagentes foram pipetados em tubos imersos em gelo. A reação foi

incubada à temperatura ambiente por 1 hora no escuro. Em seguida, a concentração foi determinada espectrofotometricamente ($\epsilon_{540\text{ nm}}=1.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Paz e col., 1991).

b) Anticorpos monoclonais anti-DOPA

Camundongos fêmeas (BALB/c) foram imunizados com o antígeno KLH-G-DOPA de forma semelhante àquela descrita por Beckman e col, 1994. A primeira imunização foi feita com 1 mg/ml de KHL-G-DOPA em PBS emulsificado com o mesmo volume de adjuvante completo de Freund. Cada camundongo foi inoculado com 0,3 ml dessa suspensão via intraperitoneal. A partir da segunda inoculação, os camundongos foram injetados pela mesma via de administração com 100 μg de KLH-G-DOPA em PBS contendo o mesmo volume de adjuvante incompleto de Freund. Após a terceira imunização, o sangue dos camundongos foi coletado por punção orbital e o soro foi testado para verificar a produção de anticorpos anti-DOPA por ELISA como descrito abaixo. Aproximadamente 6 semanas após o primeiro inóculo, o camundongo que apresentou melhor título (1/2000) de anticorpos anti-DOPA foi imunizado com o antígeno via intravenosa. Quatro dias após essa última imunização, o camundongo foi sacrificado e o baço recolhido para a fusão com células de mieloma P3U1 via PEG 4000 (Alves e col., 1983; Samoilovich e col., 1987). Após a fusão, as células foram semeadas em placas de cultura celular de 96 poços em meio de cultura RPMI-1640 ("Roswell Park Memorial Institute 1640"), contendo 10% de SFB (v/v) e HAT (100 μM hipoxantina, 0,4 μM aminopterina e 20 μM timidina). As células foram mantidas no mesmo meio de cultura contendo HT (100 μM hipoxantina e 20 μM timidina). Depois de duas semanas, o sobrenadante dos hidridomas em crescimento foi recolhido e a produção de anticorpos foi testada por ELISA (ver abaixo). As células positivas foram clonadas por diluição limitada em presença de células de baço de camundongos. Os clones positivos foram expandidos em meio de cultura e os sobrenadantes contendo anticorpos anti-DOPA foram recolhidos e armazenados a 4°C. O anticorpo obtido foi classificado como IgG_{2a} conforme o KIT comercial da ISOSTRIP (Boehringer). O líquido ascítico foi obtido a partir do descongelamento de hibridomas. As células foram mantidas em meio de cultura RPMI contendo 10% de SFB e 1% HT. Após três dias, $5 \cdot 10^5$ células/ml foram injetadas via intraperitoneal na cavidade abdominal de camundongos Balb/c. Os animais foram mantidos em observação até surgir o líquido ascítico na cavidade abdominal. Os animais foram finalmente anestesiados e o líquido ascítico retirado e mantido em geladeira até o seu uso.

c) Ensaios de ELISA

Os ensaios de ELISA foram realizados segundo procedimento já descrito (Mons e Geffard, 1997). Resumidamente, placas de 96 poços recobertos com 100 μl do antígeno BSA-G-DOPA (concentração final de 25 $\mu\text{g/ml}$, em solução tampão de bicarbonato de sódio 0,05 M, pH 8,3, contendo 10^{-3} M de metabissulfito de sódio). Essa solução foi incubada por

18 horas a 4°C. Posteriormente, os antígenos foram desprezados e a placa foi bloqueada com Caseína 1% em PBS-Tween 0,01% por 1 hora a 37°C. Após a lavagem por 3 vezes com o mesmo tampão, os anticorpos foram distribuídos em 50 µl/poço e incubados por duas horas a 37°C. Seguiu-se o mesmo procedimento de lavagem e foi então adicionado (100 µl/poço) o segundo anticorpo anti-IgG conjugado com fosfatase alcalina em uma diluição de 1/5000 por 1 hora a 37°C. Após nova lavagem, foi adicionada a solução do substrato da fosfatase alcalina (100 µl/poço) a qual consistiu de 445 µM BCIP (bromo-5-cloro-4-idolil-3 fosfato) e 400µM NBT diluídos em tampão Tris (1M, pH 9,5; contendo 80mM de NaCl e 400 mM MgCl₂). A leitura de absorbância a 540 nm foi realizada após 40 min.

d) Estudos de SDS-PAGE e Western blotting

Os testes de especificidade dos anticorpos anti-DOPA foram realizados com a BSA conjugada ao DOPA via reação com glutaraldeído. Alternativamente, a BSA (2,5 mg/ml) foi modificada por diferentes sistemas de oxidação: i) peroxinitrito (1mM) em pH 5,4 (tampão acetato 150 mM) e 7,4 (tampão fosfato 150 mM); ii) MPO (13 unidades/ml)/ H₂O₂ (1mM) e iii) HRP (13 unidades/ml)/ H₂O₂ (1mM). Os sistemas com as peroxidases foram incubadas em pH 5,4 (150 mM de tampão acetato) em presença e ausência de nitrito (100 µM) por uma hora a 37°C. A H₂O₂ foi adicionada em três pulsos.

As proteínas foram submetidas a separação por SDS-PAGE em um gel de poliacrilamida (10%) sob condições redutoras e, posteriormente, transferida para membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences, UK limited, England). As proteínas foram coradas com Ponceau. As membranas foram pré-incubados com 5% de caseína e incubadas durante a noite com sobrenadante do meio de cultura com pH corrigido para aproximadamente 7,4 ou com o líquido ascítico contendo anticorpo anti-DOPA. No caso do líquido ascítico contendo o anticorpo anti-DOPA, a incubação do anticorpo primário foi durante a noite. Tanto o tampão de amostra como o tampão TBST (0,01%) o qual foi usado na solução de bloqueio, diluição do anticorpo primário e lavagens continham SMB (10⁻³ M). Por fim, as membranas foram lavadas e incubadas por mais uma hora com anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:1000) em TBST (0,01%) sem SMB e revelado com KIT de ECL (quimioluminescência acentuada por luminol) (Amersham Biosciences, UK limited, England).

3.8 Parasitos e Infecção

As formas amastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269) foram obtidas das lesões das patas de camundongos BALB/c como já descrito (Giorgio e col., 1998). Resumidamente, as patas de camundongos infectados por 6 semanas foram retiradas e maceradas delicadamente em 5 ml de solução salina (0,9%) estéril contendo 25 µg/ml de

gentamicina. O macerado foi filtrado com auxílio de uma gaze. O filtrado foi centrifugado a 1000 rpm por 5 min e o sedimento contendo os parasitos foi ressuspensado em um mesmo volume da solução salina. Esse procedimento de lavagem foi repetido por mais duas vezes. O número de amastigotas foi estimado em um hemocitômetro e após nova lavagem, os parasitos foram ressuspensos delicadamente em solução de SFB contendo 3% (DMSO) (v/v). Aliquotas de 1,5 ml da solução foram então congeladas. Inicialmente, foram resfriadas por 1 hora a 4 °C, congeladas por 1 hora a -20 °C e então mantidas durante a noite a -80°C. Finalmente as amostras foram mantidas em nitrogênio líquido até seu uso. O descongelamento dos parasitos consistiu em descongelar as amostras diluídas em 30-40 ml de meio DMEM ("Dulbecco's Modified Eagle Medium", meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco) por 30 min. A solução foi centrifugada e os parasitos foram suspensos em um volume desejado de DMEM contendo 10% SFB (v/v). Os amastigotas foram então utilizados dentro de 4 horas. Durante o processo de congelamento e de descongelamento a perda de parasitas foi de 50-60%.

a) Ativação e infecção de macrófagos em cultura

Os macrófagos de camundongos da linhagem murina J774 foram cultivados em DMEM contendo 10% de SFB (v/v). Os fagócitos foram mantidos em lamínula durante a noite para adesão (densidade de 2×10^5 células/ml). As células foram tratadas com LPS (1 µg/ml) /INF- γ (100 U/ml) e 7 horas após o início da ativação os macrófagos foram infectados com amastigotas. A relação parasito/macrófago foi de 10/1. Após 17 horas da infecção, as células foram lavadas com 0,5 ml de PBS (três vezes por 5 min). Para análise de microscopia óptica comum, as lamínulas foram fixadas com 1 ml de metanol por 10 min, secas, coradas com Giemsa por 15 min, lavadas com água e montadas (Giorgio e col., 1998). Para análise em microscopia de imunofluorescência, as lamínulas foram fixadas com paraformaldeído 4% durante a noite a 4°C e então lavadas com PBS (três vezes de 10 min) e reveladas com anticorpos como descrito abaixo. A viabilidade celular dos fagócitos foi rotineiramente determinada diluindo-se as células 1:1 (v/v) com solução de azul de tripan.

b) Isolamento e ativação de neutrófilos humanos

Os neutrófilos humanos foram isolados do sangue (10 ml) coletado em heparina (1000 unidades/ml) de voluntários saudáveis. O sangue foi diluído em igual volume de PBS estéril, homogeneizado lentamente e colocado delicadamente sob solução de Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech., Uppsala, Sweden). As amostras foram centrifugadas por 20 min a 2500 rpm. Após esse período as camadas contendo plaquetas e monócitos foram desprezadas. Ao sedimento vermelho contendo os eritrócitos e neutrófilos foi adicionado 20 ml de solução estéril de Dextran 5% preparada em salina (0,9%). A mistura foi incubada por 45 min em gelo. O sobrenadante contendo os neutrófilos foi então recolhido e centrifugado por 5 min a 2500 rpm. O sedimento de células foi suspenso com água gelada (10 ml) por 1

min com posterior adição de 10 ml de salina. A solução contendo os neutrófilos foi lavada com PBS por duas vezes e finalmente as células foram mantidas em meio de cultura DMEM contendo 10 % de SFB. O número de células foi estimado com solução de Turk 5%. Os neutrófilos foram utilizados 1 hora após o isolamento.

A ativação dos neutrófilos (2×10^5 células /ml) foi realizada com a adição de PMA (500 ng/ml) ao meio de cultura em presença e ausência de nitrito de sódio (100 μ M). Os fagócitos foram mantidos em estufa de CO₂ 5% por 1 hora. Alternativamente, os neutrófilos (2×10^5 células /ml) foram lavados com PBS e posteriormente, tratados com peroxinitrito (1mM) em pH 5,4 (tampão acetato 150 mM) e 7,4 (tampão fosfato 150 mM) por 5 min. Após as incubações as células foram lavadas com PBS estéril (três vezes por 5 min) e fixadas com paraformaldeído 4% durante a noite a 4°C e então lavadas com PBS (três vezes de 10 min). Os neutrófilos foram mantidos durante a noite sob lamínulas pré-tratadas com poli-L-lisina (1 mg/ml) para adesão. A revelação com anticorpo foi realizada como descrito abaixo.

c) Microscopia de imunofluorescência comum

As células fixadas com paraformaldeído 4% foram lavadas com PBS e bloqueadas por 40 min, a temperatura ambiente com a mesma solução contendo BSA 3% e saponina 0,1%. No caso dos neutrófilos, após o bloqueio, as células foram tratadas por 2 hora com SFB. As lamínulas foram então incubadas com o anticorpo monoclonal anti-DOPA (diluído 1/1 com PBS) por 1 hora a temperatura ambiente, lavadas com PBS (três vezes por 10 min) e reveladas com anti-IgG de camundongo conjugado com FITC (d 1/200) por 50 min a temperatura ambiente. Após nova lavagem (três vezes por 10 min) as lamínulas foram tratadas em iguais tempos de incubação com o anticorpo poli-clonal de ovelha anti-nitrotirosina e reveladas com anti-IgG de ovelhas conjugados com rodamina. A diluição desses anticorpos foi a recomendada pelos fabricantes. O material genético foi marcado com DAPI. As lamínulas foram então lavadas com PBS (três vezes de 10 min), as lâminas montadas e examinadas em um microscópio Olympus BX 40 acoplado a um sistema de imunofluorescência Olympus TH3 modelo BX-FLA.

c) Infecção de animais

Camundongos fêmeas BALB/c e Black (C57B1/6) de seis semanas foram infectados via subcutânea com 2×10^6 amastigotas. Após seis semanas de infecção, os animais foram anestesiados e as patas retiradas para as análises cromatográficas por HPLC e para microscopia de imunofluorescência confocal (Linares e col., 2001).

d) Análise cromatográfica por HPLC dos homogenatos das lesões cutâneas induzidas por *L. amazonensis*

Camundongos infectados com *L. amazonensis* por 6 semanas foram sacrificados por deslocamento cervical e as suas patas retiradas, dissecadas, pesadas e homogeneizadas em tampão acetato de sódio 10 mM, pH 6,5, contendo 0,5% de triton X-100 e 100 μ M de

desferoxamina. O homogenato foi centrifugado a 10000 rpm por 10 min a 4 °C para a retirada de *debris* teciduais. Uma alíquota do sobrenadante foi utilizada para a determinação da concentração de proteínas totais; outra alíquota foi removida e precipitada com 10% de TCA (ácido tricloro acético). O restante do sobrenadante original foi tratado com pronase (concentração final de 0,33 mg/ml) por 18 horas a 50 °C (Hensley e col., 1997). A solução digerida enzimaticamente foi tratada com o dobro de seu volume com TCA 10 % e centrifugada a 10000 rpm por 10 min a 4°C. Os sobrenadantes foram filtrados e analisados por HPLC.

A análise de DOPA e tirosina das amostras dos tecidos de camundongos infectados foi realizada por HPLC acoplado a um sistema de detecção eletroquímica ESA (Chelmsford, MA), modelo 5200 equipado com dois canais eletroquímicos composto por eletrodos porosos de grafite arranjados em série e selecionados em potenciais específicos (240 mV para detecção de DOPA e 650 mV para tirosina) (Hensley e col., 1997). Para a separação utilizamos uma coluna de fase reversa, Supelcosil LC-18S (4,5 x 250 mm) e fase móvel contendo 50 mM acetato de sódio/ 50 mM citrato/ 8% metanol (v/v) (pH 3,1) (Hensley e col., 1997). O fluxo utilizado foi de 0,6 ml/min. A identificação de DOPA e tirosina das amostras foi validada por experimentos de co-eluição e a quantificação realizada utilizando-se curvas padrão de cada composto.

e) Microscopia de imunofluorescência confocal

Os cortes das patas embebidos em parafina foram obtidos como já descrito (Giorgio e col., 1998). Os cortes foram revelados com os anticorpos anti-DOPA (diluído 1/1 em PBS) e anti-nitrotirosina como descrito acima. As amostras foram examinadas em um sistema confocal da BioRad 1024-UV acoplado a um microscópio da Zeiss Axiovert 100.

3.9 Determinação do acúmulo de nítrito

O acúmulo de nítrito e nitrato no meio de cultura foi determinado fotometricamente com o KIT da Cayman que é baseado no método de Griess (Green e col., 1982). A determinação da concentração foi realizada por comparação com curvas padrão obtidas a partir de concentrações conhecidas de nítrito e nitrato de sódio.

RESULTADOS

4.1. Estudos da oxidação do urato pelo peroxinitrito

4.1.1. Estudos cinéticos

O urato tem sido considerado um importante seqüestrador do peroxinitrito (Kooy e col., 1994; Whiteman e Halliwell, 1996; Daiber e col., 1999, Scott e Hooper, 2001), porém a constante bimolecular de sua reação com o peroxinitrito até o início de nossos estudos ainda não havia sido determinada. Inicialmente, acompanhamos as mudanças no espectro de UV do urato causado pela oxidação deste composto pelo peroxinitrito. Notamos uma diminuição da absorbância em 290 nm e um deslocamento batocrômico na absorção em 248 nm (Fig. 1), sugerindo uma clivagem do núcleo pirimidínico do urato, semelhante àquele descrito para a 8-oxo-dG (Uppu e col., 1996). Posteriormente, demonstramos por estudos de cinética rápida a reação entre o urato e o peroxinitrito através da aceleração da decomposição do peroxinitrito em 340 nm na presença de urato (Fig. 2). O decaimento do peroxinitrito apresentou uma cinética de pseudo-primeira ordem e o gráfico obtido da constante aparente de pseudo-primeira ordem (k_{obs}) em função de concentrações crescentes de urato resultou em uma constante bimolecular aparente de $4,8 \pm 0,1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ a pH 7,3 e $37 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ (Fig. 2). Esse valor da constante deve ser considerado uma boa estimativa já que usamos concentrações limitadas de urato devido sua baixa solubilidade em soluções aquosas (ver Materiais e Métodos). O perfil de pH que obtivemos a partir do gráfico de k_{obs} em função do pH (Fig. 2, inserto) apresentou um ponto de inflexão de 6,8 que corresponde aos valores de pK_a determinados para o ácido peroxinitroso (Esquema 2) (Kissner e col., 1997). Este resultado indica a reação direta entre o monoânion urato e o ácido peroxinitroso já que o pK_{a1} do ácido úrico é 5,4 (Simic e Janovic, 1989).

Na figura 2, o intercepto do gráfico obtido a partir da regressão linear resultou em um maior valor de k_{obs} para a decomposição do peroxinitrito na ausência de substrato do que o valor que medimos de $0,9 \pm 0,1$ (Fig. 2) e que está de acordo com outros valores encontrados na literatura (Pryor e col., 1994). Esse comportamento cinético já havia sido reportado anteriormente e tem sido atribuído a reação do substrato com o peroxinitrito por processos que são de primeira ordem no peroxinitrito e ambos primeira e zero ordem no substrato (Pryor e col., 1994). De fato, as oxidações mediadas pelo peroxinitrito são processos complexos e podem ocorrer via um ou dois elétrons e envolvem diferentes formas do oxidante que coexistem em pHs fisiológicos (ver, Introdução e Esquema 1).

4.1.2. Formação de radicais livres

Estudos prévios de captação de *spin* utilizando DMPO demonstraram que o tratamento do plasma humano com peroxinitrito produz um radical livre derivado do ácido

Figura 1. Efeito do peroxinitrito no espectro de absorção de UV do urato ($50 \mu\text{M}$). As concentrações de peroxinitrito adicionadas foram: a = nada, b = $100 \mu\text{M}$, c = $150 \mu\text{M}$, d = $200 \mu\text{M}$. As incubações foram realizadas em tampão fosfato ($0,3 \text{ M}$, $\text{pH } 7,4$, contendo $0,1 \text{ mM}$ de DTPA) à temperatura ambiente.

Figura 2. Constantes de pseudo-primeira ordem para a reação entre o peroxinitrito e o urato em função da concentração do urato. A concentração inicial de peroxinitrito foi de 0,3 mM. As reações foram feitas em tampão fosfato 300 mM, pH 7,3, contendo DTPA (0,1 mM) a 37 °C. O inserto mostra a dependência do k_{obs} pelo pH, a 37 °C. A mistura de reação continha peroxinitrito (0,3 mM), urato (2 mM) e DTPA (0,1 mM) em tampão fosfato (300 mM) em vários pHs.

úrico (Vásquez-Vivar e col., 1996). Investigamos mais detalhadamente a formação desse radical em tampão fosfato .

A incubação do urato com o peroxinitrito em presença de DMPO permitiu a detecção de um espectro de EPR composto basicamente por dois radicais adutos: o aduto de DMPO/OH composto de quatro linhas ($a_N = 1,49$ mT; $a_H = 1,49$ mT) (Li e col., 1988) e o aduto de espectro composto por seis linhas característico de DMPO/radical derivado de átomo de carbono ($a_N = 1,56$ mT; $a_H = 1,95$ mT) (Fig. 3). Este radical aduto corresponde a um produto de oxidação do urato, pois é detectável apenas em sua presença (Fig. 3D). O aduto DMPO/OH é produzido pela reação do DMPO com o radical hidroxila proveniente da decomposição espontânea do peroxinitrito (ver, Introdução e Esquema 2). Além disso, o DMPO/OH é detectável apenas em presença de agentes redutores como glutatona (Daiber e col., 1999; Pryor e col., 1994; Augusto e col., 1994) ou, como exemplificado aqui, na presença do ácido úrico (Fig. 3D). O rendimento do radical aumentou com a concentração de urato e do peroxinitrito e atingiu um máximo na condição em que havia duas vezes de excesso molar do peroxinitrito em relação ao ácido úrico (ver, por exemplo, Fig. 3B). Nas condições experimentais da Fig. 3, o aumento da adição de peroxinitrito em até 10 mM, não alterou o espectro de EPR mostrado na Fig 3C (dado não mostrado). O rendimento do radical aduto derivado do ácido úrico aumentou com o pH e a curva sigmoideal obtida mostrou um ponto de inflexão de 7,1 (Fig. 4).

A adição do par de dióxido de carbono/bicarbonato nas concentrações de 1 e 10 mM inibiu o rendimento do radical aduto DMPO/urato nas mesmas condições utilizadas na Fig. 3B em 10 e 80%, respectivamente (dados não mostrados).

A detecção por EPR de fluxo contínuo de um radical livre derivado da oxidação do urato por HRP já havia sido previamente demonstrado (Maples e Mason, 1988). Neste caso o radical formado reage lentamente com o oxigênio (Simic e Janovic, 1989; Maples e Mason, 1988) e parece ser diferente do radical que detectamos nas incubações do urato com o peroxinitrito pois o aduto com DMPO tem parâmetros de EPR que são consistentes com um radical centrado em um átomo de carbono deficiente em elétrons (Fig. 3) (Vásquez-Vivar e col., 1996). Além disso, a oxidação do urato pelo peroxinitrito é acompanhada por um rápido consumo de oxigênio (Fig. 5), indicando que o radical formado reage com o oxigênio. A quantidade total de oxigênio consumido é proporcional à concentração de peroxinitrito e atinge um máximo de 10% da concentração inicial do oxidante (Fig. 4, inserto e Fig. 5). Os efeitos similares no perfil de pH obtidos na formação de radicais e no consumo de oxigênio (Fig. 4) indicam, assim, que esses dois processos ocorrem paralelamente. Contudo, tanto a formação de radicais quanto o consumo de oxigênio aumentam com o pH (Fig. 4), enquanto que os valores de k_{obs} diminuem nessa condição (Fig. 2, inserto). Estes resultados indicam

que o radical livre produzido na oxidação do urato pelo peroxinitrito deve ser uma espécie reativa, porém, não deve ser formado pela reação direta entre o urato e ácido peroxinitroso.

4.1.3 Efeito do urato na propagação da lipoperoxidação iniciada pelo peroxinitrito

O radical derivado da oxidação do ácido úrico pelo peroxinitrito reage com o oxigênio (Fig. 4, inserto; Fig. 5) e consequentemente pode propagar reações de radicais livres. Para testar essa possibilidade, nós examinamos a habilidade do urato em elevar a oxidação iniciada pelo peroxinitrito em lipossomas e LDL humana. Como previamente reportado (Thomas e col., 1998; Radi e col., 1991; Darley-Usmar e col., 1992), a exposição de lipossomas (Fig. 6) e LDL humana (Fig. 7) ao peroxinitrito resultou na oxidação dessas partículas. A extensão da oxidação foi dependente da concentração do oxidante como indicado pela formação de hidroperóxidos lipídicos e TBARS (Fig. 6 e 7). O rendimento dos produtos de oxidação lipídica foi maior na LDL que nos lipossomas, porém o peroxinitrito teve um efeito similar no aumento da formação de hidroperóxidos lipídicos e TBARS nesses sistemas (Fig. 6 e 7). Na presença de urato (0,5 mM), a geração de produtos de oxidação lipídica tanto nos lipossomas (Fig. 6) como na LDL (Fig. 7) foi elevada em quase duas vezes. Um efeito inibitório do urato foi observado apenas nas incubações contendo LDL e em concentrações equimolares de ácido úrico e peroxinitrito (Fig. 7), condição em que há baixos rendimentos do radical derivado do ácido úrico (Fig. 3).

De fato, o radical derivado do ácido úrico deve ser a espécie responsável pelo o aumento na oxidação de lipídios promovido pelo urato pois seu efeito foi inibido pelo DMPO e pelo par dióxido de carbono/ bicarbonato (Fig. 6, inserto; Fig. 7, inserto). O DMPO atua como seqüestrador do radical derivado do ácido úrico (Fig. 3) enquanto o CO₂ inibe sua formação (Esquema 2).

Figura 3. Espectros de EPR dos radicais adutos de DMPO obtidos durante a oxidação do urato pelo peroxinitrito. As misturas de incubação continham urato (3 mM), DMPO (40 mM) e DTPA (0,1 mM) em tampão fosfato, pH 7,4, com: (A) 0,8 mM de peroxinitrito; (B) 3 mM de peroxinitrito; (C) 6 mM de peroxinitrito; e (D) mesmo que (A), mas na ausência de urato. Os componentes dos espectros estão marcados (●) aduto de DMPO/OH e (○) aduto de DMPO/radicais derivados do urato. Condições instrumentais: potência da microondas, 20 mW; constante de tempo 0,5 s; velocidade de varredura 0,05 mT/s; amplitude de modulação 0,1 mT; ganho, 8×10^5 .

Figura 4. Efeito do pH no rendimento do radical aduto DMPO/radical derivado do urato produzido durante a oxidação do urato pelo peroxinitrito. As incubações continham urato (1 mM), DMPO (40 mM), DTPA (0,1 mM) e peroxinitrito (0,8 mM) em tampão fosfato em vários pHs. As condições instrumentais são as mesmas descritas na Fig. 3, exceto o ganho que foi mudado dependendo do tamanho do sinal. As medidas da altura do pico correspondem ao primeiro pico do radical aduto DMPO-radical urato e são expressas como unidades arbitrárias (u. a.). O inserto mostra o efeito do pH na quantidade total de consumo de oxigênio nas incubações contendo urato (1 mM), DTPA (0,1 mM) e peroxinitrito (0,8 mM) em tampão fosfato (300 mM) em vários pHs a 30 °C. Todos os dados representam a média $\pm$ DP de três experimentos independentes.

Figura 5. Consumo de oxigênio durante a oxidação do urato pelo peroxinitrito. As incubações de urato (2mM) em tampão fosfato, pH 7,4 e contendo DTPA ($0,1\ \text{mM}$) a 30°C receberam a adição nos pontos indicados: (A) $0,4\ \text{mM}$ de peroxinitrito e (B) $0,8\ \text{mM}$ de peroxinitrito.

Figura 6. Efeito do urato na oxidação de lipossomos iniciada pelo peroxinitrito. Os lipossomos (2,5 mg/ml) em tampão fosfato (0,1 mM), pH 7,4, foram incubados com diferentes concentrações de peroxinitrito por 5 min a 37 °C na presença (○) e na ausência (●) de urato (0, 5 mM). O inserto mostra a formação de TBARS em incubações similares de lipossomos (2,5 mg/ml) com peroxinitrito (1 mM) e urato (0,5 mM) na presença e na ausência de bicarbonato (8 mM) e DMPO (40 mM). O controle e a adição reversa correspondem aos lipossomos sem nenhuma adição e ao peroxinitrito decomposto por 10 min em tampão com a posterior adição do lipossomo e urato, respectivamente. Todos os dados representam a média $\pm$ DP de três experimentos independentes.

Figura 7. Efeito do urato na oxidação da LDL humana iniciada pelo peroxinitrito. A LDL (0,5 mg/ml) em tampão fosfato (0,1 mM), pH 7,4, foi incubada com diferentes concentrações de peroxinitrito por 15 min a 37 °C na presença (○) e na ausência (●) de urato (0, 5 mM). O inserto mostra a formação de TBARS em incubações similares de LDL (0,5 mg/ml) com peroxinitrito (1 mM) e urato (0,5 mM) na presença e ausência de bicarbonato (8 mM). O controle e a adição reversa correspondem a LDL sem nenhuma adição e ao peroxinitrito decomposto em tampão por 10 min com posterior adição da LDL e urato, respectivamente. Todos os dados representam a média $\pm$ DP de três experimentos independentes.

4.1.4 Identificação dos produtos de oxidação do urato

O efeito do urato em propagar as oxidações iniciadas pelo peroxinitrito em lipossomas e LDL humana nos estimulou a caracterizar a estrutura do radical derivado do ácido úrico. Os dados de EPR associados à captação de *spin* do radical (Fig. 3) não são inequívocos já que há mínimas diferenças nos parâmetros de diferentes adutos de DMPO com radicais centrados em átomos de carbono (Li e col., 1988). Utilizamos outros captadores de *spin*, contudo nenhum dos outros captadores utilizados (POBN (α -(4-piridil-1-óxido)-*N*-*tert*-butilnitrona), PBN (*N*-*tert*-butil- α -fenilnitrona) e DNBBS) resultou em adutos estáveis nas incubações contendo urato e peroxinitrito. Assim, isolamos os adutos de DMPO das incubações contendo urato (3mM) com peroxinitrito (6mM) pela extração com benzeno e análise por HPLC como descrito em Materiais e Métodos. A Fig. 8, inserto, mostra o cromatograma de HPLC obtido. O pico com o tempo de retenção de 23,4 min era ausente nas misturas de incubação controle e consequentemente foi coletado e submetido à espectrometria de massa. O espectro de massa obtido revelou os picos m/z de 158 ($[M + H]^+$) e m/z 142 ($[M + H - NH_2]^+$), que são consistentes com o aduto de DMPO/aminocarbonila (Fig. 8).

Outra confirmação da estrutura do radical aduto foi obtida pela incubação contendo formamida (750 mM) e sistema de Fenton (5 mM de peróxido de hidrogênio/ 1mM de ferro(II)-EDTA) na presença de 40 mM de DMPO. Esta mistura de incubação produziu um espectro de EPR similar ao mostrado na Fig. 3 e também composto por dois radicais adutos, DMPO-OH e DMPO-aminocarbonila. Os parâmetros de EPR desse último radical aduto ($a_N = 1,56$ mT; $a_H = 1,95$ mT) foram os mesmos que os determinados para o aduto produzido na incubações de peroxinitrito (Fig. 3), confirmando, assim, a produção do radical aminocarbonila em ambos os sistemas de oxidação.

Numa tentativa de elucidar as possíveis rotas de produção do radical aminocarbonila durante a oxidação do urato pelo peroxinitrito, examinamos a possível produção desse mesmo radical por outros oxidantes. Contudo, nenhuma das incubações contendo urato (3mM) com sistema de Fenton (5 mM de peróxido de hidrogênio/ 1mM de ferro(II)-EDTA), 40 μ M de HRP / 3mM de peróxido de hidrogênio, e ácido hipocloroso (6mM) produziram o aduto DMPO/aminocarbonila. Posteriormente, verificamos se a oxidação de outras purinas gerava o mesmo radical que o urato. De todas as purinas testadas, guanina, 8-oxoguanina, adenina, xantina e hipoxantina, apenas a 8-oxoguanina produziu um radical aduto similar ($a_N = 1,56$ mT; $a_H = 1,95$ mT) (dados não mostrados), indicando que o carbono oxidado na posição 8 da purina é importante para a produção do radical.

Finalmente, investigamos a formação de outros produtos da reação entre o urato e o peroxinitrito. As incubações contendo urato (3 mM) e peroxinitrito (6mM) em tampão fosfato, pH 7,8 foram submetidas à análise por HPLC e monitorada por espectrometria de massa

como descrito em Materiais e Métodos. O cromatograma de fluxo total de íons revelou quatro picos principais, sendo o último atribuído ao próprio urato (ca. de 18% da concentração inicial de urato). Os picos 1, 2 e 3 foram atribuídos como sendo os principais produtos de oxidação do urato em rendimentos de ca. 16, 30 e 28%, respectivamente (dados não mostrados). Dois desses produtos foram identificados pelo espectro de massa correspondente. O primeiro pico apresentou fragmentos no espectro de massa de m/z 159 ($[M+H]^+$) e m/z 143 ($[M+H - NH_2]^+$) e foi atribuído à alantoína. O segundo pico foi atribuído à aloxana devido aos fragmentos m/z 143 ($[M + H]^+$) e m/z 165 ($[M+H+Na]^+$) enquanto o terceiro pico deve corresponder a um composto de baixo peso molecular que não conseguimos identificar. A alantoína é o principal produto de oxidação do ácido úrico formado por diversos oxidantes enquanto que a aloxana tem sido identificada por oxidações mediadas por peroxidases e por oxidação eletroquímica (Goyal e col, 1982; Volk e col., 1989).

Figura 8. Espectro de massa com ionização por *electrospray* no modo positivo do radical aduto obtido durante a oxidação do urato pelo peroxinitrito. O inserto mostra o cromatograma de HPLC da incubação contendo urato (3 mM), DMPO (40 mM) e peroxinitrito (6 mM) em tampão fosfato (0,1 mM, pH 7,4) à temperatura ambiente. O pico com tempo de retenção de 23,4 min corresponde ao composto cujo o espectro de massa é mostrado na figura. As condições instrumentais foram as descritas em Materiais e Métodos.

4.2 Estudos da oxidação da tirosina pelo peroxinitrito

4.2.1 Análise de produtos oxidados e nitrados da tirosina

Vários estudos na literatura haviam descrito 3-nitrotirosina e 3,3-bitirosina como os principais produtos da modificação da tirosina pelo peroxinitrito (Pfeiffer e Mayer, 1998; MacMillan-Crow e Thompson, 1999; Lyman e col., 1996; van der Vliet e col., 1995). Contudo, a maioria desses trabalhos foi realizada em pH neutro no qual há baixos rendimentos do radical hidroxila a partir da homólise do peroxinitrito (Merényi e Lind, 1997; Richeson e col., 1998; Coddington e col., 1999) e em condições cromatográficas que não são adequadas para a detecção de 3-hidroxitirosina (DOPA). Alterando as condições de HPLC, conseguimos detectar DOPA em incubações contendo peroxinitrito (1mM) e tirosina (2mM) em pH 5,4 (Fig. 9). O composto foi identificado por comparação de seu tempo de retenção e espectro de UV com àqueles de um padrão autêntico submetido as mesmas condições cromatográficas (Fig. 9). Como já reportado na literatura (MacMillan-Crow e Thompson, 1999; Lyman e col., 1996; van der Vliet e col., 1995), também conseguimos detectar a 3-nitrotirosina em pH 5,4. É importante relatar que o DOPA já havia sido previamente identificada em hidrolizados de albumina pré-tratado com peroxinitrito em pH 6,4 na ausência de adição do par de dióxido de carbono/bicarbonato (Hensley e col., 1997).

A Tabela 1 mostra os resultados referentes à produção de 3-nitrotirosina e DOPA em diferentes condições experimentais. Como esperado (Lyman e col., 1996), a 3,3-bitirosina (tempo de retenção de 15,5 min) também foi detectada em pH 7,4 e seu rendimento aumentou cerca de duas vezes na presença de dióxido de carbono /bicarbonato (dados não mostrados). O rendimento obtido de 3-nitrotirosina (Tabela 1) foi similar, mas um pouco acima dos valores descritos na literatura (Pfeiffer e Mayer, 1998; van der Vliet e col., 1995). Alguns fatores são responsáveis por essas diferenças: i) contaminação de nitrito a partir da síntese e/ou decaimento do peroxinitrito (Coddington e col.), 1999); ii) contaminação de dióxido de carbono presente nos reagentes e nos tampões utilizados (Richeson e col., 1998; Lyman e col., 1996). Considerando esses problemas intrínsecos quando se trabalha com o peroxinitrito, a discrepância entre os valores obtidos para a nitração da tirosina pelo peroxinitrito por diferentes grupos de pesquisa é pequena, não afetando as principais conclusões sobre os dados experimentais.

TABELA 1. Efeito do par dióxido de carbono/bicarbonato (25 mM) na formação de 3-nitrotirosina e DOPA produzidos durante a incubação contendo tirosina (2 mM) e peroxinitrito (1 mM) a pH 5,4 e 7,4^a

Condições	DOPA (μM)	3-nitrotirosina (μM)
pH 5,4	$6,0 \pm 0,3$	$24,1 \pm 4,5$
pH 5,4 + $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$	$2,2 \pm 0,5$	$60,1 \pm 5,0$
pH 7,4	ND ^b	$82,6 \pm 2,7$
pH 7,4 + $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$	ND	$162,8 \pm 5,2$

^a As misturas de reação foram incubadas e analisadas por HPLC como descrito em Materiais e Métodos; os tampões acetato ou fosfato (0.15 M) foram usados para os pH 5,4 e 7,4, respectivamente. Os valores correspondem à média $\pm$ SD de três experimentos independentes. Nas incubações à pH 7,4, o produto 3,3-ditirosina também foi detectado como descrito no texto.

^b Não detectável.

4.2.2 Detecção do radical tirosila

A mistura em fluxo de tirosina (1,85 mM) em presença de bicarbonato (25 mM) com peroxinitrito em pH 7,4 levou a detecção do espectro de EPR ($a^{\text{H}}_{2,6} = 6.3 \text{ G}$; $a^{\text{H}}_{3,5} = 1.5 \text{ G}$; $a^{\text{H}}_{\beta} = 15 \text{ G}$) (Fig. 10) característico do radical tirosila (McCormick e col., 1998; Sealy e col., 1985). A intensidade do sinal de EPR obtido durante a oxidação da tirosina pelo peroxinitrito é fraco (Fig. 10A), porém é comparável aos obtidos por EPR direto da mistura da tirosina com outros oxidantes tais como permanganato e HRP/ H_2O_2 (McCormick e col., 1998; Sealy e col., 1985). Para compararmos o rendimento de radical mais precisamente, as condições instrumentais foram alteradas, produzindo espectros menos resolvidos, porém mais intensos (Fig. 10B-E). Na presença do par dióxido de carbono/bicarbonato, o radical tirosila foi claramente detectado nos pHs 7,4 e 5,4, sendo que o rendimento de radical foi cerca de duas vezes maior em pH 7,4 do que a pH 5,4 (Fig. 10B, 10D). Tanto a oxidação facilitada da tirosina em pHs mais alcalinos (Prütz e col., 1985) bem como a quantidade de radical carbonato gerado pelo decaimento do peroxinitrito (1,6 vez mais rápido em pH 7,4 que em pH 5,4; ver Materiais e Métodos) são, provavelmente, os principais fatores responsáveis por essas diferenças de rendimento nos diferentes pHs.

O radical tirosila foi fracamente detectável na ausência do par dióxido de carbono/bicarbonato mesmo em pH 7,4, condições nas quais a quantidade formada de 3-

nitrotirosina foi considerável (Tabela 1). Esse fato deve ser consequência da baixa produção de radical hidroxila (ver, Materiais e Métodos) que não produz radicais tirosila em concentrações transientes suficientemente altas para ser detectável por EPR diretamente. Numa tentativa de resolver esse problema, usamos a técnica de captação de *spin* que mede radicais acumulados e não concentrações transientes.

A incubação de tirosina (2 mM) com peroxinitrito (1 mM) na presença de DNBBS levou a detecção de um espectro de EPR (a_N 13,6 G) (Fig. 11) consistente com o radical-aduto DNBBS-tirosila (Gunther e col., 1995; Gunther e col., 1998). O radical-aduto foi fracamente detectável em pH 5,4 na ausência do par carbonato/bicarbonato (Fig. 11A), mas o foi claramente em todas as outras condições experimentais testadas (Fig. 11B-D). Em todos os casos, o rendimento do radical-aduto DNBBS-tirosila (Fig. 11) correlacionou-se com os rendimentos de 3-nitrotirosina (Tabela 1); esse fato estabelece o radical tirosila como precursor da formação da 3-nitrotirosina.

Figura 9. Cromatograma de HPLC representando a separação da mistura de incubação contendo tirosina (2 mM), bicarbonato (25 mM) e peroxinitrito (1 mM) em tampão acetado de sódio, pH 5,4, à temperatura ambiente. A separação cromatográfica foi realizada como descrito em Materiais e Métodos. O inserto mostra o espectro fotodiodo de UV do pico de tempo de retenção 7,5 min.

Figura 10. Espectro de EPR em fluxo contínuo do radical tirosila produzido a partir da mistura de peroxinitrito (2 mM) e tirosina (3,7 mM) com bicarbonato (50 mM) em tampão fosfato (0,3 M): (A) pH 7,4, amplitude de modulação 1 G; (B) o mesmo que em (A) mas com 2 G de amplitude de modulação; (C) pH 7,4, na ausência de bicarbonato; (D) pH 5,4; (E) pH 5,4, na ausência de bicarbonato. A concentração final de peroxinitrito, tirosina, bicarbonato e tampões foram 1; 1,85; 25 e 150 mM, respectivamente. Condições instrumentais: frequência do microondas, 2mW; constante de tempo 81,9 ms; amplitude de modulação foi 2 G, exceto para (A) que foi 1 G; ganho 2×10^6 . Cada espectro representa o acúmulo de 21 varreduras.

Figura 11. Espectro de EPR do radical-aduto DNBBS-tirosila obtido a partir da incubação de tirosina (2mM), DNBBS (20 mM) e peroxinitrito (1mM) em tampão fosfato ou acetato (150 mM): (A) pH 5,4; (B) pH 5,4 em presença de bicarbonato (25 mM); (C) pH 7,4; (D) pH 7,4 na presença de bicarbonato (25 mM). Condições instrumentais: potência da microondas, 20 mW; amplitude de modulação 1G; constante de tempo 655,4 ms; ganho 2×10^5 .

4.3. Proteínas nitradas e hidroxiladas como biomarcadores de peroxinitrito?

A atividade microbicida do $\cdot\text{NO}$ tem sido demonstrada contra uma variedade de patógenos intracelulares, incluindo-se a *Leishmania*, *Salmonella*, *Toxoplasma* e micobactéria (para uma revisão ver Fang, 1997). Uma vez que o $\cdot\text{NO}$ *per se* é um radical livre pouco reativo, sua ação parece depender de produtos dele derivados como o peroxinitrito (Esquema 1). Os estudos descritos em 4.2, nos levaram a testar a possibilidade de utilizar a detecção de proteínas nitradas e hidroxiladas como biomarcadores de peroxinitrito *in vivo*. O modelo utilizado foi a infecção por *L. amazonensis* em camundongos naturalmente suscetíveis (BALB/c) e resistentes (C57Bl/6) que já vinham sendo estudados no laboratório (Giorgio e col., 1998) e em cultura de macrófagos (J774) infectados pela forma amastigota do mesmo parasito.

4.3.1. A detecção de DOPA nas lesões cutâneas induzidas por *L. amazonensis*

Analizamos a formação de DOPA durante a infecção crônica causada por *L. amazonensis* e induzida em camundongos suscetíveis (BALB/c) e resistentes (C57Bl/6). Nossos resultados demonstraram que ocorreu lesão oxidativa com a formação de DOPA nas proteínas totais dos camundongos infectados por 6 semanas (Fig. 12 e 13). Nas condições cromatográficas utilizadas, os compostos DOPA e tirosina correspondem aos picos de tempo de retenção de 7,0 e 9,1 min, respectivamente (Fig. 12). A identificação de DOPA nas amostras foi validada com experimento de co-eluição do composto (Fig. 12B).

A extensão da formação de DOPA em proteínas foi significativamente diferente entre os dois grupos de camundongos, sendo 3 vezes maior em animais resistentes ($63,8 \pm 17,0$ mmol DOPA/mol tirosina) do que em animais suscetíveis ($23,3 \pm 7,1$ mmol DOPA/mol tirosina) após 6 semanas de infecção (Fig. 13).

Quando comparado com os dados da literatura, o valor obtido para animais suscetíveis é, por exemplo, semelhante ao encontrado em catarata avançada ($20,0 \pm 3,3$ mmol DOPA/mol tirosina) (Fu e col., 1998 b) e cerca de 20 vezes maior que a medida em placa aterosclerótica humana (Fu e col., 1998 a). Além disso, a relação foi 70 vezes maior que cultura de células da glia tratadas com IL-1 β (Hensley e col., 1997). As diferenças nos dados reportados refletem as diferenças de estímulos celulares e os diferentes ambientes inflamatórios.

Figura 12. Cromatogramas representativos da separação por HPLC de DOPA presente em hidrolizados de patas de camundongos infectados com *L. amazonensis* por seis semanas: (A) hidrolizado das patas de camundongo C57Bl/6; (B) o mesmo que A com adição de 400nM de DOPA autêntico; (C) hidrolizado das patas de camundongo BALB/c. Para a detecção de DOPA e tirosina foi utilizado o potencial de oxidação de 240 mV e 650 mV, respectivamente.

Figura 13. Níveis de DOPA presente em patas de camundongos infectados com *L. amazonensis* por 6 semanas medidos po HPLC como mostrado na Fig. 12. Os resultados representam a média $\pm$ SD ($n = 3$). A análise estatística foi realizada usando-se o teste t de Student. O grupo dos animais BALB/c foi significativamente diferente ($P < 0,05$) do grupo dos animais C57Bl/6.

4.3.2 Obtenção de anticorpos monoclonais anti-dopa

A detecção de DOPA nas patas dos camundongos por HPLC nos estimulou a desenvolver um anticorpo anti-DOPA.

A obtenção dos anticorpos monoclonais foi realizada a partir da diluição seriada dos hibridomas que responderam positivamente aos testes de ELISA como descrito em Materiais e Métodos. Os testes de atividade do anticorpo foram realizados com o sobrenadante do meio de cultura. É importante ressaltar que apesar dos anticorpos estarem diluídos nesse sobrenadante, o seu uso representa uma vantagem, pois possui várias proteínas (a mais abundante sendo a albumina), que funcionam como agentes bloqueadores de reatividade inespecífica.

Os testes de especificidade e reatividade dos anticorpos monoclonais anti-DOPA foram confirmados por *immunoblotting* (Fig. 14). Como antígeno utilizamos a BSA não modificada bem como a proteína conjugada com DOPA via glutaraldeído (Fig. 14, Tabela 2). As proteínas foram submetidas a SDS-PAGE em condições redutoras e transferidos para uma membrana de nitrocelulose. A incubação da membrana com anticorpos monoclonais anti-DOPA foi fortemente marcada na proteína conjugada com DOPA (Fig. 14). A não reatividade do anticorpo com BSA normal (Fig. 14) demonstra a especificidade do anticorpo obtido.

A especificidade do anticorpo foi também testada em glândula adrenal de camundongos Balb/c por microscopia confocal (Fig. 15). A glândula adrenal possui intensa síntese de catecolaminas principalmente na região medular conhecida como região de células “cromafin” (Carmichael e Winkler, 1985) de forma bem arredondada contendo gotículas de gordura. O anticorpo revelou intensamente a presença de DOPA na região medular (Fig. 15, região central do corte). Na região do cortex (região periférica, com células mais alongadas) houve marcação marginal (Fig. 15).

O anticorpo anti-DOPA foi capaz de reconhecer BSA hidroxilada por diferentes sistemas de oxidação *in vitro* (ver, banda de 68 Kd da BSA, Fig 16). De fato, confirmamos que o peroxinitrito é capaz de hidroxilar proteínas (Fig. 16, linhas 3 e 4). A MPO e HRP também foram capazes de causar uma hidroxilação da BSA, sendo que na presença de nitrito, a hidroxilação foi mais intensa nos dois casos (Fig 16, comparar linhas 5 e 6 e 7 e 8). Os dados obtidos foram consistentes com os obtidos por HPLC (experimentos realizados por Marcelo G. Bonini; dados não mostrados). O anticorpo também revelou outras bandas de proteínas que devem ser produtos de quebra de proteínas (linhas 3, 4 e 5 com as bandas de 60 e 55 Kd) ou ainda a hidroxilação da própria MPO (linha 5, banda de 60 Kd).

TABELA 2. Quantificação de DOPA conjugada a proteínas ^a

Proteína	nmol DOPA/mg proteína ^b
KLH-G-DOPA	7,2 ± 0,6
BSA-G-DOPA	1,1 ± 0,3

^a A quantificação foi determinada pelo teste NBT/glicina como descrito em Materiais e Métodos.

^b Os valores representam a média ± DP descontados os valores da proteína conjugada com glutaraldeído apenas.

Figura 14. Reatividade do anticorpo monoclonal anti-DOPA com BSA nativa (1,5 μg) (linha 1) e BSA conjugada com DOPA (1,5 μg) (linha 2) separadas por SDS-PAGE e reveladas por Western blotting com o anticorpo monoclonal anti-DOPA presente no sobrenadante de meio de cultura (diluição 1/3). A diluição do anticorpo secundário foi de 1/1000 e o tempo de revelação foi de 30 seg.

Figura 15. Microscopia confocal do corte da glândula adrenal de camundongos BALB/c mostrando presença de DOPA na região medular. O DOPA foi marcado pelo anticorpo anti-DOPA (meio de cultura diluído 1/1 em PBS) em verde pelo FITC. Barra, 10 μm .

Figura 16. Reatividade do anticorpo monoclonal anti-DOPA com o padrão de peso molecular (linha 1), BSA nativa (linha 2), BSA modificada por peroxinitrito nos pHs 7,4 e 5,4 (linhas 3 e 4); BSA incubada com MPO/H₂O₂ na presença e ausência de nitrito (100 M) (linhas 5 e 6, respectivamente) e BSA incubada com HRP/H₂O₂ na presença e ausência de nitrito (100 μ M) (linhas 7 e 8). A quantidade total de proteína aplicada foi de 15 μ g. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE e coradas com Ponceau (A); (B) representa a revelação por Western blotting de A com a incubação do anticorpo monoclonal anti-DOPA presente no líquido ascítico (diluição 1/120). A diluição do secundário foi de 1/1000 e o tempo de revelação foi de 10 min.

4.3.3. Co-localização de proteínas hidroxiladas e nitradas nas lesões de camundongos infectados por *L. amazonensis*

Nos estudos em que descrevemos a quantificação de proteínas hidroxiladas nas lesões de camundongos infectados por *L. amazonensis* (Figs. 12 e 13) empregamos HPLC para detectar DOPA nos hidrolisado protéico o que, obviamente, não permite identificar nem localizar as proteínas hidroxiladas. Com o anticorpo anti-DOPA, abriu-se a possibilidade de examinar a localização de proteínas hidroxiladas na lesão.

A análise por microscopia confocal confirmou que as lesões dos camundongos resistentes apresentam extensiva hidroxilação na sexta semana de infecção (Fig. 16A). As proteínas hidroxiladas co-localizaram-se com as proteínas nitradas (Fig. 17 e Fig. 18). A hidroxilação e nitração foram evidentes no citoplasma dos macrófagos, ao redor dos fagolisossomos e nos parasitos (Fig. 17 e Fig. 18). Em contraste, os camundongos suscetíveis apresentaram muito pouca nitração e ausência de hidroxilação na sexta semana de infecção (Fig. 18).

Nos camundongos resistentes, a marcação de proteínas modificadas, apesar de intensa, limitou-se à região dos macrófagos, não atingindo, por exemplo outros tecidos como vasos sanguíneos (Fig. 18A e B). Esse fato confirma a especificidade do anticorpo monoclonal bem como a localização das proteínas modificadas nas regiões infectadas (Figs. 17 e 18).

A utilização do anticorpo anti-MPO não permitiu a detecção da peroxidase nas lesões de camundongos suscetíveis e resistentes em estudos de microscopia confocal (dados não mostrados). O anticorpo que usamos é contra MPO de neutrófilos humanos mas tem sido utilizada para demonstrar por imunoblotting a presença de MPO em macrófagos murinos e de camundongos (Pfeiffer e col., 2001 a e b). Acreditamos que a especificidade do anticorpo deva ser melhor averiguada pois a revelação do *imunoblotting* parece marcar inespecificamente várias bandas de proteínas (Pfeiffer e col., 2001 a e b).

Figura 17. Detecção de proteínas hidroxiladas e nitradas por microscopia confocal das patas de camundongos resistentes (Black) infectados com *L. amazonensis* na sexta semana de infecção. As condições de infecção foram descritas em Materiais e Métodos. (A) proteínas hidroxiladas marcadas em verde pelo anticorpo anti-DOPA (meio de cultura diluído 1/1 em PBS) (B) proteínas nitradas marcadas em vermelho. (C) é a superposição de (A) e (B) indicando a co-localização das duas proteínas em amarelo. (D) é o Normarski do corte mostrando os fagócitos nas lesões com fagolisossomos contendo amastigotas. A fluorescência azul é o material genético marcado por DAPI. As diluições do anticorpo para 3-nitrotirosina e dos anticorpos secundários são aquela recomendadas pelos fabricantes. Barra, 10 μ m.

Figura 18. Comparação da co-localização de proteínas hidroxiladas e nitradas em camundongos resistentes (A e B) e suscetíveis (C e D) na sexta semana de infecção. A marcação e revelação foi como descrito na figura 17. Para a revelação com o anticorpo anti-DOPA foi utilizado meio de cultura diluído 1/1 em PBS. As diluições do anticorpo para 3-nitrotirosina e dos anticorpos secundários são aquela recomendadas pelos fabricantes. Barra, 10 μ m.

4.3.4. Co-localização de proteínas hidroxiladas e nitradas em macrófagos ativados e infectados por amastigotas

Macrófagos murinos J774 previamente ativados por LPS/INF- γ e infectados por 17 horas com amastigotas de *L. amazonensis* exibiram a co-localização de proteínas nitradas e hidroxiladas (Fig. 19B). A presença das proteínas modificadas estendeu-se pelo citoplasma dos fagócitos bem como aos parasitos fagocitados (Fig. 19B). Em contraste, os macrófagos infectados e não ativados exibiram uma nitração marginal e ausência de hidroxilação (Fig. 19D).

A produção de proteínas nitradas e hidroxiladas (Fig. 19B) acompanhou a produção de NO₃⁻ e NO₂⁻ (Tabela 3) e o efeito leishmanicida dos macrófagos (Fig. 13, Tabela 4) (ver abaixo).

Paralelamente, verificamos por imunofluorescência o efeito da ativação de neutrófilos por PMA na produção de proteínas hidroxiladas e nitradas e revelados por anti-DOPA e anti-nitrotirosina (Fig. 20). Interessantemente, nas condições experimentais da Fig. 20, não ocorreram hidroxilação e nitração de proteínas significativamente detectáveis de neutrófilos isolados (2×10^5 células/ml) quando usamos PMA na presença e ausência de nitrito. Como controle positivo da reação de revelação incubamos as células com 1mM de peroxinitrito em pH 5,4 e 7,4 por 5 min (Fig. 20D e H). Esses dados contrastam com os resultados obtidos com os macrófagos (Fig 19) e devem indicar que outros mecanismos são responsáveis pelas hidroxilações e nitrações de proteínas *in vivo* que não os mediados pela MPO.

Assim, as nitrações e hidroxilações presentes nos macrófagos ativados aliado ao fato de que macrófagos não devem possuir MPO, podem representar o envolvimento do peroxinitrito.

Figura 19. Provável co-localização de resíduos de 3-nitrosina e de DOPA em macrófagos J774 infectados por amastigotas de *L. amazonensis*. A relação de amastigotas/macrófagos foi de 10/1. Os fagócitos foram inicialmente incubados com LPS/INF- γ por 7 horas quando então foram adicionados os parasitos, sendo que após 16 horas de infecção, as células foram fixados e reveladas para microscopia como descrito em Materiais e Métodos. (A e B) macrófagos previamente ativados por LPS//INF- γ , mostrando a fluorescência vermelha de proteínas nitradas e as verdes das hidroxiladas, a cor amarela indica a co-localização das duas proteínas; (C e D) macrófagos não ativados. A e C são a microscopia de luz de B e D, respectivamente. Para a revelação com o anticorpo anti-DOPA foi utilizado meio de cultura diluído 1/1 em PBS As diluições do anticorpo para 3-nitrotirosina e dos anticorpos secundários são aquela recomendadas pelos fabricantes

Figura 20. Ausência de hidroxilação e nitração em neutrófilos humanos ativados. Os neutrófilos (2×10^5 células/ml) foram estimulados com PMA na presença de nitrito ($100 \mu\text{M}$) e revelados com anticorpos anti-DOPA (meio de cultura diluído 1/1 em PBS) (B) e anti-nitrotirosina (F). Como controle positivo, as células não ativadas e tratadas com peroxinitrito autêntico (1 mM) nos pHs 5,4 (D) e 7,4 (H) e revelados com anticorpos anti-DOPA e anti-nitrotirosina, respectivamente. A, C E e G são a microscopia de luz de B,D,F e H, respectivamente. As diluições do anticorpo para 3-nitrotirosina e dos anticorpos secundários são aquela recomendadas pelos fabricantes

4.3.5. Atividade microbicida de macrófagos ativados por LPS/ INF- γ

Confirmamos trabalhos anteriores demonstrando que a ativação de macrófagos murinos J774 por LPS/INF- γ induz a formação de *NO como verificado pelo acúmulo de NO_3^- e NO_2^- no meio de cultura (Fig. 21, Tabela 3). A produção de *NO obedeceu a um período de indução de ca. 7 horas e atingiu o máximo após 24 horas (Fig. 21). Tanto a cinética de acúmulo desses ânions bem como a relação de NO_3^-/NO_2^- (0,8) que obtivemos foi similar ao reportado anteriormente para macrófagos murinos ativados (Fig. 21, Tabela 3) (Lewis e col., 1995; Fujihara e col., 1994; Miwa e col., 1987).

Os fagócitos previamente ativados por LPS/INF- γ e infectados por 17 horas com amastigotas de *L. amazonensis* foram capazes de causar a morte dos parasitos como indicado pela redução do índice fagocítico (ca. de 3 vezes) em comparação àquele dos macrófagos não ativados (Fig. 22). O efeito leishmanicida (Tabela 4 e Fig. 22) está relacionado à produção de NO_3^- e NO_2^- pelos fagócitos ativados (Tabela 3).

A adição de catalase (500 U/ml) uma hora após a infecção pelos parasitos não alterou significativamente o índice fagocítico (Fig. 22). Esse dado contrasta com outros da literatura em que a catalase inibiu a morte de parasitos por macrófagos ativados (Haidaris e col., 1982; Li e col., 1992). Nesses casos, o aumento da sobrevivência dos parasitos tem sido atribuído ao efeito da catalase em inibir a síntese de *NO (Haidaris e col., 1982; Li e col., 1992; Pfeiffer e col., 2001). A catalase parece atuar pelo consumo do co-fator da iNOs, tetrahydrobiopterina. De fato, os efeitos da catalase puderam ser revertidos pela adição de tetrahydrobiopterina ao meio de cultura (Li e col., 1992). Mesmo no caso dos nossos experimentos, nos quais a catalase foi adicionada oito horas após o início da ativação dos macrófagos, houve uma diminuição na produção de NO_3^- e NO_2^- (Tabela 3). Essa diminuição, contudo, não foi suficiente para alterar significativamente o índice fagocítico dos macrófagos ativados (Fig. 22, Tabela 4), sugerindo que o peróxido de hidrogênio não é essencial para a atividade leishmanicida dos macrófagos. A *Leishmania* possui defesas antioxidantes e é capaz de sobreviver em presença de altas concentrações de peróxido de hidrogênio ($IC_{50} \sim 100 \mu M$) (Haidaris e col., 1982; Mellissa e col., 2000).

A adição de urato (100 μM) ou mieloperoxidase (2 U/ml) durante a infecção, inibiu fortemente o efeito leishmanicida dos fagócitos ativados (Fig. 22, Tabela 4). No caso do urato, o efeito foi dependente da ativação já que, na ausência de LPS/INF- λ , ele alterou marginalmente os níveis de infecção (Fig. 22, Tabela 4). No caso da mieloperoxidase, não houve um efeito microbicida pronunciado em ausência de LPS/INF- λ (Fig. 22, Tabela 4). Esse efeito tem sido descrito para outros patógenos como a *Candida albicans* (Marodi e col., 1998), *Toxoplasma gondii* e, inclusive, para a *Leishmania major* (Mathy-Hartet e col., 1996). Em contrapartida, a mieloperoxidase elevou significativamente a infecção dos macrófagos

ativados (Fig. 22). A presença da enzima não inibiu o acúmulo de NO_3^- e NO_2^- quando comparado aos controles em ausência do parasita (Tabela 3). A relação de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ (0,84) nesse caso foi comparável ao da catalase. Contudo, em contraste à catalase, a mieloperoxidase não alterou a quantidade total dos ânions medidos, indicando que a mieloperoxidase não deve influenciar a atividade da iNOS (Tabela 3). Na literatura ainda não achamos estudos que atribuam efeitos semelhantes a mieloperoxidase quando a enzima é oferecida a macrófagos ativados por citocinas.

Figura 21. Acúmulo de NO_3^- e NO_2^- no meio de cultura DMEM de macrófagos J774 induzido por LPS (1μg/ml) /INF-λ (100Unidades/ml). A densidade inicial de células foi de $2 \cdot 10^5$ células/ml.

Tabela 3. Efeito de LPS/INF- γ na produção de NO₃⁻ e NO₂⁻ por macrófagos J774 infectados por amastigotas de *L. amazonensis*^a

Sistema ^b	NO ₃ ⁻ (μM)	NO ₂ ⁻ (μM)
Mac	2,2 ± 1,3	1,7 ± 1,2
Mac + Ama	3,7 ± 1,7	2,9 ± 1,2
Mac + LPS/INF- λ ^d	13,2 ± 1,0	16,8 ± 0,9
Mac + LPS/INF- λ + Ama	14,0 ± 3,1	11,7 ± 1,7
Mac + LPS/INF- λ + Ama + CAT	7,8 ± 3,3	8,0 ± 0,4
Mac + LPS/INF- λ + Ama + UA	13,8 ± 3,0	11,3 ± 2,3
Mac + LPS/INF- λ + Ama + MPO	10,9 ± 0,5	12,9 ± 1,2

^a A relação de amastigotas/macrófagos foi de 10/1. Os fagócitos foram inicialmente incubados com LPS/INF- λ por 7 horas e então, foram adicionados os parasitos. As enzimas e o urato foram adicionados 1 hora após os parasitos. Após 16 horas de infecção, o meio de cultura foi recolhido para a dosagem de NO₃⁻ e NO₂⁻. Os valores correspondem à média ± DP de três experimentos independentes.

^b As concentrações utilizadas foram LPS (1 μg/ml), INF- λ (100 Unidades/ml), UA (100 μM), CAT (500 U/ml) e MPO (2 U/ml). Mac e Ama são utilizados como abreviaturas de macrófagos e amastigotas, respectivamente.

Tabela 4. Efeito leishmanicida de macrófagos murinos J774 ativados por LPS/INF- γ

Sistema ^b	%MI ^c	AMA/MAC ^d
Ama	40,6 $\pm$ 4,5	4,2 $\pm$ 0,7
Ama + LPS/INF- λ	25,2 $\pm$ 2,0	2,4 $\pm$ 0,3
Ama + CAT	42,9 $\pm$ 10,1	2,5 $\pm$ 0,6
Ama + LPS/INF- λ + CAT	24,0 $\pm$ 10,4	3,7 $\pm$ 1,6
Ama + UA	38,0 $\pm$ 10,5	3,6 $\pm$ 0,4
Ama + LPS/INF- λ + UA	62,3 $\pm$ 12,3	4,0 $\pm$ 0,7
Ama + MPO	27,3 $\pm$ 5,2	3,0 $\pm$ 0,3
Ama + LPS/INF- λ + MPO	58,3 $\pm$ 5,5	4,8 $\pm$ 0,7

^a A relação de amastigotas/macrófagos foi de 10/1. Os fagócitos foram inicialmente incubados com LPS/INF- λ por 7 horas e então, foram adicionados os parasitos. As enzimas e o urato foram adicionados 1 hora após os parasitos. As medidas foram realizadas 16 horas de infecção como descrito em Materiais e Métodos. Os valores correspondem à média $\pm$ DP de três experimentos independentes.

^b As concentrações utilizadas foram LPS (1 μ g/ml), INF- λ (100 Unidades/ml), UA (100 μ M), CAT (500 U/ml) e MPO (2 U/ml).

^c % MI = porcentagem de macrófagos infectados

^d AMA/MI = Número de amastigotas/macrófagos infectados.

Figura 22. Efeito de LPS/INF- λ no índice fagocítico de macrófagos J774 infectados por amastigotas de *L. amazonensis*. As condições de ativação e de infecção as mesmas descritas em Materiais e Métodos, sendo que após 16 horas de infecção os parasitos foram fixados e corados com Giemsa. O número total de macrófagos contados foi de 400 por lâmina. O índice fagocítico (IF) é definido como o produto da % de macrófagos infectados versus a razão amastigotas/macrófagos infectados (Giorgio e col., 1998; Shaw e Griffin, 1981). Os valores correspondem à média $\pm$ DP de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada usando-se o teste t de Student. O grupo 1 controle foi significativamente diferente ($P < 0,05$) do grupo 2 tratado com LPS/INF- λ . Não houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos 1, 3, 4, 5 e 7. Os grupos 6 e 8 foram significativamente diferentes ($P < 0,05$) do grupo 2.

5. DISCUSSÃO

5.1. Estudos da oxidação do urato pelo peroxinitrito

O ácido úrico tem sido considerado um eficiente seqüestrador de peroxinitrito (Kooy e col., 1994; Whiteman e Halliwell, 1996; Daiber e col., 1998; Scott e Hooper, 2001), contudo até nossos estudos, a reação do urato com o peroxinitrito havia sido apenas parcialmente caracterizada (Skinner e col., 1998; Vásquez-Vivar e col., 1996). Demonstramos que o urato reage diretamente com o peroxinitrito com uma constante de velocidade aparente de $4,8 \pm 0,1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (pH 7,3; 37°C) (Fig. 2). Esse valor da constante foi muito próximo ao obtido posteriormente por outro grupo de pesquisa ($5,4 \pm 0,1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, pH 7,4; 37°C) (Squadrito e col., 2000). O ponto de inflexão próximo ao valor de pK_a do ácido peroxinitroso obtido no perfil de pH em função de k_{obs} (Fig. 2, inserto) e a inclinação observada no gráfico de k_{obs} (Fig. 2) em função da concentração de urato, indicam que o urato reage tanto com o ácido peroxinitroso quanto com os seus produtos de decomposição (Esquema 1).

É importante notar que o valor da constante da reação do peroxinitrito com o urato é ca. de 100 vezes menor do que a constante entre o peroxinitrito e o CO_2 ($k = 5,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) (Denicola e col., 1996) que, além disso, está presente em maior concentração em fluidos biológicos (1-1,5 mM *versus* 0,5 mM). Nesse sentido, a maior parte das reações do peroxinitrito que são inibidas pelo urato tem que ser preferencialmente associada a reações dependentes dos radicais derivados do peroxinitrito como $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{NO}_2$ e $\text{CO}_3^{\cdot-}$ (eq. 4-5) (Massuda e col., 1975; Simic e Janovic, 1989). Apesar do valor da constante de reação entre urato e radical ânion carbonato ainda não ter sido determinado, ele deve ser comparável ao valor da constante da reação desse radical com a 8-oxo-dG ($k = 2,9 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) (Shafirovich e Dourandin, 2001).

A oxidação do urato foi acompanhada pela formação de radicais livres como atestado por experimentos de EPR associados à captação de *spin* (Fig. 3 e 4) e estudos de consumo de oxigênio (Figs. 4, inserto e 5). Durante a oxidação do urato pelo peroxinitrito, a formação de radicais livres e o consumo de oxigênio ocorrem em paralelo pois ambos os processos têm o mesmo comportamento com o aumento do pH (Fig. 4). Contudo, os perfis de pH nesses experimentos foram o oposto do obtido para k_{obs} (Fig. 2, inserto), indicando que a formação de radicais é preferencialmente dependente do ânion peroxinitrito. Provavelmente, o ânion peroxinitrito ataca alguns dos produtos de oxidação do urato gerando o radical derivado do ácido úrico. Uma seqüência similar de reações foi reportada durante a oxidação do etanol pelo peroxinitrito em que o produto, acetaldeído, reage com o ânion peroxinitrito (Nakao e col., 1999). No caso do ácido úrico a situação é mais complexa pois sua oxidação

por vários oxidantes é acompanhada pelo seu rearranjo à diferentes compostos (Esquema 2).

A interação do urato com o peroxinitrito produz como principais produtos a alantoína, a aloxana e o radical aminocarbonila (ver resultados; Fig. 8 e Esquema 2) além do 2-nitrito-4-amino-hidroxiimidazolona que foi previamente caracterizado (Skinner e col., 1998). A alantoína e aloxana são produzidas pela oxidação do urato por vários oxidantes (Kaur e Halliwell, 1990; Goyal e col., 1982; Volk e col., 1989), enquanto o composto nitrado e o radical aminocarbonila são mais específicos da oxidação mediada pelo peroxinitrito.

De fato, o radical aminocarbonila não foi detectado em incubações contendo urato com o sistema oxidante de Fenton, HRP/H₂O₂ e o ácido hipocloroso em pH 7,4 (ver Resultados, pg. 40-41). Esses resultados juntamente com a dependência do pH para a formação do radical aminocarbonila (Fig. 4) e a conhecida reatividade nucleofílica do ânion peroxinitrito, sugerem que o radical pode ser produzido pelo o ataque de qualquer produto contendo carbonilas vicinais como as presentes na aloxana e ácido parabânico (Esquema 3). Tal mecanismo, contudo, precisaria ser confirmado pois o aduto DMPO/aminocarbonila não foi detectado em incubações do peroxinitrito com o ácido parabânico ou com a aloxana, provavelmente devido à instabilidade dos adutos de DMPO frente ao peroxinitrito na ausência de agentes redutores (Gatti e col., 1998; Augusto e col., 1994).

Em relação às propriedades oxidantes do urato, verificamos que dependendo das condições experimentais empregadas, essa molécula pode exercer atividade pró ou anti-oxidante. Os efeitos pró-oxidantes devem ser consequência da formação do radical aminocarbonila (Fig. 3). Consistente com esse fato, nossos resultados demonstraram que 0,5 mM de urato, nível similar ao encontrado no plasma humano, foi capaz de amplificar a lipoperoxidação de lipossomas e da LDL humana (Fig. 6 e 7). A lipoperoxidação em ambos os sistemas aumentou com as concentrações de peroxinitrito, sendo que em presença de urato, ocorreu elevação na formação de hidroperóxidos lipídicos e TBARS da ordem de duas vezes em quase todas as concentrações fixas do oxidante (Fig. 6 e 7). Esses estudos sugerem que o radical aminocarbonila é o responsável pelo efeito pró-oxidante promovido pelo urato pois são inibidos pelo DMPO e bicarbonato (Fig. 6 e 7, insertos) que diminuem a disponibilidade e a produção do radical, respectivamente (Fig. 3).

O radical aminocarbonila não foi detectado em incubações contendo urato com outros oxidantes que não o peroxinitrito. Consequentemente, é pouco provável que o mesmo radical seja a espécie responsável pelos efeitos pró-oxidantes do urato observados em outros sistemas (Aruoma e Halliwell, 1989; Kittiridge e Willson, 1984; Bowry e Stocker, 1993; Benzie e Strain, 1996). Assim, os mecanismos descritos aqui devem ser relevantes em certas condições fisiopatológicas em que há aumento da produção do urato (Simovic e Janvanovic, 1989; Cutter, 1984) e de peroxinitrito.

Esquema 2. Representação esquemática da oxidação do urato e os principais produtos identificados durante a oxidação eletroquímica, via peroxidase (HRP) e a oxidação mediada pelo peroxinitrito. Adaptação dos resultados descritos nas referências Skinner e col., 1998; Goyal e col., 1982; Volk e col., 1989.

Esquema 3. Possível rota da formação do radical aminocarbonila a partir do ataque do peroxinitrito sobre os produtos de oxidação do urato pelo oxidante. No caso do ácido parabânico e da aloxana, R representa NH e CO-NH, respectivamente.

5.2. Estudos da oxidação da tirosina pelo peroxinitrito

A nitração da tirosina apresenta uma dependência de zero ordem no aminoácido (Lyman e col., 1996), sugerindo que o processo depende exclusivamente dos radicais $\cdot\text{OH}$ e $\cdot\text{NO}_2$ produzidos durante a homólise do peroxinitrito (Esquema 2). O rendimento destes radicais varia com o pH e os valores de 30 e 10% do peroxinitrito foram determinados para os pH 5,4 (eq. 6) e 7,4 (eq. 7), respectivamente (Gatti e col., 1998; Richeson e col., 1998; Coddington e col., 1999). Os valores das constantes de reação entre a tirosina e os radicais sugerem que inicialmente os radicais $\cdot\text{NO}_2$ e $\cdot\text{OH}$ oxidam o aminoácido à radical tirosila o qual, por recombinação, reage com o $\cdot\text{NO}_2$, produzindo 3-nitrotirosina (Esquema 4) (Prütz e col., 1985; Solar e col., 1984). O radical hidroxila oxida a tirosina, formando DOPA, devido à grande tendência de adição em duplas ligações deste radical.

Em relação aos nossos estudos, o resultado mais relevante foi a detecção do produto hidroxilado (DOPA) em pH ácido e a diminuição em seu rendimento na presença do par dióxido de carbono /bicarbonato (Fig. 9, Tabela 1). Esse par, entretanto, não inibiu completamente a formação de DOPA, já que cerca de 2,8% do peroxinitrito se decompõem ao radical hidroxila em pH 5,4 (ver, Materiais e Métodos). A não detecção de DOPA na ausência do par dióxido de carbono /bicarbonato em pH 7,4 (Tabela 1) pode ser explicado pelo aumento da taxa de oxidação da tirosina ao radical tirosila em pHs mais alcalinos (Prütz e col., 1985) e pela baixa concentração do radical $\cdot\text{OH}$ em pH 7,4 quando comparado com a sua concentração em pH 5,4 nas mesmas condições experimentais (Gatti e col., 1998; Richeson e col., 1998; Coddington e col., 1999).

É importante enfatizar que o rendimento do radical $\cdot\text{OH}$ em diferentes pHs têm sido medido por várias metodologias (Gatti e col., 1998; Richeson e col., 1998). Um modelo cinético (Coddington e col., 1999) explica essas diferenças de rendimento assim como a decomposição do peroxinitrito a nitrito e oxigênio na faixa de pH neutro ao alcalino (Pfeiffer e col., 1997). O modelo cinético enfatiza a importância de duas reações, a decomposição do peroxinitrito à $\cdot\text{NO}$ e $\text{O}_2^{\cdot-}$ (eq. 8) (Merényi e Lind, 1998) e a oxidação do peroxinitrito pelo radical hidroxila produzido durante a sua homólise (eq. 9) (Goldstein e col., 1998).

Ambas as reações acima são de pouca importância na presença do par dióxido de carbono/bicarbonato devido à alta constante de velocidade entre a reação do dióxido de carbono e o peroxinitrito (Esquema 1), e a constante de reação relativamente baixa entre o ânion radical carbonato e o peroxinitrito ($k = 7,7 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) (Goldstein e col., 1998). Consequentemente, a baixa reatividade do ânion radical carbonato se comparada com aquela do radical hidroxila define o ataque de alvos específicos e, também, tipos específicos de reação. No caso da tirosina, o maior rendimento de 3-nitrotirosina foi obtido na presença de bicarbonato e deve resultar da oxidação preferencial do aminoácido ao radical tirosila pelo ânion radical carbonato.

Na presença do par dióxido de carbono/bicarbonato, o decaimento do peroxinitrito é muito acelerado devido a sua reação direta com o CO_2 (Esquema 1), porém a constante geral de decaimento permanece independente da concentração de tirosina (Lymar e col., 1996). Neste caso, a maior parte do radical produzido durante a decomposição espontânea do peroxinitrito é substituída pelo ânion radical carbonato (Esquema 2). Tanto o radical hidroxila com o ânion radical carbonato podem oxidar a tirosina ao radical tirosila. Contudo, no caso do radical hidroxila, a reação de adição é predominante (Solar e col., 1984; Chen e Hoffman, 1973). Hipoteticamente, esse fato deveria resultar na diminuição tanto na geração de radical tirosila como de seu produto de recombinação, 3-nitrotirosina. Paralelamente deveria ocorrer a formação de DOPA devido à adição de $^{\bullet}\text{OH}$ na tirosina (Esquema 5) (Solar e col., 1984).

De fato, fomos capazes de estabelecer por EPR que a oxidação da tirosina pelo peroxinitrito gera o radical tirosila predominantemente em presença do par dióxido de carbono/bicarbonato (Figs. 10 e 11). O rendimento da formação do radical foi maior em pHs alcalinos e os resultados de EPR associados à captação de *spin* correlacionou-se com os rendimentos de 3-nitrotirosina quantificados por HPLC (Tabela 1). Esse fato permitiu estabelecer o radical tirosila como precursor da formação da 3-nitrotirosina.

Nesses sistemas de oxidação um dado relevante foi que mesmo em presença dióxido de carbono/bicarbonato (25 mM), ocorreu considerável formação de DOPA e de 3-nitrotirosina em pH 5,4 (Tabela 1). A interpretação desses dados nos fez propor que a presença simultânea desses aminoácidos modificados em proteínas pudesse ser útil para discriminar entre o peroxinitrito e outras espécies nitrantes e oxidantes em ambientes celulares ácidos como fagolisossomos e tecidos isquêmicos.

Provavelmente a reação do peroxinitrito e dos radicais dele derivados com proteínas deve ser diferente daquela com os aminoácidos livres. Com as proteínas temos que considerar a acessibilidade do oxidante e dos radicais dele derivados, quantidade de resíduos de tirosina presentes e a hidrofobicidade de seus ambientes. Consistentes com

essas observações, dados recentes do laboratório indicam que o peroxinitrito hidroxila a BSA na ausência de dióxido de carbono/ bicarbonato (dados não mostrados).

Um fato importante e que desafia a proposta inicial da co-localização de DOPA e 3-nitrotirosina em proteínas como biomarcador específico de peroxinitrito *in vivo* é que em estudos *in vitro*, foi verificado que peroxidases (MPO e HRP) hidroxilam a BSA (Fig. 16) e (Brennam e col., 2002). Esses dados são relativamente consistentes com os já reportados na literatura em que descreveram a hidroxilação da tirosina (Brennan e col., 2002) e da fenilalanina (Fujimoto e col., 1993) mediadas por peroxidases *in vitro*. Contudo, a eficiência dessas hidroxilações é relativamente baixa se comparado com as oxidações mediadas pelo peroxinitrito (Brennam e col., 2002). Além disso, neutrófilos ativados são incapazes de hidroxilar e nitrar eficientemente (Davis e col., 1989) e (Fig. 20). Desta forma, a maior parte da hidroxilações *in vivo* pode representar o envolvimento do peroxinitrito.

Na tentativa de esclarecermos esses aspectos realizamos os estudos com células e animais anteriormente descritos e discutidos a seguir.

Esquema 4. Representação esquemática da oxidação da tirosina pelo peroxinitrito. A tirosina tem uma dependência de zero ordem em relação ao peroxinitrito e assim reage apenas com os radicais derivados da homólise do oxidante ($\cdot$ OH, $\cdot$ NO₂ e CO₃⁻ e $\cdot$ NO₂ em ausência e presença de CO₂, respectivamente).

5.3. Proteínas nitradas e hidroxiladas como biomarcadores de peroxinitrito?

Uma vez que DOPA não é um constituinte normal em proteínas de mamíferos, a sua presença nessas biomoléculas pode servir como um índice de lesão oxidativa mediada principalmente pelo radical hidroxila em processos fisiopatológicos (para revisão, ver, Davies e col., 1999 e Dean, e col., 1997; Giese e col., 1993; Cohen e col., 1998). De fato, a formação de DOPA a partir do aminoácido padrão têm sido utilizada para indicar processos oxidativos em aterosclerose e catarata (Fu e col., 1998 a; Fu e col., 1998 b). A fonte de radicais hidroxila nessas situações foi atribuída à participação de metais de transição e irradiação ultra-violeta. Contudo, a formação de produtos hidroxilados da tirosina também pode estar associada à homólise do peroxinitrito, gerando o radical hidroxila (Esquema 2) (Santos e col., 2000), mesmo quando em presença do par dióxido de carbono/bicarbonato (Tabela 1). Interessantemente, nosso laboratório descreveu a formação de 3-nitrotirosina em processos de inflamação crônica induzida por *L. amazonensis* em camundongos (Giorgio e col., 1998). Assim, a presença simultânea de DOPA e 3-nitrotirosina em processos inflamatórios poderia representar uma evidência da produção de peroxinitrito *in situ* em situações associadas a uma superprodução de $^{\bullet}\text{NO}$.

Em estudos iniciais conseguimos quantificar por HPLC níveis significativamente maiores de DOPA em lesões de camundongos resistentes em comparação àquelas dos suscetíveis (Fig. 12 e 13). Esse dado nos estimulou a verificar a distribuição e localização das proteínas hidroxiladas nas lesões. Para isso, produzimos o anticorpo monoclonal anti-DOPA (Fig. 13 e 14). De fato, proteínas nitradas e hidroxiladas foram detectadas em níveis significativos e apresentaram co-localizadas apenas nos camundongos resistentes (Fig. 19).

Nesse mesmo período de infecção (seis semanas), os níveis de óxido nítrico medidos por EPR foram cerca de 4 vezes maiores nas lesões de camundongos resistentes do que em suscetíveis (Linares e col., 2001). Também nesse período, a atividade de peroxidase foi muito menor nas lesões de camundongos resistentes do que naquelas dos suscetíveis (Linares e col., 2001). Todos esses dados fornecem suporte para a participação do peroxinitrito no controle da infecção.

É importante destacar que a resistência e suscetibilidade dos camundongos estão primariamente relacionadas com a habilidade do hospedeiro em desenvolver resposta Th1 e Th2, respectivamente (Sobach e Laskay, 2000). Essa resposta diferencial tem sido associada com a produção ou não de óxido nítrico por macrófagos infectados, inclusive em estudos da leishmaniose (Sobach e Laskay, 2000).

Em estudos com células em cultura, demonstramos que a adição de um *bolus* de peroxinitrito exerce efeito citotóxico sobre os parasitos, contrastando com o efeito citostático do óxido nítrico (Linares e col., 2001). Esses dados concordam com outros da literatura sobre o efeito leishmanicida do peroxinitrito em que fluxos de $^{\bullet}\text{NO}$ e $\text{O}_2^{\bullet-}$ são gerados pelo

sistema xantina/ xantina-oxidase (Haidaris e Bonventre, 1982). Contudo, em sistemas celulares a enzima iNOs e o complexo NADPH-oxidase são regulados diferentemente e, assim, seus produtos (*NO e O_2^{*-} , respectivamente) podem ser produzidos defasadamente (Bastian e Hibbs, 1994; Pfeiffer e col., 2001). Numa tentativa de minimizar esse problema e propiciar a co-geração dos radicais e a formação de peroxinitrito (como deve ocorrer *in vivo*), adicionamos os parasitos aos macrófagos murinos previamente ativados com LPS/INF- λ . Os dados da Tabela 4 e Fig. 21, mostram o efeito leishmanicida dos macrófagos ativados. Esse efeito correlacionou positivamente com o acúmulo de nitrito e nitrato no meio de cultura (Tabela 3). A presença de nitrato nessas condições pode indicar o envolvimento do peroxinitrito já que esse ânion é o principal produto da decomposição do oxidante (Esquema 1).

Na ativação de macrófagos, ocorreu um ligeiro aumento na relação de NO_3^-/NO_2^- pelos fagócitos infectados quando comparado com os não infectados (Tabela 3). Um efeito semelhante foi reportado para macrófagos murinos RAW 264.7 em que há uma diminuição na relação NO_3^-/NO_2^- na presença de SOD (Lewis e col., 1995). Assim, nos macrófagos infectados pode haver maior produção de O_2^{*-} durante a fagocitose, gerando peroxinitrito e elevando os níveis de NO_3^- (Esquema 1).

O urato foi capaz de reverter significativamente o efeito leishmanicida de macrófagos ativados (Tabela 4, Fig. 21). De fato o urato tem sido utilizado com um potente seqüestrador de peroxinitrito (Scott e Hooper, 2001). O urato pode inibir como demonstrado nessa tese, eficientemente a ação do peroxinitrito através de sua reação com os radicais gerados pelo oxidante (Santos e col., 1999; Augusto e col., 2002).

A adição de MPO em cultura de macrófagos não ativados foi reportada como capaz de exercer um efeito citotóxico sobre os patógenos intracelulares *Candida albicans* e *Pseudomonas aeruginosa* (Marodi e col., 1998; Mathy-Harlet e col., 1996). Verificamos um efeito semelhante no caso da *L. amazonensis* (Tabela 4, Fig. 21). Nesses casos, o efeito da enzima deve estar relacionado com a produção de ácido hipocloroso que é um potente efetor da citotoxicidade de neutrófilos que contêm grandes quantidades de mieloperoxidase (Rosen e col., 1995; Hurst e Lyman, 1999).

Interessantemente, quando oferecemos a MPO para macrófagos ativados a enzima reverteu o efeito leishmanicida dessas células (Tabela 4, Fig. 21). Esse fato contradiz dados recentes que apontam a mieloperoxidase como a enzima efetora na atividade microbicida de macrófagos (Pfeiffer e col., 2001). De qualquer forma, a mieloperoxidase não deve ser responsável pela maioria dos mecanismos microbicidas de macrófagos porque há perda da enzima durante a diferenciação de monócitos à macrófagos *in vivo* (Mathy-Harlet e col., 1996). A perda da enzima, diminui totalmente a capacidade microbicida dos macrófagos

infectados com *T. gondii* e *L. major* sendo que o efeito microbicida é reparado pela a adição mieloperoxidase exógena às culturas (Mathy-Harlet e col., 1996).

É importante ressaltar dois fatos sobre o papel da MPO como enzima efetora da atividade microbicida de fagócitos. O primeiro fato é que recentemente, apesar de ainda pouco convincente, algumas evidências têm mostrado que macrófagos de camundongos podem possuir mieloperoxidase (Pfeiffer e col., 2001 a e b). O segundo é que estudos recentes sugerem que a mieloperoxidase pode não estar relacionada com a atividade microbicida de neutrófilos (Reeves e col., 2002).

Em termos gerais, é importante lembrar que a 3-nitrotirosina não pode ser utilizada como um biomarcador específico de peroxinitrito (para uma revisão mais recente ver Hurst, 2002). Assim, a partir de nossos estudos da interação do peroxinitrito com a tirosina, propusemos que a co-localização de DOPA e de 3-nitrotirosina em proteínas poderia discriminar o peroxinitrito de outras espécies nitrantes em patologias associados a uma superprodução de óxido nítrico (Santos e col., 2000; Linares e col., 2001). Com o objetivo de testar essa hipótese, desenvolvemos um anticorpo monoclonal capaz de reconhecer proteínas hidroxiladas anti-DOPA (Figs. 14 e 15). De fato, tanto os macrófagos ativados por citocina e infectados por amastigotas (Fig. 19) bem com a lesão de camundongos resistentes à infecção revelaram a co-localização de proteínas nitradas e hidroxiladas (Figs. 16 e 17). Todos esses dados fornecem evidências de que o peroxinitrito é o agente responsável pelo controle da leishmaniose.

Contudo, a co-localização de DOPA e de 3 nitrotirosina *in vivo* tem que ser interpretada com cautela pois enzimas com atividade peroxidásica tal como MPO são capazes de nitrar e hidroxilar *in vitro* (Brennan e col., 2002; Fujimoto e col., 1993; Walt e col., 1994). A MPO é pouco eficiente para hidroxilar se comparada com o peroxinitrito (Brennan e col., 2002) e os mecanismos que envolvem as hidroxilações mediadas por peroxidases ainda não estão totalmente esclarecidos. Podem envolver a formação do composto (III) da peroxidase (Winterbourn e col., 1985; Walt e col., 1994) ou, ainda, a produção de peroxinitrito pela enzima (Brennan e col., 2002; Sampson e col., 1998).

De qualquer maneira, realizamos alguns experimentos *in vitro* que confirmaram a eficiência de peroxidases em causar a hidroxilação de proteínas como a BSA em um processo potencializado por nitrito (Fig. 20). Contudo, estudos com neutrófilos isolados têm apontado para uma baixa eficiência de nitração *in vivo* (Brennan e col., 2002; Rosen e col., 2002; Evans e col., 1998) mesmo quando em presença de altas concentrações de nitrito. Além disso, nossos estudos com neutrófilos estimulados com PMA e em presença e ausência de nitrito não resultaram em hidroxilação e nitração como revelado por estudos com anticorpos (Fig. 20). Esses resultados sugerem que a MPO deve hidroxilar e nitrar pouco eficientemente *in vivo*.

Em conclusão, a co-localização de proteínas hidroxiladas e nitradas não pode ser tomada como um biomarcador inequívoco de peroxinitrito. Mas a sua demonstração, em conjunto com outros dados experimentais, pode ser uma forte evidência da produção de peroxinitrito *in vivo*.

PS. Após conclusão dessa tese, tentamos confirmar alguns dados antes de submetê-los à publicação e não conseguimos devido à perda da atividade dos lotes disponíveis de anticorpos anti-DOPA. Nesse sentido, os dados de co-localização aqui descritos devem ser tomados como preliminares pois sua comprovação dependerá da obtenção de novos lotes do anticorpo.

6. CONCLUSÕES

Os nossos estudos da oxidação de urato e tirosina por peroxinitrito contribuíram para fortalecer a visão de que, *in vivo*, o peroxinitrito deve atuar através dos radicais dele derivados. Na maioria dos ambientes biológicos, devido as altas concentrações de CO_2 , os radicais $\cdot\text{NO}_2$ e $\text{CO}_3\cdot^-$ devem ser os mais importantes. Todavia, em ambientes de pH baixo, o radical $\cdot\text{OH}$ também pode se tornar relevante. A determinação da baixa constante de velocidade da reação do ácido úrico com peroxinitrito ($k = 4,8 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) demonstra que esse antioxidante (concentrações plasmáticas $\sim 0.3\text{--}0.5 \text{ mM}$) não pode competir com o CO_2 ($k = 3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; concentrações $\sim 1\text{--}1.5 \text{ mM}$) pelo peroxinitrito na maioria dos ambientes biológicos. Justamente por isso, propusemos que os potentes efeitos protetores do urato em modelos experimentais de neurodegeneração (Hopper e col., 2000) indicam que radicais derivados do peroxinitrito mediam o processo neurodegenerativo (Augusto e col., 2002).

A importância de processos radicalares na Biologia do peroxinitrito também ficou demonstrada no caso da oxidação da tirosina. Estabelecemos que o CO_2 amplifica a produção de 3-nitrotirosina a partir do peroxinitrito por substituir o extremamente reativo radical $\cdot\text{OH}$ ($E^0 = 2.2 \text{ V}$) pelo mais específico radical $\text{CO}_3\cdot^-$ ($E^0 = 1.8 \text{ V}$) e também, por aumentar o fluxo de radicais. Isso aumenta a probabilidade de reações de recombinação, como aquela entre tirosila e $\cdot\text{NO}_2$ que produz a 3-nitrotirosina. Além disso, os estudos demonstrando a formação de DOPA a partir de tirosina, mesmo em presença de CO_2 , confirmaram que a pH ácido, o radical $\cdot\text{OH}$ também pode se tornar relevante na Biologia do peroxinitrito. O fato de ter sido possível co-localizar proteínas hidroxiladas e nitradas em tecidos e células sob condições de uma superprodução de óxido nítrico, indica fortemente que o peroxinitrito foi formado e, através de seus radicais, participou do mecanismo microbicida de macrófagos. Todavia, os resultados não são inequívocos, justamente porque o peroxinitrito atua através de radicais, $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{NO}_2$ e $\text{CO}_3\cdot^-$, cuja origem não é trivial estabelecer.

Assim, provar inequivocamente a produção de peroxinitrito *in vivo* requererá múltiplas abordagens experimentais. O conhecimento dos mecanismos pelos quais o urato e tempol (Bonini e col., 2002) protege contra o peroxinitrito fornece algumas possibilidades. Será útil, por exemplo, demonstrar que o urato, ao inibir o efeito leishmanicida de macrófagos, inibe também, a nitração e hidroxilação de proteínas. Experimentos desse tipo, utilizando urato e tempol serão realizados futuramente no laboratório.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alderton WK, Cooper CE e Knowles RG (2001) Nitric oxide synthase: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* **357**, 593-615.

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

Alves MJ, Aikawa M, Nussenzweig RS (1983) Monoclonal antibodies to *Trypanosoma cruzi* inhibit motility and nucleic acid synthesis of culture forms. *Infect. Immun.* **39**, 377-382.

Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P (1981) Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 6858-6862.

Aruoma OI e Halliwell B (1989) Inactivation of alpha 1-antiproteinase by hydroxyl radicals. The effect of uric acid. *FEBS Lett.* **244**, 76-80.

Augusto O, Bonini MG, Amanso AM, Linares E, Santos CC, De Menezes SL (2002) Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. *Free Radic. Biol. Med.* **32**, 841-859.

Augusto O, Gatti RM e Radi R (1994) Spin-trapping studies of peroxynitrite decomposition and of 3-morpholiniosydnonimine N-ethylcarbamide autooxidation: direct evidence for metal-independent formation of free radical intermediates. *Arch. Biochem. Biophys.* **310**, 118-125.

Augusto O e Radi R (1995) Peroxynitrite reactivity: free radical generation, thiol oxidation, and biological significance. *Biothiols in health and disease* (L. Packer L & E. Cadenas, eds) Marcel Dekker, New York., pp. 83-116.

Bastian NR e Hibbs JB (1994) Assembly and regulation of NADPH-oxidase and nitric oxide synthase. *Curr. Op. in Immunol.* **6**, 131-139.

Becker BF (1993) Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic. Biol. Med.* **14**, 615-631.

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite - implications for endothelial injury from nitric-oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 8745-8749.

Beckman JS e Crow JP (1993) Pathophysiological implications of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite formation. *Biochem. Soc. Trans.* **21**, 330-334.

Beckman JS, Ye YZ, Anderson P, Chen J, Asccavitti MA, Tarpey MM, White CR (1994) Extensive nitration of protein tyrosines in human arteriosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **375**, 81-88.

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PM, Freeman BA (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **87**, 1620-1624.

Beckman JS (1996) Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 845-850.

Benzie IFF e Strain JJ (1996) Uric acid: friend or foe? *Redox Report* **2**, 231-234.

Bilsk P, Chignell CF, Szyclinski J, Borkowski A, Olesky E, Reszka K (1992) Photooxidation of organic and inorganic substrates during UV photolysis of nitrite anion in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 549-556.

Bogdan C (2001) Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol.* **11**, 66-75.

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

Bonini MG e Augusto O (2001) Carbon dioxide stimulates the production of thiyl, sulfinyl, and disulfide radical anion from thiol oxidation by peroxynitrite *J. Biol. Chem.* **276**, 9749-9754.

Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation *Methods Enzymol.* **52**, 302-310.

Bowry VW e Stocker R (1993) Tocopherol-mediated peroxidation -the prooxidant effect of vitamin-E on the radical-initiated oxidation of human low-density-lipoprotein. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 6029-6044.

Brennan ML, Wu W, Fu X, Shen Z, Song W, Frost H, Vadseth C, Narine L, Lenkiewicz E, Borchers MT, Lusi AJ, Lee JJ, Lee NA, Abu-Soud HM, Ischiropoulos H, Hazen SL (2002) A tale of two controversies: i) Defining the role of peroxidases in nitrotyrosine formation *in vivo* using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase deficient mice; and ii) Defining the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. *J. Biol. Chem.* **277**, 17415-27.

Buettner GH (1987) Spin trapping-ESR parameters of spin adducts. *Free Radic. Biol. Med.* **3**, 259-303.

Carmichael SW e Winkler H (1985) The adrenal chromaffin cell. *Sci. Am.* **253**, 40-47.

Castro LA, Robalinho RL, Cayota A, Meneghini R, Radi R (1998) Nitric oxide and peroxynitrite-dependent aconitase inactivation and iron-regulatory protein-1 activation in mammalian fibroblasts. *Arch. Biochem. Biophys.* **359**, 215-224.

Chen SN e Hoffman MZ (1973) Rate constants for reaction of carbonate radical with compounds of biochemical interest in neutral aqueous-solution. *Radiat. Res.* **56**, 40-47.

- Coddington JW, Hurst J K e Lyman SV (1999) Hydroxyl radical formation during peroxyxynitrous acid. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 2438-2443.
- Cohen G, Yakushin S e Dembied-Cohen D (1998) Protein L-DOPA as an index of hydroxyl radical attack on protein tyrosine. *Anal. Biochem.* **263**, 232-239.
- Cutler RG (1984) in *Free Radicals in Biology* (Pryor, W. A., Ed.), pp. 371-428.
- Daiber A, Mehl M, Zou MH, Ullrich V (1998) New aspects in the reaction mechanism of phenol with peroxyxynitrite: The role of phenoxy radicals. *Nitric Oxide* **2**, 259-269.
- Darley-Usmar V, Wiseman H e Halliwell B (1995) Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett.* **369**, 131-135.
- Darley-Usmar V, Hogg N, O'Leary VJ, Wilson MT, Moncada S (1992) The simultaneous generation of superoxide and nitric oxide can initiate lipid peroxidation in human low density lipoprotein. *Free Radic. Res. Commun.* **17**, 9-20.
- Darrah PA, Hondalus MK, Chen Q, Ischiropoulos H, Mosser DM (2000) Cooperation between reactive oxygen and nitrogen intermediates in killing of *Rhodococcus equi* by activated macrophages. *Infect. Immun.* **68**, 3587-3593.
- Davies KJ, Sevanian A, Muakkassah-Kelly SF, Hochstein P (1986) Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid. *Biochem. J.* **235**, 747-754.
- Davis WB, Mohammed BS, Mays DC, She ZW, Mohammed JR, Husney RM, Sagone AL (1989) Hydroxylation of salicylate by activated neutrophils. *Biochem. Pharmacol.* **38**, 4013-4019.
- Davies MJ, Fu S, Wang H, Dean RT (1999) Stable markers of oxidant damage to proteins and their applications in the study of human disease. *Free Radic. Biol. Med.* **27**, 1151-1163.
- Dean JA (1979) *Lange's Handbook of Chemistry*, 12th ed., McGraw-Hill Book Company, New York.
- Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ (1997) Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.* **324**, 1-18.
- DeLeo FR, Allen LA, Apicella, Nauseef WM (1999) NADPH-oxidase activation and assembly during phagocytosis. *J. Immun.* **163**, 6732-6740.
- Denicola A, Souza JM, Gatti RM, Augusto O, Radi R (1995) Desferrioxamine inhibition of the hydroxyl radical-like reactivity of peroxyxynitrite: role of the hydroxamic groups. *Free Radic. Biol. Med.* **19**, 11-19.
- Denicola A, Freeman BA, Trujillo M, Radi R (1996) Peroxyxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxyxynitrite-mediated oxidations. *Arch. Biochem. Biophys.* **333**, 49-58.
- Duling DR (1994) Simulation of multiple isotropic spin-trap EPR spectra. *J. Magn. Reson.* **104**, 105-110.

- Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B, van der Vliet A (1998) Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* **391**, 393-397.
- Fang FC (1997) Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J. Clin. Invest.* **99**, 2818-2825.
- Fessel WJ e High (1980) Uric acid as an indicator of cardiovascular disease. *Am. J. Med.* **68**, 401-404.
- Freedman DS, Williamson DF, Gunter EW, Byers T (1995) Relation of serum uric acid to mortality and ischaemic heart disease. The NHANES I epidemiologic follow-up study. *Am. J. Epidemiol.* **141**, 637-644.
- Fridovich I (1989) Superoxide dismutases. An adaptation to paramagnetic gas. *J. Biol. Chem.* **264**, 7761-7764.
- Fridovich I (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 97-112.
- Fu S, Davies MJ, Stocker R, Dean RT (1998, a) Evidence for roles of radicals in protein oxidation in advanced human atherosclerotic plaque. *Biochem. J.* **333**, 519-525.
- Fu S, Davies MJ, Dean RT, Southan M, Truscott R (1998, b) The hydroxyl radical in lens nuclear cataractogenesis. *J. Biol. Chem.* **273**, 28603-28609.
- Fujihara M, Ito N, Pace JL, Watanabe Y, Russell SW, Suzuki T (1994) Role of endogenous interferon-beta in lipopolysaccharide-triggered activation of the inducible nitric-oxide synthase gene in a mouse macrophage cell line J774. *J. Biol. Chem.* **269**, 12773-12778.
- Fujimoto S, Kawakami N e Ohara A (1993) Formation of a hydroxyl radical by the myeloperoxidase-NADH-oxygen system. *Biol. Pharm. Bull.* **16**, 525-528.
- Gatti RM, Alvarez B, Vásquez-Vivar J, Radi R, Augusto O (1998) Formation of spin trap adducts during the decomposition of peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* **349**, 36-46.
- Gatti RM, Radi R e Augusto O (1994) Peroxynitrite-mediated oxidation of albumin to the protein-thiyl free radical. *FEBS Lett.* **348**, 287-290.
- Gatti RM, Augusto O, Kwee JK, Giorgio S (1995) Leishmanicidal activity of peroxynitrite. *Redox Report* **1**, 261-265.
- Gaut JP, Byun J, Tran HD, Lauber WM, Carroll JA, Hotchkiss RS, Belaaouaj A, Heinecke JW (2002) Myeloperoxidase produces nitrating oxidants *in vivo*. *J. Clin. Inv.* **109**, 1311-1319.
- Gerasimov OV e Lyman S (1999) The yield of hydroxyl radical from the decomposition of peroxynitrous acid. *Inorganic. Chem.* **38**, 4317-4321.

Gieseg SP, Simpson JA, Charlton TS, Ducnan MW, Dean RT (1993) Protein-bound 3,4-dihydroxyphenylalanine is a major reductant formed during hydroxyl radical damage to proteins. *Biochem.* **32**, 4780-4786.

Giorgio S, Linares E, Ischiropoulos H, Von Zubern FJ, Yamada A, Augusto O (1998) *In vivo* formation of electron paramagnetic resonance-detectable nitric oxide and of nitrotyrosine is not impaired during murine leishmaniasis. *Infect. Immun.* **66**, 807-814.

Giorgio S, Barão SC, Augusto O, Kwee JK (1998) *Leishmania amazonensis* infection is reduced in macrophages treated with guanine ribonucleosides. *Acta tropica.* **70**, 119-122.

Goldstein S, Squadrito GL, Pryor WA, Czapski G (1996) Direct and indirect oxidations by peroxynitrite, neither involving the hydroxyl radical. *Free Radic. Biol. Med.* **21**, 965-974.

Goldstein, S e Czapski, G (1998) Formation of peroxynitrate from the reaction of peroxynitrite with CO₂: evidence for carbonate radical production. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 3458-3463.

Goldstein S, Saha A, Lyman SV, Czapski G (1998) Oxidation of peroxynitrite by inorganic radicals: a pulse radiolysis study. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 5549-5554.

Goldstein S e Czapski G (1999) Viscosity effects on the reactions of peroxynitrite with CO₂: evidence for radical formation in a solvent cage. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 2444-2447.

Goyal RN, Brajter-Toth A, Dryhurst G, Nguyen NT (1982) A comparison of the peroxidase-catalyzed and electrochemical oxidation of uric acid. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **9**, 39-60.

Gow AJ e Ischiropoulos H (2001) Nitric oxide chemistry and cellular signaling. *J. Cell Physiol.* **187**, 277-282.

Green LC, Wagner DA e Glogowski J (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**, 131-138.

Gunther MR, Kelman DJ, Corbett JT, Mason RP (1995) Self-peroxidation of metmyoglobin results in formation of an oxygen-reactive tryptophan-centered radical. *J. Biol. Chem.* **270**, 16075-16081.

Gunther MR, Hsi LC, Curtis JF, Marnett LJ, Eling TE, Mason, RP (1997) Nitric oxide trapping of the tyrosyl radical of prostaglandin H synthase-2 leads to tyrosine iminoxyl radical and nitrotyrosine formation. *J. Biol. Chem.* **272**, 17086-17090.

Gunther MR, Tschirret-Guth RA, Witkowska HE, Fann YC, Barr DP, Ortiz De Montellano PR, Mason RP (1998) Site-specific spin trapping of tyrosine radicals in the oxidation of metmyoglobin by hydrogen peroxide. *Biochem. J.* **330**, 1293-1299.

Haidaris CG e Bonventre PF (1982) A role for oxygen-dependent mechanisms in killing of *Leishmania Donovanii* in tissue forms by activated macrophages. *J. Immunol.* **129**, 850-855.

Halliwell B (1997) What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation *in vivo*? *FEBS Lett.* **411**, 157-60.

Halliwell B e Gutteridge JMC (1999) *Free radicals in biology and medicine*. 3^o ed. Oxford Science, New york.

Hensley K e Floyd RA (2002) Reactive oxygen species and protein oxidation in aging: a look back, a look ahead. *Arch. Biochem. Biophys.* **397**, 377-383.

Hensley K, Maidt ML, Pye QN, Steward CA, Wack M, Tabatabaie T, Floyd RA (1997) Quantification of protein-bound 3-nitrotyrosine and 3,4-dihydroxyphenylalanine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal. Biochem.* **251**, 187-195.

Herold S (1999) Kinetic and spectroscopic characterization of an intermediate peroxynitrite complex in the nitrogen monoxide induced oxidation of oxyhemoglobin. *FEBS Lett.* **443**, 81-84.

Hogg N, Darley-Usmar VM, Wilson MT, Moncada S (1993) The oxidation of α -tocopherol in human low density lipoprotein by the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *FEBS Lett.* **326**, 199-203.

Hooper DC, Scott GS, Zborek A, Mikheeva T, Kean RB, Koprowski H, Spitsin SV (2000) Uric acid, a peroxynitrite scavenger, inhibits CNS inflammation, blood-CNS barrier permeability changes, and tissue damage in a mouse model of multiple sclerosis. *FASEB J.* **14**, 691-698.

Hooper DC, Spitsin S, Kean RB, Champion JM, Dickson GM, Chaudhry I, Koprowski H (1998) Uric acid, a natural scavenger of peroxynitrite, in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 675-680.

Huie RE e Padmaja S (1993) The reaction of $\cdot\text{NO}$ with superoxide. *Free Radic. Res. Commun.* **18**, 195-199.

Hurst JK (2002) Whence nitrotyrosine? *J. Clin. Invest.* **109**, 1287-1289.

Hurst JK e Lyman SV (1999) Cellular generated inorganic oxidants as natural microbicidal agents. *Acc. Chem. Res.* **32**, 520-528.

Ignarro LJ (1990) Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **30**, 535-560.

Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, Tsai MH, Martin JC, Smith CD, Beckman JS (1992) Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *FEBS Lett.* **348**, 287-290.

Ischiropoulos H (1998) Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch. Biochem. Biophys.* **356**, 1-11.

Jiang Q e Hurst JK (1997) Relative chlorinating, nitrating, and oxidizing capabilities of neutrophils determined with phagocytosable probes. *J. Biol. Chem.* **272**, 32767-32772.

Jiang ZY, Hunt JV e Wolff SP. (1992) Ferrous iron oxidation in the presence of xilenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal. Biochem.* **202**, 384-389.

Jones OT e Cross AR (1992) "Composition of NADPH oxidase of phagocytes and other cell types". In: Biological oxidants: generation and injurious consequences (Cochrane, CG e Gimbone, MA, Jr, eds), pp 119-131, Academic Press, New York .

Kaur H, Leung KHW e Perkins MJ (1981) A water-soluble, nitroso-aromatic spin-trap. *J. Chem. Soc. Commun.* **3**,142-143.

Kaur H e Halliwell B (1990) Action of biologically-relevant oxidizing species upon uric acid. Identification of uric acid oxidation products. *Chem. Biol. Interact.* **73**, 235-247.

Kean RB, Spitsin SV, Mikheeva T, Scott GS, Hooper DC (2000) The peroxynitrite scavenger uric acid prevents inflammatory cell invasion into the central nervous system in experimental allergic encephalomyelitis through maintenance of blood-central nervous system barrier integrity. *J. Immunol.* **165**, 6511-6518.

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

Kittridge KJ e Willson RL (1984) Uric acid substantially enhances the free radical-induced inactivation of alcohol dehydrogenase. *FEBS Lett.* **170**,162-164.

Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS (1994) Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic. Biol. Med.* **16**, 149-156.

Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS (1992) Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem. Res. Toxicol.* **5**, 834-841.

Koppenol WH (1998) Peroxynitrite unlocked ? *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 716-717.

Kuthan H e Ullrich V (1982) Oxidase and oxygenase function of the microsomal cytochrome P450 monooxygenase system. *Eur. J. Biochem.* **126**, 583-588.

Lancaster JR Jr (1997) A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. *Nitric Oxide* **1**, 18- 30.

Lehnig M (1999) Radical mechanisms of the decomposition of peroxynitrite and the peroxynitrite-CO(2) adduct and of reactions with L-tyrosine and related compounds as studied by (15)N chemically induced dynamic nuclear polarization. *Arch. Biochem. Biophys.* **368**, 303-318.

- Lepoivre M, Fieschi F, Coves J, Thelander L, Fontecave M (1991) Inactivation of ribonucleotide reductase by nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**, 442-448.
- Lee C, Miura K, Liu X, Zweier JL (2000) Biphasic regulation of leukocyte superoxide generation by nitric oxide and peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* **275**, 38965-38972.
- Lewis RS, Tamir S, Tannenbaum SR, Deen WM (1995) Kinetic analysis of the fate of nitric oxide synthesized by macrophages *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **270**, 29350-29355.
- Li, ASW, Cummings, KB, Roethling, HP, Buettner, GR, Chignell, CF (1988) A spin trapping data base implemented on the IBM PC/AT. *J. Magn. Res.* **79**, 140-142.
- Li Y, Severn A, Rogers MV, Palmer RMJ, Moncada S, Liew FY (1992) Catalase inhibits nitric oxide synthesis and the killing of intracellular *Leishmania major* in murine macrophages. *Eur. J. Immunol.* **22**, 441-446.
- Linares E, Giorgio S, Mortara RA, Santos CX, Yamada AT, Augusto O (2001) Role of peroxynitrite in macrophage microbicidal mechanism *in vivo* revealed by protein nitration and hydroxylation. *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 1234-1242.
- Liu X, Miller MJ, Joshi MS, Thomas DD, Lancaster Jr (1998) Accelerated reaction of nitric oxide with O₂ within the hydrophobic interior of biological membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 2175-2179.
- Locksley RM, Nelson CS, Fankhauser JE, Klebanoff SJ (1987) Loss of granule myeloperoxidase during *in vitro* culture of human monocytes correlates with decay in antiprotozoa activity. *Am. J. Med. Hyg.* **36**, 541-548.
- Lyman SV e Hurst JK (1996) Carbon dioxide: physiological catalyst for peroxynitrite-mediated cellular damage or cellular protectant? *Chem. Res. Toxicol.* **9**, 845-50.
- Lyman SV, Jiang Q e Hurst JK (1996) Mechanism of carbon dioxide-catalyzed oxidation of tyrosine by peroxynitrite. *Biochem.* **35**, 7855-7861.
- Lyman SV e Hurst JK (1998, a) Radical nature of peroxynitrite reactivity. *Chem Res Toxicol.* **11**, 714-715.
- Lyman SV e Hurst JK (1998, b) CO₂-catalyzed one-electron oxidations by peroxynitrite: Properties of the reactive intermediate. *Inorg. Chem.* **37**, 294-301.
- MacMicking J, Xie QW, Nathan C (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 323-350.
- MacMillan-Crow LA e Thompson JA (1999) Tyrosine modifications and inactivation of active site manganese superoxide dismutase mutant (Y34F) by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* **366**, 82-88.
- Maples M e Mason RP (1988) Free radical metabolite of uric acid. *J. Biol. Chem.* **263**, 1709-1712.

Marodi L, Tournay C, Kaposzta R, Johnston RB, Moguilevsky N (1998) Augmentation of human macrophage candidacidal capacity by recombinant human myeloperoxidase and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Infect. Immun.* **66**, 2750-2754.

Martens ME, Storey BT e Lee CP (1987) Generation of allantoin from the oxidation of urate by cytochrome-c and its possible role in Reye's syndrome. *Arch. Biochem. Biophys.* **252**, 91-96.

Massuda T, Shinohara H e Kondo M (1975) Reactions of hydroxyl radicals with nucleic acid bases and the related compounds in gamma-irradiated aqueous solution. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* **16**, 153-161.

Mathy-Hartet M, Deby-Dupont G, Melin P, Lamy M, Deby C (1996) Bactericidal activity against *Pseudomonas aeruginosa* is acquired by cultured human monocyte-derived macrophages after uptake of myeloperoxidase. *Experientia* **52**, 167-173.

Mayer B e Hemmens B (1997) Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *TRENDS in Biochem. Sci.* **22**, 477-481.

McCormick ML, Gaut JP, Lin TS, Britigan BE, Buettner GR, Heineck JW (1998) Electron paramagnetic resonance detection of free tyrosyl radical generated by myeloperoxidase, lactoperoxidase and horseradish peroxidase. *J. Biol. Chem.* **273**, 32030-32037.

Mehlhorn RJ e Keith AD (1972) *Membrane Molecular Biology*, C. F. Fox and A. D. Keith, eds., pp. 192-227, Sinauer Assoc., Stanford, CT.

Merenyi G e Lind J (1997) Thermodynamics of peroxynitrite and its CO₂ adduct. *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 1216-1220.

Merényi, G e Lind, J (1998) Free radical formation in the peroxynitrous acid (ONOOH)/peroxynitrite (ONOO⁻) system. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 243-246.

Merényi G, Lind J, Goldstein S, Czapski G (1998) Peroxynitrous acid homolyzes into [•]OH and [•]NO₂ radicals. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 712-713.

Miwa M, Stuehr DJ, Marletta MA, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1987) Nitrosation of amines by stimulated macrophages. *Carcinogenesis* **8**, 955-958.

Moncada S, Palmer Jr, RM, Higgs EA (1991) Nitric oxide: Physiology, Pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**, 109-142.

Moncada S e Higgs EA (1995) Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J.* **9**, 1319-1330.

Mons N e Geffard M (1987) Specific antiserum against the catecholamines: L-3,4-dihydroxyphenylalanine, dopamine, noradrenaline, and octapamine tested by an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Neurochem.* **48**, 1826-1833.

- Morin B, Davies MJ e Dean RT (1998) The protein oxidation product 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) mediates oxidative DNA damage. *Biochem. J.* **330**, 1059-1067.
- Nakao LS, Ouchi D e Augusto O (1999) Oxidation of acetaldehyde by peroxynitrite and hydrogen peroxide/iron(II). Production of acetate, formate, and methyl radicals. *Chem. Res. Toxicol.* **12**, 1010-1018.
- Naqui A, Chance B e Cadenas E. (1986) Reactive oxygen intermediates in biochemistry. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 137-166.
- North JA, Spector AA e Buettner GR (1992) Detection of lipid radicals by electron paramagnetic resonance spin trapping using intact cells enriched with polyunsaturated fatty acid. *J. Biol. Chem.* **267**, 5743-5746.
- Paz MA, Fluckiger R, Boak A, Kagan HE, Gallop PM (1991) Specific detection of quinoproteins by redox-cycling staining. *J Biol. Chem.* **266**, 689-692.
- Pick U (1981) Liposomes with a large trapping capacity prepared by freezing and thawing of sonicated phospholipid mixtures. *Arch. Biochem. Biophys.* **212**, 186-194.
- Pfeiffer S, Schmidt K e Mayer B (2000) Dityrosine formation outcompetes tyrosine nitration at low steady-state concentrations of peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* **275**, 6346-6352.
- Pfeiffer S, Lass A, Schmidt K, Mayer B (2001) Protein tyrosine nitration in cytokine-activated murine macrophages: involvement of a peroxidase/nitrite pathway rather than peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* **276**, 34051-34058.
- Pfeiffer S, Lass A, Schmidt K, Mayer B (2001) Protein tyrosine nitration in mouse activated in vitro and in vivo: evidence against an essential role of peroxynitrite. *FASEB. J.* **15**, 2355-2364.
- Pfeiffer S e Mayer B (1998) Lack of tyrosine nitration by peroxynitrite generated at physiological pH. *J. Biol. Chem.* **273**, 27280-27285.
- Pfeiffer S, Gorren AC, Schmidt K, Werner ER, Hansert B, Bohle DS, Mayer B (1997) Metabolic fate of peroxynitrite in aqueous solution. Reaction with nitric oxide and pH-dependent decomposition to nitrite and oxygen in a 2:1 stoichiometry. *J. Biol. Chem.* **272**, 3465-3470.
- Pou S, Nguyen SY, Gladwell T, Rosen GM (1995) Does peroxynitrite generate hydroxyl radical? *Biochim. Biophys. Acta.* **1244**, 62-68.
- Prütz WA, Monig H, Butler J, Land EJ (1985) Reactions of nitrogen dioxide in aqueous model systems: oxidation of tyrosine units in peptides and proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **243**, 125- 134.
- Pryor WA, Jin X e Squadrito GL (1994) One- and two-electron oxidations of methionine by peroxynitrite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11173-11177.

- Pryor WA e Squadrito GL (1995) The chemistry of peroxynitrite and peroxynitrous acid: products from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am. J. Physiol. (Lung Cell Molecular Physiology)* L.699-L.722.
- Quijano C, Alvarez B, Gatti RM, Augusto O, Radi R (1997) Pathways of peroxynitrite oxidation of thiol groups. *Biochem. J.* **322**, 167-173.
- Radi R, Denicola A, Alvarez MN, Ferrer-Sueta G, Rubbo H (2001 a) The biological chemistry of peroxynitrite. In: Nitric Oxide (Ignarro, LJ, ed), pp. 57-82. Academic press, New York.
- Radi R, Peluffo G, Alvarez MN, Naviliat M, Cayota A (2001 b) Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 463-488.
- Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman, BA (1991) Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**, 481-487.
- Radi R (1998). Peroxynitrite reactions and diffusion in biology. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 720-721.
- Reeves EP, Lu H, Jacobs HL, Messina CG, Bolsover S, Gabella G, Potma EO, Warley A, Roes J, Segal AW (2002) Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature* **21**, 291-297.
- Richeson CE, Mulder P, Bowry VW, Ingold KU (1998) The complex chemistry of peroxynitrite decompositions: new insights. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 7211-7219.
- Robinson J e Cooper JM (1970) Method of determining oxygen concentrations in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode. *Anal Biochem.* **33**, 390-399.
- Rodrigues MR, Rodriguez D, Russo M, Campa A (2002) Macrophage activation includes high intracellular myeloperoxidase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **292**, 869-873.
- Rosen GM, Pou S, Ramos CL, Cohen MS, Britigan BE (1995) Free radical and phagocytic cells. *FASEB J.* **9**, 200-209.
- Rosen H , Crowley J e Heinecke JW (2002) Human neutrophils use myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to chlorinate but not nitrate bacterial proteins during phagocytosis. *J. Biol. Chem.* In press.
- Saha A, Goldstein S, Cabelli D, Czapki G (1998) Determination of optimal conditions for synthesis of peroxynitrite by mixing acidified hydrogen peroxide with nitrite. *Free Radic. Biol. Med.* **24**, 653-659.
- Samoilovich SR, Dugan CB, Macario AJ (1987) Hybridoma technology: new developments of practical interest. *J. Immunol. Methods.* **101**, 153-170.

Sampson JB, Ye Y, Rosen H, Beckman JS (1998) Myeloperoxidase and horseradish peroxidase catalyze tyrosine nitration in proteins from nitrite and hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **356**, 207-213.

Santos CX, Anjos EI e Augusto O (1999) Uric acid oxidation by peroxynitrite: multiple reactions, free radical formation, and amplification of lipid oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **372**, 285-294.

Santos CX, Bonini MG e Augusto O (2000) Role of the carbonate radical anion in tyrosine nitration and hydroxylation by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* **377**, 146-152.

Scott GS e Hooper DC (2001) The role of uric acid in protection against peroxynitrite-mediated pathology. *Med. Hypoth.* **56**, 95-100.

Sealy RC, Harman L, West PR, Mason RP (1985) The electron-spin resonance-spectrum of the tyrosyl radical. *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 3406-3411.

Shafirovich V, Dourandin A, Huang W, Geacintov NE (2001) The carbonate radical is a site-selective oxidizing agent of guanine in double-stranded oligonucleotides. *J. Biol. Chem.* **276**, 24621-24626.

Sharma VS, Traylor TG, Gardiner R, Mizukami H (1987) Reaction of nitric oxide with heme proteins and model compounds of hemoglobin. *Biochem.* **26**, 3837-3843.

Sharpe MA e Cooper CE (1998) Reactions of nitric oxide with mitochondrial cytochrome-c: a novel mechanism for the formation of nitroxyl anion and peroxynitrite. *Biochem. J.* **332**, 9-19.

Shaw DR e Griffin FM. Antibody dependent and antibody independent phagocytosis. In "Methods for studying mononuclear phagocytes" (D.O. Adams, P.J. Edelson, and , and H. Joren, Eds, pp 511-527, Academic Press, New York, 1981.

Simic MG e Jovanovi SV (1989) Antioxidation mechanism of uric acid *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 5778-5782.

Skinner KA, White CR, Patel R, Tan S, Barnes S, Kirk M, Darley-Usmar V, Parks DA. (1998) Nitrosation of uric acid by peroxynitrite. Formation of a vasoactive nitric oxide donor. *J. Biol. Chem.* **273**, 24491-24497.

Solar S, Solar W e Getoff N (1984) Hydrogen-atom attack on methyl viologen in aqueous-solution studied by pulse-radiolysis. *J. Phys. Chem.* **88**, 2091-2095.

Solbach W e Laskay T (2000) The host response to *Leishmania* infection. *Adv. Immunol.* **74**, 275-317.

Spitsin, SV, Scott GS, Kean RB, Mikheeva T, Hooper DC (2000) Protection of myelin basic protein immunized mice from free-radical mediated inflammatory cell invasion of the central nervous system by the natural peroxynitrite scavenger uric acid. *Neurosci. Lett.* **292**, 137-141.

Squadrito GL, Cueto R, Splenser AE, Valavanidis A, Zhang H, Uppu RM, Pryor WA (2000) Reaction of uric acid with peroxynitrite and implications for the mechanism of neuroprotection by uric acid. *Arch. Biochem. Biophys.* **376**, 333-337.

Squadrito GL e Pryor WA (1998) Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite and carbon dioxide. *Free Radic. Biol. Med.* **25**, 392-403.

Stadtman ER e Berlett BS (1997) Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 485-494.

Stamler JS, Singel DJ e Loscalzo J (1992) Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* **258**, 1898-1902.

Sugiyama S, Okada Y, Sukhova, Virmani R Heinecke JW, Libby P (2001) Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte colony-stimulation factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes. *Am. J. Pathol.* **158**, 879-891.

Szabo C, Zingarelli B, O'Connor M, Salzman AL (1996) DNA strand breakage, activation of poly (ADP-ribose) synthetase, and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity of macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 1753-1758.

Thomas SR, Davies MJ e Stoker R (1998) Oxidation and antioxidation of human low density lipoprotein and plasma exposed to 3-morpholinosydnomine and reagent peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 484-494.

Tretyakova NY, Niles JC, Burney S, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1999) Peroxynitrite-induced reactions of synthetic oligonucleotides containing 8-oxoguanine. *Chem. Res. Toxicol.* **12**, 459-466.

Uppu RM, Cueto R, Squadrito GL, Salgo MG, Pryor WA (1996) Competitive reactions of peroxynitrite with 2'-deoxyguanosine and 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxodG): relevance to the formation of 8-oxodG in DNA exposed to peroxynitrite. *Free Radic. Biol. Med.* **21**, 407-411.

Uppu RM, Winston G W, Pryor e WA (1997) Reactions of peroxynitrite with aldehydes as probes for the reactive intermediates responsible for biological nitration. *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 1331-1337.

van der Vliet A, Eiserich JP, O'Neill CA, Halliwell B, Cross CE (1995) Tyrosine modification by reactive nitrogen species: a closer look. *Arch. Biochem. Biophys.* **319**, 341-349.

van der Vliet A, Eiserich JP, Halliwell B, Cross CE (1997) Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity. *J. Biol. Chem.* **272**, 7617-7625.

van der Vliet A, Hristova M, Cross CE, Eiserich JP, Goldkorn T (1998) Peroxynitrite induces covalent dimerization of epidermal growth factor receptors in A431 epidermoid

carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 31860-31866.

van der Walt BJ, van Zyl JM e Kriegler A (1994) Aromatic hydroxylation during the myeloperoxidase-oxidase oxidation of hydrazines. *Biochem Pharmacol* **47**, 1039-1046.

Vasquez-Torres A, Jones-Carson J e Balish E (1996) Peroxynitrite contributes to candidacidal activity of nitric oxide-producing macrophages. *Infect. Immun.* **64**, 3127-3133.

Vasquez-Torres A, Jones-Carson J, Mastroeni P, Ischiropoulos H, Fang FC (2000) Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental *Salmonellosis*. I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages *in vitro*. *J. Exp. Med.* **192**, 227-236.

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

Vasquez-Vivar J e Kalyanaraman B (2000) Generation of superoxide from nitric oxide synthase. *FEBS Lett.* **481**, 305-306.

Vásquez-Vivar J, Santos A, Junqueira VBC, Augusto O (1996) Peroxynitrite-mediated formation of free radicals in human plasma. EPR detection of ascorbyl, albumin-thyl and uric acid-derived free radicals. *Biochem. J.* **314**, 869-876.

Volk KJ, Yost RA e Brajter-Toth A (1989) On-line eletrochemistry/ thermospray/ tandem mass spectrometry as a new approach to the study of redox reaction: The oxidation of uric acid. *Anal. Chem.* **61**, 1709-1717.

Vouldoukis I, Riveros-Moreno V, Dugas B, Ouaz F, Bécherel P, Debré P, Moncada S, Mossalayi D (1995) The killing of *Leishmania major* by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the Fcε RII/CD23 surface antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7804-7808.

Weeb JL, Harvey WM, Holden DW, Evans TJ (2001) Macrophage nitric oxide synthase associates with cortical actin but not recruited to phagosomes. *Infect. Imm.* **69**, 6391-6400.

Whiteman M e Halliwell B (1996) Protection against peroxynitrite-dependent tyrosine nitration and alpha 1-antiproteinase inactivation by ascorbic acid. A comparison with other biological antioxidants. *Free Radic. Res.* **25**, 275-283.

Wink DA, Feelisch M, Fukuto J, Chistodoulou D, Jourdain D, Grisham MB, Vodovotz Y, Cook JA, Krishna M, DeGraff WG, Kim S, Gamson J, Mitchell JB (1998) The cytotoxicity of nitroxyl: possible implications for the pathophysiological role of NO. *Arch. Biochem. Biophys.* **351**, 66-74.

Wolff SP (1994) Ferrous iron oxidation in presence of ferric ion indicator xilenol orange for measurement of hydroperoxides. *Methods. Enzymol.* **233**, 182-189.

Zhung JC e Wogan GN (1997) Growth and viability of macrophages continuously stimulated to produce nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 11875-11880.