INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo
2004

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**PRODUÇÃO E ALVOS BIOLÓGICOS DE DIÓXIDO DE
NITROGÊNIO E ANION RADICAL CARBONATO**
PRODUÇÃO A PARTIR DE PEROXINITRITO-DIÓXIDO DE CARBONO,
SUPERÓXIDO DISMUTASE E XANTINA OXIDASE

MARCELO GIALLUISI BONINI

TESE DE DOUTORADO

Orientadora : Profa. Dra. OHARA AUGUSTO

SÃO PAULO

2004

T 0
574.192
B175p

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

Ficha Catalográfica

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

Bonini, Marcelo Gialluisi

B175p Produção e alvos biológicos de dióxido de nitrogênio e anion
radical carbonato : produção a partir de peroxinitrito-dióxido
de carbono, superóxido dismutase e xantina oxidase / Marcelo
Gialluisi Bonini. -- São Paulo, 2004.
123p

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador : Ohara, Augusto

1. Radical livre : Bioquímica 2. Química biológica I. T.
II. Ohara, Augusto, orientador.

574.192 CDD

“Produção e alvos biológicos de dióxido de nitrogênio e anion radical carbonato.

Produção a partir de peroxinitrito-dióxido de carbono, superóxido dismutase e xantina oxidase”

MARCELO GIALLUISI BONINI

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(o) por:

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

Profa. Dra. ALÍCIA JULIANA KOWALTOWSKI
IQ – USP

Profa. Dra. ANA CAMPA
FCF – USP

Prof. Dr. ROGÉRIO MENEGHINI
LNLS

Prof. Dr. RAFAEL RADI ISOLA
ULR – Uruguai

SÃO PAULO
27 DE FEVEREIRO 2004

À meus pais Elisabeth e Antônio Carlos e avós Celeste e Pedro, pelo apoio, compreensão, e preciosos exemplos que construíram bases sólidas para a minha formação pessoal e profissional. Este trabalho é sem dúvida de vocês também.

À minha orientadora Profa. Dra. Ohara Augusto, pela amizade e confiança, pela extraordinária orientação e pelo empenho com que conduziu nossos trabalhos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, criador das mais belas obras e fonte maior de amor e conhecimento, pelas oportunidades, concessões, apoio...

À meus avós Celeste e Pedro, pela presença constante e amorosa, pelos preciosos anos de extraordinária convivência e pela participação decisiva e proveitosa na minha formação.

À meus pais Elisabeth e Antônio Carlos, pelo apoio incondicional, pelo amor e amizade, pelo incentivo e pela torcida, sem os quais certamente não teria chegado até aqui.

À minha segunda família, Airton Léo, Ana Heloísa, Áurea Maria, Sr. Airton e D. Haidé Manoel, Dá, Diógenes, Tia Leni e família pela amizade, acolhida e por todos os momentos compartilhados.

À Silvia e família pela orientação, conselhos, exemplos e amizade.

À Patrícia pela torcida e apoio.

Aos meus avós Rosa e Carlos, pela torcida, pelo carinho e pelos exemplos.

Aos tios Gilson, Laura, Rosa Maria, Arnaldo, Ana Maria, e primos Carolina, Leandro e Jú, pelo carinho e convívio divertido.

À Denise pela convivência divertida no laboratório, pela companhia em tantos almoços e pela amizade de sempre.

Aos amigos do DIS, Márcia Elisa, Gilmar, Fina, Sueli, Elvira, Norma, Camila, Dirce, Marina, Regina, Patrícia, Henrique, Zuleika pela oportunidade de aprender, pela amizade e pelo precioso convívio.

Aos amigos Roberta, Daniel, Thaís Helena, Cláudia e Paulo pelo carinho e pela presença em tantos bons momentos.

Aos Drs. Rafael Radi, Ronald P. Mason, Alícia J. Kowaltowski, Paolo di Mascio, Marisa Helena G. de Medeiros, Walter Colli, Hugo Armelin, Bayardo Torres, Etelvino Bechara, Iolanda M. Cuccovia e Dulcinéia S. P. Abdalla pelas discussões, sugestões, conselhos sobre o caminho a seguir e empréstimo de reagentes e equipamentos.

À “Tia” Houri por ajudar-me a realizar meu primeiro grande sonho.

Aos amigos do laboratório Sônia, Tatiana, Célio X., Lia, Angélica, Danilo, Berê, Henrique, Sandra e Daniel pelos ensinamentos, pela oportunidade de aprender a ensinar, e pelos exemplos; e de outros laboratórios Thelma, Ivan, Paula e Érico, Wendel, Maria Amélia, Giselle, Sayuri, Janice, Sabrina, Alcides, Gláucia, Remo, André e Guilherme pelas dicas, empréstimos e colaborações produtivas.

Aos funcionários do Instituto de Química da Universidade de São Paulo e da biblioteca do conjunto das químicas que contribuíram para a realização deste trabalho.

A Ohara, pelas inúmeras oportunidades de trabalho e aprendizado, pela excelente e constante orientação, pela confiança e amizade.

À todos que de alguma forma contribuíram para minha formação, mostrando algumas vezes como fazer e outras vezes como não fazer.

Finalmente , à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) à FINEP e ao CNPQ pelo apoio financeiro.

...” E como é que eu, por exemplo, me tranquilizarei? Onde estão as minhas causas primeiras em que me apóie? Onde estão os fundamentos? Onde irei buscá-los? Faço exercício mental e, por conseguinte, em mim, cada causa primeira arrasta imediatamente atrás de si outra, ainda anterior, e assim por diante, até o infinito...”

Fiódor Dostoiévski, romancista russo, em “Memórias do subsolo”, 1864.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	i
RESUMO.....	iii
SUMMARY.....	iv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Óxido nítrico, ânion radical superóxido e peroxinitrito: Produção e Propriedades.....	4
1.2. Interação entre peroxinitrito e tempol.....	11
1.3. Produção enzimática de $\bullet\text{NO}_2$ e $\text{CO}_3^{\bullet-}$	13
<i>1.3.1 Produção de radicais $\text{CO}_3^{\bullet-}$ e $\bullet\text{NO}_2$ pela atividade peroxidásica da Cu, Zn-SOD.....</i>	13
<i>1.3.2. Produção de radicais $\text{CO}_3^{\bullet-}$ durante o “turnover” da enzima XOD</i>	15
1.4 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica.....	17
<i>1.4.1. Espectroscopia paramagnética eletrônica associada à técnica do captador de spin.....</i>	22
<i>1.4.2. Espectrometria de ressonância paramagnética eletrônica associada à técnica de “Freeze Trapping”</i>	24
<i>1.4.3. Espectrometria paramagnética eletrônica associada à técnicas de cinética rápida.....</i>	25
2. OBJETIVOS.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1 Reagentes.....	27
3.2. Dosagem de grupos tióis livres.....	29
3.3. Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica – EPR.....	29
<i>3.3.1. EPR de Fluxo Contínuo.....</i>	29
<i>3.3.2. EPR estático à temperatura ambiente.....</i>	29
<i>3.3.3 EPR estático associado à técnica do captador de spin.....</i>	30
3.4. Consumo / Evolução de Oxigênio.....	30
3.5. Análise de NO_2^- , NO_3^- e $\bullet\text{NO}$ por quimioluminescência.....	30
3.6. Estudos de cinética rápida (stopped flow)	31
3.7. Captação de ácido sulfênico por NBD-Cl.....	31

3.8. Atividade enzimática da XOD.....	31
3.9. Oxidação da DHR.....	32
3.10. Ensaios de emissão de luz.....	32
3.11. LC/MS- Espectrometria de massas.....	32
3.12. Cálculos.....	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1. Detecção direta do ânion radical carbonato por EPR de fluxo em misturas de peroxinitrito e CO ₂	36
4.2. Efeito do par HCO ₃ ⁻ /CO ₂ sobre a oxidação de biotióis mediada por peroxinitrito.....	40
4.3. Mecanismo pelo qual o tempol direciona a reatividade do peroxinitrito para a formação de espécies nitrosantes.....	48
4.4. Produção de radicais [•] NO ₂ e CO ₃ ^{•-} pela atividade de peroxidase da Cu, Zn-SOD.....	59
4.5 Produção de radicais CO ₃ ^{•-} durante o "turnover" da enzima xantina oxidase (XOD)	72
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	84
6. REFERÊNCIAS.....	90
APÊNDICE.....	109
CURRICULUM VITAE.....	111

ABREVIATURAS

AA	Acetaldeído
ALS	Esclerose lateral amiotrófica
BM	Biomolécula genérica
BSA	Albumina de soro bovino
DBNBS	5,5'-dibromo-4-nitrosobenzeno sulfonato
DHR	Dihidrorodamina 1,2,3
DMPO	5,5-dimetil-pirrolina- <i>N</i> -óxido
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DOPA	3-hidroxi-tirosina
DTNB	5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzoato)
EPR	Ressonância paramagnética eletrônica
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
GSH	Glutathiona
Hb	Hemoglobina
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IgG	Imunoglobulina
LPS	lipopolisacarídeo
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NBD-Cl	7-cloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3, diazol
Peroxinitrito ONOO⁻	termo genérico inclui as formas ácida e aniônica ONOOH +
PBN	α -fenil- <i>N</i> - <i>t</i> -butil nitrona
POBN	α -(4-piridil-1-óxido)- <i>N</i> - <i>t</i> -butil nitrona
SOD	Superóxido dismutase

Tempol/TPL	2,2,6,6-tetrametil-piperidina-1-oxila
XO	Xantina
XOD	Xantina Oxidase

RESUMO

Peroxinitrito ($\text{ONOO}^- + \text{ONOOH}$), o produto da reação controlada por difusão do óxido nítrico com o ânion radical superóxido, tem recebido muita atenção como possível mediador dos efeitos deletérios associados a uma superprodução de óxido nítrico. O peroxinitrito é um potente oxidante que é capaz de oxidar e nitrar várias biomoléculas cujos mecanismos contribuimos para esclarecer. Particularmente relevante foi demonstrar inequivocamente, por EPR de fluxo, que a rápida reação entre peroxinitrito e o biologicamente abundante dióxido de carbono, produz dióxido de nitrogênio e ânion radical carbonato em rendimentos de aproximadamente 35%. Sugerimos então, que o peroxinitrito deveria atuar na maioria dos ambientes biológicos através de seus radicais derivados que produziriam radicais de biomoléculas. Consubstanciamos essa sugestão pelo estudo da oxidação dos biotióis cisteína, glutathiona e BSA-cys34 por peroxinitrito e peroxinitrito/dióxido de carbono. Também, demonstramos que a reação entre o nitróxido tempol e os radicais derivados do peroxinitrito é uma etapa relevante para que o tempol redirecione a reatividade do peroxinitrito de nitração para nitrosação de biomoléculas. Finalmente, demonstramos que existem outras potenciais fontes biológicas de dióxido de nitrogênio e anion radical carbonato como a atividade peroxidásica da enzima superóxido dismutase e a enzima xantina oxidase.

SUMMARY

Peroxynitrite ($\text{ONOO}^- + \text{ONOOH}$), which is formed by the diffusion-controlled reaction between nitric oxide and superoxide anion, has been receiving increasing attention as a mediator of the deleterious effects associated with an overproduction of nitric oxide. Peroxynitrite is a strong oxidant that is able to oxidize and nitrate a variety of biotargets by mechanisms that this work has contributed to establish. Particularly relevant, was the unequivocal demonstration by rapid flow EPR that the rapid reaction between peroxynitrite and the biologically ubiquitous carbon dioxide produces nitrogen dioxide and carbonate radical anion in yields of around 35%. This led us to suggest that in most biological environments peroxynitrite would act through its derived radicals that would oxidize biomolecules to radicals. This hypothesis was clearly supported by our studies of biothiol (cysteine, glutathione and BSA-cys34) oxidation by peroxynitrite and peroxynitrite/carbon dioxide. In addition, we demonstrated that the reaction between the nitroxide tempol and peroxynitrite-derived radicals is an important step of the mechanism by which tempol diverts peroxynitrite reactivity from nitration to nitrosation of biomolecules. Finally, we demonstrated that there are other potential sources of nitrogen dioxide and carbonate radical anion such as the peroxidase activity of the enzyme Cu,Zn-superoxide dismutase and the enzyme xanthine oxidase turnover.

1. INTRODUÇÃO

O emprego do oxigênio no metabolismo trouxe inquestionáveis vantagens energéticas para os organismos que se adaptaram à sua utilização. No entanto, novos intermediários metabólicos derivados do oxigênio, alguns bastante oxidantes, passaram a ser produzidos obrigando os organismos aeróbios a desenvolverem defesas e estratégias sofisticadas para sua proteção.

A evolução dos estudos sobre os papéis de oxidantes e radicais livres em sistemas biológicos remonta aos anos 30 quando se demonstrou que a exposição de células à radiação leva à formação de radicais livres e concomitantemente, à mutação e morte celular. Estes estudos, levaram à generalização de que radicais livres seriam produzidos em organismos vivos a partir de fontes exógenas e seriam exclusivamente deletérios. A formação endógena de radicais livres passou a ser considerada seriamente a partir da caracterização da enzima superóxido dismutase por McCord & Fridovich no final da década de 60 [para uma revisão McCord, *et al.*, 1971]. Nos vários estudos que se seguiram ficou claramente estabelecido que radicais livres são também produzidos durante o metabolismo normal, principalmente a partir da redução incompleta do oxigênio na cadeia mitocondrial de transporte de elétrons (vide reações 1-4), no metabolismo de xenobióticos e durante o combate a microorganismos invasores. Todos os oxidantes até então identificados eram derivados do oxigênio molecular o que levou ao conceito amplo de espécies reativas de oxigênio (ROS), “reactive oxygen species”.

Permaneceu dominante a idéia de que radicais livres seriam deletérios aos organismos vivos e esta generalização foi reforçada com a caracterização de várias enzimas envolvidas na destruição de espécies reativas, tais como: superóxido dismutases dependentes de diversos metais (Fe, Cu, Zn, Mn), catalase e glutathione peroxidase, e de enzimas envolvidas no reparo à biomoléculas oxidadas. Este período, foi especialmente fértil para a área e estendeu-se até o final do século XX levando à um grande acúmulo de informações sobre a oxidação de biomoléculas *in vitro* (sistemas químicos, enzimáticos, e células em cultura) e *in vivo* (animais experimentais e humanos) (para uma revisão Halliwell & Gutteridge, 1999; Cerutti, 1985]. Paralelamente, vários antioxidantes de baixo peso molecular e enzimas capazes de reparar DNA oxidado e mais recentemente, proteínas oxidadas em resíduos de metionina e tióis foram sendo caracterizados. Neste período, foi formulado o conceito de estresse oxidativo definido como uma situação em que ocorreria um desbalanço entre oxidantes e antioxidantes com predomínio dos primeiros [Sies, 1987]. Também relevante, situações de estresse oxidativo foram extensivamente associadas a processos degenerativos como envelhecimento, câncer, inflamações, infecções, etc.

Ao final do século XX, diversos pesquisadores já colocavam a hipótese de que radicais livres e oxidantes derivados do oxigênio pudessem participar de processos fisiológicos normais. Por exemplo, foi demonstrado neste período, que a produção de oxidantes e radicais livres derivados do oxigênio está associada a um combate efetivo à microorganismos invasores [Murray, 1982; Baxter, *et al.*, 1983; Morgenstern, *et al.*, 1997; Mardiney, *et al.*, 1997; Murray & Nathan, 1999]. Nestes casos, uma rápida produção de $O_2^{\bullet-}$ mediada pela enzima NADPH oxidase principalmente [Babior, *et al.*, 2002; Babior, 1995] leva à geração de peróxido de hidrogênio e oxidantes derivados, capazes de comprometer o bom funcionamento celular propiciando a destruição dos

patógenos invasores. Mais recentemente, além das espécies reativas de oxigênio já conhecidas, novos intermediários oxidantes foram adicionados ao arsenal de armas anti-sépticas utilizadas no combate à patógenos. Foi demonstrado que a ligação de anticorpos a determinados antígenos propicia a produção de ozônio através da oxidação da H_2O mediada pelo anticorpo, que utiliza oxigênio singlete como comburente. O ozônio é um oxidante extremamente poderoso que produzido nas vizinhanças do patógeno deve contribuir para sua eliminação [Nathan, 2003; Babior, *et al.*, 2003; Marx, 2002].

Também neste período, a demonstração de que o óxido nítrico é produzido enzimaticamente através da oxidação do aminoácido arginina contribuiu para colocar em xeque a idéia de que radicais livres seriam exclusivamente deletérios à organismos vivos. O óxido nítrico, um radical livre pequeno, difusível através de membranas biológicas, logo se mostrou imprescindível à uma série de processos fisiológicos vitais como o controle da pressão sangüínea, a transmissão nervosa e a resposta imunológica [para uma revisão, Ignarro, 2002; Moncada, *et al.*, 1991]. A descoberta da síntese e dos papéis do óxido nítrico em mamíferos ocasionou uma revolução na Biologia e na Medicina ao demonstrar, por exemplo, que receptores não são imprescindíveis em mecanismos de transdução de sinais. A descoberta afetou também relações sociais ao propiciar o lançamento e comercialização do medicamento Viagra. Claramente, estes eventos modificaram profundamente os paradigmas existentes. Na visão atual, oxidantes e radicais livres são produzidos em organismos vivos a partir de fontes endógenas e exógenas e suas concentrações são controladas dentro de limites estreitos. Em concentrações “adequadas” alguns radicais livres são essenciais para a manutenção da homeostase celular. No entanto, a falta ou excesso de tais espécies pode levar à disfunções e danos que vão do comprometimento da resposta imune contra patógenos à modificações oxidativas de biomoléculas e mutações no DNA que podem disparar

processos carcinogênicos ou a morte celular. Por outro lado, aumentos transientes na concentração de “oxidantes mais específicos/menos reativos” como o peróxido de hidrogênio, que *in vivo* deve reagir eficientemente com tióis e metionina, estão associados à processos de sinalização e regulação da proliferação celular [Griendling & Ushio-Fukai, 2000; Reth, 2002, Brookes, *et al.*, 2002].

Deve-se notar ainda, que a descoberta da produção enzimática de $\bullet\text{NO}$ trouxe para foco biológico oxidantes até então pouco considerados em Biologia. Hoje a literatura refere-se também à espécies reativas de nitrogênio (RNS) “reactive nitrogen species”. Dentre estes o dióxido de nitrogênio ($\bullet\text{NO}_2$) e o peroxinitrito têm recebido especial atenção devido às suas possíveis participações na promoção de dano oxidativo associado à condições inflamatórias e infecciosas.

Desta forma, ficou mais complexo e sutil elucidar quais são os papéis de radicais livres e oxidantes biológicos em processos fisiológicos e patológicos. Parte central deste processo é a compreensão de como tais espécies são produzidas, interagem entre si e reagem com componentes celulares. Estabelecer os mecanismos de atuação fisiológico ou deletério e conhecer os alvos biológicos destes oxidantes, é pois, essencial para o desenvolvimento de terapias eficientes que minimizem o dano oxidativo associado à processos inflamatórios sem comprometer a eliminação de patógenos invasores protagonistas de infecções.

1.1. Óxido nítrico, ânion radical superóxido e peroxinitrito: Produção e Propriedades.

O $\bullet\text{NO}$ é produzido por células de mamíferos e presumivelmente em plantas [Chandok, *et al.*, 2003; Ignarro, 2002; Xie, *et al.*, 1992] através da atividade enzimática

de óxido nítrico sintases sobre o aminoácido L-arginina que é convertido em L-citrulina. Nesta reação o grupo guanidino do aminoácido é oxidado pela enzima produzindo $\bullet\text{NO}$. O $\bullet\text{NO}$ tem alto coeficiente de difusão ($D = 3,300 \mu\text{m}^2/\text{s}$) devido ao seu pequeno raio molecular e ausência de carga e é capaz de difundir livremente através de ambientes aquosos e membranas biológicas. Grupos tióis, ferro-enxofre e heme apresentam elevadas constantes de reação bimolecular com o $\bullet\text{NO}$ o que lhes confere a capacidade de reagir seletivamente com o radical [Moncada, *et al.*, 1991; Whittle, *et al.*, 1992; Hanafy, *et al.*, 2001].

Em condições fisiológicas, estima-se que enzimas $\bullet\text{NO}$ -sintases constitutivas (isoformas neuronal e endotelial) mantenham a concentração basal de $\bullet\text{NO}$ em níveis da ordem de alguns nanomolar. No entanto, sob determinados estímulos a enzima $\bullet\text{NO}$ -sintase indutível pode ser expressa elevando os níveis de $\bullet\text{NO}$ de duas a três ordens de grandeza [Lowenstein, *et al.*, 1992; Lyons, *et al.*, 1992]. Nestas concentrações, devido à dependência de um choque trimolecular desta reação, o $\bullet\text{NO}$ tem maior tendência de reagir com oxigênio molecular produzindo $\bullet\text{NO}_2$, (reação 5) ($E^\circ = 0,99 \text{ V}$) [Koppenol, *et al.*, 1992]. O $\bullet\text{NO}_2$ é capaz de produzir dano oxidativo em diversos tipos de biomoléculas, como proteínas, lipídeos e DNA.

O $\text{O}_2^{\bullet-}$ é produzido continuamente por organismos aeróbios seja como produto da transferência de elétrons de redutores diretamente para o O_2 por via enzimática [Fridovich, 1970; Misra, & Fridovich, 1971; Markert, *et al.*, 1984; Babior, *et al.*, 2002], no metabolismo de xenobióticos [Gherssi-Egea, *et al.*, 1998; Krainev, *et al.*, 1998; Bayol-Denizot, *et al.*, 2000] ou na redução incompleta do oxigênio pela cadeia mitocondrial de transporte de elétrons [Boveris & Cadenas, 1975; Boveris, 1976; St-Pierre, *et al.*, 2002;

Korshunov, *et al.*, 1997]. Esta última é possivelmente responsável por grande parte de todo o $O_2^{\bullet-}$ produzido em condições fisiológicas normais.

Uma fonte especialmente importante de $O_2^{\bullet-}$, é a enzima β -nicotinamida-adenina dinucleotídeo 3'-fosfato oxidase (NADPH oxidase), que transfere elétrons do NADPH diretamente para o oxigênio molecular. As sub-unidades desta enzima encontram-se presentes por exemplo em neutrófilos e macrófagos que sob estimulação adequada promovem sua “montagem” e utilizam-na como fonte de $O_2^{\bullet-}$ e consequentemente H_2O_2 úteis na defesa do organismo contra patógenos [Babior, *et al.*, 2002].

Apesar de seu caráter radicalar, o $O_2^{\bullet-}$ apresenta limitada reatividade frente a compostos diamagnéticos, comportando-se quando desprotonado ($pK_a = 4,8$) preferencialmente como redutor $E^\circ = -0,33 \text{ V}$ [Buettner, 1993]. No entanto, frente a compostos paramagnéticos o superóxido reage com constantes de velocidade elevadas. Possíveis alvos importantes *in vivo* são os centros metálicos e grupos ferro-enxofre de proteínas.

Sob condições fisiológicas normais, boa parte do $O_2^{\bullet-}$ produzido é capturada pelas enzimas superóxido dismutases, devido principalmente às altas concentrações de enzima presentes na maioria das células e tecidos ($\sim 10\mu\text{M}$) e às constantes de velocidade extremamente elevadas que caracterizam a reação de dismutação ($> 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [Felix, *et al.*, 1993; Pick, *et al.*, 1974]. Por esse motivo e devido ao seu caráter aniônico a difusão do superóxido em ambientes fisiológicos é bastante restrita.

Em 1990, a pesquisa sobre a produção e atuação do $^*\text{NO}$ *in vivo* estava entrando em uma fase de ebulição. Nesta época, o peroxinitrito permanecia como uma curiosidade de laboratório e completamente ausente da literatura na área biológica até que Beckman e colaboradores vislumbraram a possibilidade de que o peroxinitrito pudesse ser produzido em determinadas condições patológicas. De fato, em tecidos submetidos à inflamações

ambos $\cdot\text{NO}$ e $\text{O}_2\cdot^-$ são produzidos em concentrações aumentadas em relação aos níveis basais favorecendo a produção do oxidante. O peroxinitrito é o produto da condensação controlada pela difusão ($k = 6.7 - 19 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [Huie & Padmaja, 1993; Kissner, *et al*, 1997] dos radicais livres $\cdot\text{NO}$ e $\text{O}_2\cdot^-$ (vide esquema 1).

Neste trabalho seminal publicado em 1990, Beckman e colaboradores propuseram que o peroxinitrito seria uma fonte endógena de radicais $\cdot\text{OH}$ independente de metais de transição, sendo potencialmente, o efector de dano oxidativo frequentemente associado à uma superprodução de $\cdot\text{NO}$ [Beckman, *et al.*, 1990].

Esquema 1 – Representação esquemática da produção de peroxinitrito a partir de $\text{O}_2\cdot^-$ e

$\cdot\text{NO}$. *concentrações fisiológicas.

O período que se seguiu à publicação deste trabalho pioneiro foi conturbado para a área e marcado por um rápido acúmulo de dados experimentais e cálculos termodinâmicos controversos. No foco das discussões, estava a geração de radicais livres na decomposição do peroxinitrito. Apesar de o ânion peroxinitrito (ONOO^-) ser relativamente estável, o seu ácido conjugado (ONOOH) ($\text{pK}_a = 6,6$) [Merényi, *et al.*, 1998] decai rapidamente ($k = 0,17 \text{ s}^{-1}$ a 25°C , $\text{pH } 7,4$). Além disso, alguns trabalhos da época indicavam que o peroxinitrito é um agente fortemente oxidante e que diretamente (reações que envolvem transferência de dois elétrons) ou por via radicalar pode reagir com praticamente todas as classes de biomoléculas provocando oxidações e nitrações (vide esquema 2) [Radi, *et al.*, 1991; Darley-USmar, *et al.*, 1992; Radi, *et al.*, 1993; Hogg, *et al.*, 1993]. No entanto, cálculos termodinâmicos, grande parte dos quais publicados por Koppenol e colaboradores, indicavam que a produção de radicais livres na decomposição do peroxinitrito seria insignificante e que as oxidações produzidas seriam mediadas por um conformero ativado do peroxinitrito, cuja real identidade permaneceu não esclarecida [vide por exemplo Koppenol, *et al.*, 1992; Koppenol, 1998].

Nos anos que se seguiram, novos estudos foram conduzidos e mais dados a favor da produção de radicais livres na decomposição do peroxinitrito foram obtidos. Dentre eles, a captação de radicais $\bullet\text{OH}$ através da utilização de DMPO evidenciada por EPR em 1994 [Augusto, *et al.*, 1994], e a demonstração da formação de diversos radicais derivados de biomoléculas em diversos sistemas expostos ao peroxinitrito [Pietraforte & Minetti, 1998; Gatti, *et al.*, 1998; Quijano, *et al.*, 1997; Vásquez-Vivar, *et al.*, 1996; Gatti, *et al.*, 1994]. Além disso, foi demonstrado que o CO_2 , presente em elevadas concentrações em praticamente todos os fluidos biológicos é um alvo extremamente importante do peroxinitrito *in vivo* juntamente com hemoproteínas e tióis [Radi, *et al.*, 1999; Uppu, *et al.*, 1997; Lyman & Hurst, 1996; Denicola, *et al.*, 1996] (vide Tabela 1).

Em meados da década de 90 já se sabia que em presença de CO_2 o peroxinitrito se decompõe ainda mais rapidamente produzindo intermediários oxidantes. Também neste caso, diversas evidências experimentais apontavam um papel importante de radicais livres ($\text{CO}_3^{\bullet-}$ e $^{\bullet}\text{NO}_2$) nas oxidações e nitrações mediadas pelo peroxinitrito em presença de CO_2 .

Neste contexto, iniciamos nossos estudos sobre os mecanismos pelos quais o peroxinitrito se decompõe em presença de CO_2 e oxida biotióis de alto e baixo peso molecular. Os resultados obtidos apresentados nesta tese, contribuíram para esclarecer as controvérsias que impossibilitaram o entendimento da reatividade do peroxinitrito durante toda a década de 90 e para estabelecer o oxidante como um provável gerador de radicais livres em ambientes biológicos.

Esquema 2 - Representação esquemática das possíveis rotas de decomposição do peroxinitrito *in vivo* e suas reações com biomoléculas (BM). BM-H e BMox representam genericamente biomoléculas reduzidas e oxidadas respectivamente.

Tabela 1 – Constantes de reação bimolecular entre o peroxinitrito e algumas biomoléculas.

Composto	k (M ⁻¹ s ⁻¹)	Referência
Dióxido de carbono	5,7 x 10 ⁴	Lyman & Hurst, 1995
Piruvato	100	Vásquez-Vivar, <i>et al.</i> , 1997
Urato	480	Santos, <i>et al.</i> , 1999
Glutathione	660	Bonini & Augusto, 2001
Albumina-SH	9,7 x 10 ³	Alvarez, <i>et al.</i> , 1999
Ácido Ascórbico	234	Squadrito, <i>et al.</i> , 1995
Citocromo C (II)	2,3 x 10 ⁵	Thomson, <i>et al.</i> , 1995
Glutathione Peroxidase	8,0 x 10 ⁶	Briviba, <i>et al.</i> , 1998
(oxi) Hemoglobina	1,0 x 10 ⁴	Denicola, <i>et al.</i> , 1998
Mn, Superóxido Dismutase	2,5 x 10 ⁴	Quijano, <i>et al.</i> , 2001

1.2. Interação entre peroxinitrito e tempol

O tempol é um radical livre nítróxido permeável a membranas, largamente utilizado no campo da ressonância paramagnética eletrônica devido a sua estabilidade peculiar [Mehlhorn & Keith, 1972]. Além de permitir a calibração de equipamentos e servir como padrão para quantificação do rendimento de radicais livres produzidos em diversos sistemas, os nítróxidos têm sido utilizados como moléculas repórter para elucidar detalhes estruturais de proteínas e membranas [Shafer, *et al.* 2003; Borbatt, *et*

al., 2001; Husted & Beth, 1999] e de suas interações com drogas [Aracava, *et al.*, 1981; Schreier, *et al.*, 2000]. Além disso, nitróxidos vêm sendo utilizados como antioxidantes em diversos modelos inflamatórios e infecciosos [Cuzzocrea, *et al.*, 2001; Cuzzocrea, *et al.*, 2000]. É sabido da literatura que o tempol pode atuar *in vivo* acelerando a dismutação do ânion radical $O_2^{\bullet-}$ analogamente à atividade da enzima superóxido dismutase. Tal propriedade associada à permeabilidade notável em membranas e à ausência de toxicidade do tempol têm sido apontadas como as principais razões da eficiência do nitróxido como antioxidante.

Mais recentemente, foi demonstrado que além de inibir dano oxidativo a tecidos submetidos à inflamação, o tempol é capaz de diminuir eficientemente a produção de resíduos de proteína nitrados [Cuzzocrea, *et al.*, 2001; Cuzzocrea, *et al.*, 2000]. Apesar de muitos sistemas de inquestionável relevância biológica serem potenciais agentes nitrantes, o sistema peroxinitrito/ CO_2 é especialmente eficiente.

A demonstração de que quantidades sub-estequiométricas de tempol inibem eficientemente a nitração de fenol [Carroll, *et al.*, 2000] e resíduos de tirosina em proteína (dados não publicados) mediadas por peroxinitrito, tornam provável que além da reconhecida atividade SOD-mimética, o tempol atue também sobre outros processos, tais como a produção e decomposição do peroxinitrito *in vivo*.

Além da inibição da nitração de fenol, Carroll e colaboradores notaram que tempol potencializava a produção de compostos nitrosados. Para explicar tais observações, os autores propuseram um mecanismo de interação entre o tempol e o peroxinitrito complexo, dependente em grande parte de reações sem precedentes na literatura e em desacordo com a química conhecida do peroxinitrito e do tempol [Carroll, *et al.*, 2000]. Desta forma, julgamos fundamental a realização de estudos complementares mais detalhados. Os resultados, apresentados nesta tese, levaram à proposição de um

mecanismo consistente com dados recorrentes e de acordo com as reatividades de nitróxidos e do peroxinitrito estabelecidas.

1.3. Produção enzimática de $\bullet\text{NO}_2$ e $\text{CO}_3^{\bullet-}$.

1.3.1 Produção de radicais $\text{CO}_3^{\bullet-}$ e $\bullet\text{NO}_2$ pela atividade peroxidásica da Cu, Zn-SOD.

O nitrito, presente nos fluidos biológicos (0,5-210 μM) [Green, *et al.*, 1982; Gaston, *et al.*, 1993; Leone, *et al.*, 1994], deve ser uma importante fonte endógena de $\bullet\text{NO}_2$. Além da dieta, parte do NO_2^- é proveniente da auto-oxidação do $\bullet\text{NO}$ produzido endogenamente e da redução de NO_3^- por bactérias simbióticas presentes no trato digestivo. Em condições fisiológicas, o nitrito pode ser oxidado a $\bullet\text{NO}_2$ através de reações catalisadas por enzimas com atividade peroxidásica. Um modelo clássico de peroxidase é a enzima vegetal peroxidase de raiz forte que utiliza H_2O_2 para oxidar diversos compostos por via radicalar. A primeira etapa da catálise envolve a reação entre o grupo heme da enzima e o peróxido produzindo um intermediário oxidante denominado composto I [$\text{P}^+\bullet\text{Fe}(\text{IV} = \text{O})$] (esquema 3). O recebimento de um elétron do substrato produz o composto II [$\text{PFe}=\text{O}$] e um radical livre derivado do substrato. A forma nativa da enzima é regenerada pelo recebimento de mais um elétron de um

Esquema 3. Mecanismo de oxidação de um substrato genérico (R) por uma enzima peroxidase.

substrato qualquer (esquema 3). Os potenciais redox dos intermediários oxidantes produzidos na interação de peroxidases com H_2O_2 varia, mas valores da ordem de 1,0 - 1,3 V têm sido reportados [Mason, 1987; Dunford, 1995; Fuertmuller, *et al.*, 2003]. Estes potenciais redox são suficientemente altos para promover a oxidação de nitrito a $\bullet\text{NO}_2$ ($E^\circ = 0,99$ V) mas não de HCO_3^- a $\text{CO}_3^{\bullet-}$ ($E^\circ = 1,8$ V). De fato, tem sido demonstrado que diversas peroxidases de mamíferos oxidam NO_2^- a $\bullet\text{NO}_2$ em condições fisiológicas [Mason, 1987; Dunford, 1995; Reszka, *et al.*, 1999; van Dalen, *et al.*, 2000]. Além das peroxidases, outras heme-proteínas podem eventualmente catalisar a oxidação de substratos por mecanismos análogos em presença de peróxidos.

É conhecido desde meados da década de 70 que em presença de H_2O_2 em excesso, a isoforma SOD1 (intracelular, dependente de Cu e Zn) é capaz de promover a peroxidação de diversos compostos de baixo peso molecular *in vitro* [Hodgson & Fridovich, 1975]. Mais recentemente, foi demonstrado por diversos autores que a

atividade de peroxidase das isoformas de superóxido dismutase dependentes de cobre e zinco (SOD1 e SOD3, extracelular) é dependente de HCO_3^- [Liochev, & Fridovich, 2002; Zhang, *et al.*, 2002; Hink, *et al.*, 2002; Zhang, *et al.*, 2000; Goss, *et al.*, 1999; Sankarapandi & Zweier, 1999]. No entanto, os mecanismos pelos quais as enzimas SOD1 e SOD3 exercem sua atividade peroxidásica e o papel do HCO_3^- permanecem em discussão. Parte dos resultados experimentais disponíveis indicam que $\text{CO}_3^{\bullet-}$ deve estar envolvido nestas oxidações. Para comprovar a formação de $\text{CO}_3^{\bullet-}$ pelo sistema Cu, Zn-SOD/ H_2O_2 / HCO_3^- estudos adicionais foram realizados e serão apresentados nesta tese.

1.3.2. Produção de radicais $\text{CO}_3^{\bullet-}$ durante o “turnover” da enzima XOD.

Xantina oxidase e xantina desidrogenase são formas interconvertíveis da mesma metaloenzima. A xantina oxidase é composta por uma estrutura complexa que envolve centros metálicos tipo ferro-enxofre, molibdopterina, e flavina-adenina dinucleotídeo (FAD). A xantina oxidase está envolvida no metabolismo de purinas sendo responsável pela oxidação de hipoxantina a xantina e esta última a ácido úrico. Os elétrons retirados do substrato no sítio do molibdênio fluem por centros ferro-enxofre e são entregues para o FAD ligado à enzima que finalmente reduz o oxigênio molecular produzindo $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 em rendimentos que variam de acordo com o substrato e a abundância de oxigênio dissolvido [para uma revisão aprofundada recomenda-se Harrison, 2002; Hodges, *et al.*, 2000; Hille & Nishino, 1995]. Apesar de ser uma enzima bastante estudada, novos papéis vêm sendo descritos para a XOD como a provável produção de peroxinitrito quando a enzima é incubada em presença de um substrato doador de elétrons e NO_2^- [Millar, *et al.*, 2002; Godber, *et al.*, 2000]. Tal propriedade de gerar espécies reativas levou diversos pesquisadores a propor um possível papel da XOD na promoção de lesões associadas a

estresse oxidativo em condições inflamatórias e de isquemia-reperfusão, além de uma possível função microbicida no leite onde a enzima está presente em abundância.

Já na segunda metade da década de 70 Hodgson & Fridovich baseados em estudos de emissão de luz em incubações de XOD/acetaldéido (AA) a pH alcalinos dependente de HCO_3^- , propuseram que este sistema seria gerador de radicais $\text{CO}_3^{\bullet-}$. Os autores propuseram a produção de radicais $^{\bullet}\text{OH}$ por mecanismos de Fenton e a oxidação de CO_3^{2-} a $\text{CO}_3^{\bullet-}$. Mais recentemente, Ingold e colaboradores [Hodges, *et al.*, 2000] propuseram que uma transferência de elétrons mais rápida que a transferência de prótons para o oxigênio molecular poderia gerar no sítio ativo da XOD um intermediário peróxido desprotonado. Baseados nesta proposta, formulamos uma hipótese alternativa publicada em recente artigo de revisão [Augusto, *et al.*, 2002] para a produção de radicais $\text{CO}_3^{\bullet-}$ durante o "turnover" da XOD. De acordo com esta hipótese, de uma maneira análoga ao peroxinitrito o peróxido desprotonado atacaria (adição nucleofílica) a dupla carbonila do CO_2 gerando um intermediário peroxicarbonato. A homólise deste intermediário ou heterólise promovida pelo recebimento de um elétron geraria radicais $\text{CO}_3^{\bullet-}$ em pH fisiológico (Esquema 4).

Esquema 4. Produção de $\text{CO}_3^{\bullet-}$ pela xantina oxidase. S representa um doador de elétrons genérico e P_1H o sítio de redução de oxigênio.

1.4 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica .

A espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) foi descoberta em 1944 por Zavoisky e desde então têm sido amplamente utilizada para a caracterização e estudo de propriedades magnéticas e estruturais de radicais livres e complexos metálicos.

De maneira geral, a técnica se baseia na aplicação de um campo magnético externo perpendicular à amostra da ordem de milhares de Gauss (KG), responsável pela geração de dois estados de spin energeticamente não equivalentes representados por populações de elétrons com spins orientados a favor do campo (situação de baixa energia) e contra o campo externo (situação de alta energia). Esse efeito, denominado efeito

Zeeman, possibilita que na condição de ressonância, particular a cada radical livre ou complexo metálico paramagnético, os elétrons desemparelhados alinhados a favor do campo ($m_s = -1/2$) absorvam energia reorientando seu momento magnético de spin contra o campo externo (vide esquema 5). Esta absorção de energia pode ser detectada pelo espectrômetro de EPR e é responsável pela geração do sinal apresentado por convenção como a primeira derivada do pico de absorção. Essas relações encontram-se matematicamente expressas na equação :

$$\Delta E = h\nu = g \beta B \quad (\text{equação 1})$$

onde ΔE = diferença de energia entre os dados de spin $m_s = + 1/2$ e $- 1/2$

h = constante de Planck ($6,62608 \times 10^{-34}$ Js)

ν = frequência na faixa de microondas; para espectrômetros operando na banda X entre 9-10 GHz

g = constante de proporcionalidade denominada valor g

β = magneton de Bohr ($9,274 \times 10^{-24}$ J T⁻¹)

B = campo magnético externo

De acordo com a equação supra mencionada, o valor g dependerá do campo magnético aplicado e da diferença energética entre os estados de spin dos elétrons desemparelhados. Na condição de ressonância a absorção de energia pela amostra permite determinar o valor de g . Para o elétron livre o valor g estimado é igual a 2,0023. Para a maioria dos radicais livres (principalmente os centrados em carbono, oxigênio, enxofre e nitrogênio) o valor de g é bastante próximo de 2, mas pequenas, porém significativas diferenças representam valiosas ferramentas que auxiliam na identificação de cada radical. Para complexos metálicos, a forte interação do(s) elétron(s)

desemparelhado(s) com o núcleo do átomo, provoca grandes alterações no valor de g que pode freqüentemente atingir valores na região de $g = 4$ e $g = 6$.

Os elétrons desemparelhados interagem com pequenos campos magnéticos locais gerados pelo spin nuclear de determinados átomos das vizinhanças. Tal propriedade permite muitas vezes, retirar importantes informações sobre a estrutura do radical detectado e contribui de forma decisiva para sua identificação. Dentre os átomos que possuem spin nuclear, os núcleos de ^1H , ^{14}N e ^{13}C merecem especial atenção devido à sua presença freqüente como componentes de grande variedade de biomoléculas e no caso de ^1H e ^{14}N às suas elevadas abundâncias isotópicas. Diversos compostos isotopicamente marcados com ^{15}N e ^{13}C encontram-se comercialmente disponíveis e são, em geral, muito úteis para a caracterização de diversos radicais livres relevantes na área biológica.

A presença dos núcleos desses átomos nas vizinhanças do elétron desemparelhado provocam a geração de fracos campos magnéticos locais que se adicionam ao campo magnético externo provocando o desdobramento do sinal de EPR em múltiplas linhas componentes. O número de linhas geradas depende do número de núcleos e do número de spin nuclear próximos ao elétron desemparelhado e pode ser determinado pela equação 2.

$$N = 2I + 1 \quad \text{(equação 2)}$$

Onde N = número de linhas do espectro de EPR obtido

I = spin nuclear total nas proximidades do elétron desemparelhado

A distância entre as linhas de um espectro de EPR ou constante de desdobramento hiperfino depende da proximidade do núcleo portador de spin do elétron desemparelhado

e por esse motivo é outro parâmetro muito utilizado na identificação e caracterização de diferentes espécies radicalares. A capacidade da espectroscopia de EPR de fornecer importantes informações sobre a estrutura e identidade dos radicais livres, bem como sua elevada sensibilidade (capaz de detectar concentrações de radicais entre nM - μ M) tem promovido a ampla utilização da técnica em diversas áreas do conhecimento como Biologia, Medicina, Química, Ciências de Materiais. Nestas áreas, a técnica tem dado contribuições importantes para a compreensão de processos que envolvem a transferência de elétrons, geração de radicais livres e tem possibilitado a obtenção de informações sobre a organização de membranas e micelas bem como a avaliação da acessibilidade de diferentes compostos a esses ambientes [Aracava, *et al.*, 1981; Shafer, *et al.*, 2003]. Mais recentemente, grandes esforços têm sido realizados na tentativa de implementar a técnica tornando-a capaz de fornecer diagnósticos por imagem, o que seria especialmente útil na área oncológica [Gallez, *et al.*, 1996; Kuppusamy, *et al.* 2002].

Esquema 5. Representação esquemática do efeito de um campo magnético externo aplicado sobre o momento magnético de spin eletrônico (m_s) ou Efeito Zeeman. ΔE é a diferença entre as energias associadas às duas orientações possíveis do spin eletrônico inserido num campo magnético.

1.4.1. Espectroscopia paramagnética eletrônica associada à técnica do captador de spin.

Apesar da versatilidade da técnica de EPR, o tempo de vida extremamente curto da maioria dos radicais livres, reflexo de suas altas reatividades, impede que concentrações de estado estacionário mínimas sejam atingidas em solução à temperatura ambiente, impossibilitando suas detecções diretas. Desta forma, alguns artifícios são, em geral, requeridos para imobilizar ou derivatizar o radical possibilitando seu estudo. Dentre as metodologias mais utilizadas, está a técnica do captador de spin que se beneficia da propriedade de muitos radicais adicionarem-se a grupos nitrona e nitroso gerando radicais derivados nitróxidos mais estáveis, que podem ser detectados (esquema 6).

Esquema 6. Representação esquemática da captação de radicais livres reativos por captadores de spin portadores dos grupos funcionais nitrona ou nitroso.

Dentre os captadores de spin mais utilizados o DMPO ocupa posição de destaque devido à sua capacidade de reagir eficientemente com radicais livres centrados em enxofre, carbono e oxigênio de elevado interesse biológico, gerando radicais nitróxidos adutos relativamente estáveis. Bancos de dados gratuitos bastante completos estão atualmente disponíveis e apresentam listadas as constantes de desdobramento hiperfino de diversos radicais livres adutos dos captadores de spin convencionais produzidos em uma grande variedade de sistemas (<http://epr.niehs.nih.gov/stdb.html>). No entanto, grande parte dos radicais livres adutos gerados apresentam constantes de desdobramento hiperfino similares impossibilitando a identificação inequívoca dos radicais captados somente por estes parâmetros. Felizmente, alguns radicais livres de elevado interesse biológico como: $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2\cdot^-$ e tiila produzem adutos bastante característicos, por exemplo com DMPO, o que tem possibilitado seus estudos.

Condição fundamental para captação de radicais livres é a utilização de altas concentrações do captador de spin (em geral da ordem de dezenas de mM) que deverá competir com os demais componentes do sistema pelos radicais livres gerados. Em sistemas *in vitro*, onde as condições experimentais podem em geral ser controladas, a captação de radicais não impõe maiores dificuldades à utilização da técnica do captador de spin. No entanto, trabalhos com células em cultura e animais experimentais exigem cuidados e atenção especiais. Em geral, os maiores problemas associados a esses sistemas são as muitas reações secundárias nas quais os radicais livres podem envolver-se o causa a geração de radicais secundários que também são captados gerando espectros de EPR compostos de difícil interpretação. Além disso, os radicais adutos podem ser metabolizados sendo reduzidos/oxidados, e se tornam invisíveis por EPR. De forma similar, trabalhos com fluidos biológicos, em geral, apresentam grandes desafios pois a presença de concentrações relativamente elevadas de antioxidantes, metais de transição e

oxigênio podem levar a geração de espécies reativas e radicais livres durante o manuseio das amostras pela reação de Haber-Weiss. Mesmo assim, controles rigorosos criteriosamente planejados e a utilização de metabólitos isotopicamente marcados têm permitido a obtenção de informações relevantes sobre a formação e reatividade biológica de radicais livres sob diversas condições fisiológicas e patológicas *in vivo*, através da técnica do captador de spin [vide como exemplo Hix, *et al.* 2000; Nakao, *et al.*, 2000].

1.4.2. Espectrometria de ressonância paramagnética eletrônica associada à técnica de “Freeze Trapping”

Outra técnica que possibilita a detecção por EPR de radicais livres e espécies paramagnéticas é o congelamento à temperatura de nitrogênio líquido (77 K). Em geral, as amostras são rapidamente imersas em nitrogênio líquido ou em misturas de etanol e gelo seco, após o processamento necessário. Após congelamento, as amostras são transferidas para um “dewar” equipado com dedo frio preenchido com nitrogênio líquido. O equipamento é então inserido na cavidade do espectrômetro para análise. O congelamento quase imediato das amostras aprisiona os radicais gerados em matrizes sólidas que restringem sua difusão impedindo assim, reações que rapidamente os consumiriam.

Infelizmente as baixíssimas temperaturas utilizadas para impedir a difusão e conseqüentes reações destes radicais também impõe significativas restrições ao movimento de livre rotação no eixo de ligações químicas nas moléculas. Os espectros fortemente anisotrópicos obtidos em geral dificultam a identificação do radical livre. Apesar de sua limitada utilidade no estudo de radicais livres orgânicos, a técnica de “freeze trapping” tem sido empregada no estudo de complexos metálicos paramagnéticos com grande sucesso. Um exemplo importante é o complexo formado entre o radical $\cdot\text{NO}$

e o grupo heme de proteínas, que tem sido largamente utilizado como evidência da produção de $\bullet\text{NO}$ em diversos sistemas biológicos [vide como exemplo Giorgio, *et al.*, 1998].

1.4.3. Espectrometria paramagnética eletrônica associada à técnicas de cinética rápida.

Devido ao tempo de vida limitado de diversos radicais livres, em muitas ocasiões é necessário empregar sistemas de fluxo que permitem a geração de quantidades apreciáveis destas espécies reativas nas vizinhanças do sítio de detecção. Em geral, é possível registrar espectros mili-segundos após a mistura das soluções utilizando-se equipamentos comerciais comuns. Em comparação com as técnicas já apresentadas, este método tem a vantagem de permitir o registro direto do espectro do radical produzido em solução aquosa o que é muitas vezes suficiente para sua identificação e caracterização. No entanto, a necessidade de produzir concentrações consideráveis de radicais livres continuamente, tem inviabilizado a utilização desta técnica em estudos com enzimas, proteínas e outros sistemas de relevância biológica devido ao custo elevado destes produtos ou à reduzida quantidade de amostras, em geral, disponível.

2. OBJETIVOS

O objetivo inicial desse trabalho foi compreender o mecanismo e as consequências da interação do peroxinitrito com dióxido de carbono. Demonstramos inequivocamente por EPR, que esta interação produz dióxido de nitrogênio e ânion radical carbonato em rendimentos próximos a 35% (um valor que também foi obtido por outros autores usando metodologias indiretas). Como consequência, sugerimos que *in vivo*, devido às altas concentrações de dióxido de carbono em equilíbrio com bicarbonato, o peroxinitrito deveria atuar através de seus radicais derivados e oxidar biomoléculas por mecanismos de um elétron. Para suportar esta sugestão, estudamos os efeitos de dióxido de carbono sobre a oxidação de biotióis como cisteína, glutatona e BSA-Cys34. Também, reavaliamos a interação do nitróxido tempol, um antioxidante anteriormente descrito como seqüestrador de peroxinitrito, com o oxidante. Finalmente, tendo contribuído para trazer para o foco biológico os radicais dióxido de nitrogênio e ânion radical carbonato, particularmente o último, procuramos outras possíveis fontes biológicas destas espécies.

3. Materiais e Métodos

3.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram adquiridos de Merck, Aldrich, Sigma, Roche, Fluka ou Fisher e eram de grau analítico ou superior. O bicarbonato de sódio isotopicamente marcado foi obtido de Isotec (Miamisburg, OH, USA) e continha aproximadamente 98% de ^{13}C .

O peroxinitrito utilizado foi sintetizado a partir de nitrito (0,6 M) e peróxido de hidrogênio (0,65 M) em um reator tipo “quenched flow” [Bonini, *et al*, 1999]. À solução amarela e límpida obtida foi adicionado dióxido de manganês para remoção do excedente de peróxido de hidrogênio. A solução foi agitada em uma cuba com gelo, por aproximadamente 30 minutos ou até que a evolução de gás cessasse. Após tal tratamento, alíquotas de peroxinitrito foram tomadas para análise de nitrito e peróxido de hidrogênio contaminantes. Para a análise de nitrito procedeu-se a diluição do peroxinitrito obtido para 10 mM final em tampão acetato/ácido acético (pH 4,0). Após 5 minutos de incubação a solução teve seu pH elevado e o nitrito foi quantificado espectrofotometricamente ($\epsilon_{354\text{nm}} = 24,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). O peróxido de hidrogênio remanescente também foi quantificado por espectrofotometria ($\epsilon_{240\text{nm}} = 43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Tipicamente nitrito e peróxido de hidrogênio apresentaram concentrações entre 20 - 35 % e, menor que 1% da concentração de peroxinitrito respectivamente. As concentrações de peroxinitrito nas soluções estoque também foram aferidas por espectrofotometria imediatamente antes dos experimentos de cada dia ($\epsilon_{302\text{nm}} = 1.670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [Koppenol, *et al.*, 1996].

As concentrações de CO₂ foram calculadas a partir da concentração de bicarbonato adicionado em cada tampão através da equação de Henderson-Hasselbalch, considerando-se $pK_{a_{HCO_3^-/CO_2}} = 6,4$ [Dean, 1979].

O DMPO utilizado foi purificado por destilação a vácuo e dosado espectrofotometricamente ($\epsilon_{234nm} = 7.700 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, dissolvido em etanol).

O DBNBS foi sintetizado a partir do ácido 3,5-dibromosulfanílico conforme descrito anteriormente [Kaur *et al.*, 1981]. Brevemente, um grama do ácido 3,5-dibromosulfanílico foi dissolvido em 8,5 mL de solvente preparado através da dissolução de 0,205 g de acetato de sódio anidro em 15 mL de ácido acético glacial contendo 2,0 mL de H₂O₂ 30 %. Após a dissolução o volume foi completado para 10 mL. A solução foi mantida à temperatura ambiente por 14 dias protegida da luz. Após esse período filtrou-se o precipitado obtido que foi cuidadosamente macerado e lavado repetidas vezes com etanol gelado. A secagem foi feita com fluxos demorados de ar para remover eficientemente o etanol.

Os tampões e água utilizados foram tratados previamente com Chelex-100 a fim de minimizar possíveis contaminações com íons metálicos.

Todas as soluções foram preparadas com água bidestilada purificada em um sistema Milli-Q da Millipore.

A albumina de soro bovino (BSA) foi previamente tratada com β -mercaptoetanol (relação molar 1:5 respectivamente) por no mínimo 4 horas à temperatura ambiente ou overnight à 4°C para redução do grupo tiol (resíduo Cys 34) eventualmente oxidado durante o processamento e estoque. O excesso de β -mercaptoetanol foi removido através de diálise (tipicamente 2-5 mL de solução de proteína contra tampão fosfato 4 x 2L /25 mM, pH 7,0), seguido por uma última diálise contra tampão fosfato pH 7,4 (250 mM). A percentagem de recuperação de tiol variou entre 70 - 90% da concentração total de

proteína conforme aferido espectrofotometricamente pelo método de Ellman descrito a seguir.

3.2. Dosagem de grupos tióis livres

A dosagem dos grupos tióis livres de glutathiona, cisteína ou albumina de soro bovino foi realizada através da incubação de alíquotas contendo esses compostos com ácido ditiobis-2-nitrobenzóico (reagente de Ellman) à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). Após esse período a concentração de ácido tio-2-nitrobenzóico ($\epsilon_{412} = 13.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) foi determinada espectrofotometricamente como descrito anteriormente [Quijano, *et al.*, 1997; Zhang, *et al.*, 1997].

3.3. Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica – EPR

3.3.1. EPR de Fluxo Contínuo – Os espectros de EPR foram registrados a temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), em um espectrômetro de EPR Bruker EMX, operando a 9,7 GHz (banda X) e 100 KHz de modulação de campo equipado com uma cavidade de ER4117 D-MTV com 9 mm de distância entre a câmara de mistura e o centro da cavidade. As soluções foram colocadas em seringas plásticas para infusão em fluxos controlados. Para isso utilizou-se uma bomba de fluxo (Harvard apparatus pump 22) e fluxos de 6 - 20 mL/min que permitiram o registro dos espectros entre 1,0 e 12 ms após a mistura. Nos experimentos com peroxinitrito, devido ao alto conteúdo de NaOH utilizado para sua conservação, as soluções foram coletadas para aferição do pH final após a mistura.

3.3.2. *EPR estático à temperatura ambiente* – Os espectros de EPR foram registrados à temperatura ambiente em uma “flat cell” após os tempos de incubação indicados. O campo magnético foi calibrado utilizando-se o radical estável 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxila, tempol, ($g = 2,0056$) [Melhorn & Keith, 1972]. Estimativas de concentração de radical obtidas por EPR foram realizadas tomando-se por padrão soluções de concentrações conhecidas deste radical.

3.3.3 *EPR estático associado à técnica do captador de spin* - Os espectros de EPR foram registrados conforme descrito acima (vide item 3.3.2.).

3.4. Consumo / Evolução de Oxigênio

O oxigênio consumido ou produzido nos sistemas estudados foi quantificado em um oxígrafo Gilson 5/6 a 25 °C. A concentração de saturação à esta temperatura foi tomada como 250 μM e o aparelho calibrado com ditionito de sódio.

3.5. Análise de NO_2^- , NO_3^- e $\bullet\text{NO}$ por quimioluminescência

As concentrações de $\bullet\text{NO}$, NO_2^- e NO_3^- produzidas em incubações de peroxinitrito em presença e ausência de tempol foram realizadas utilizando-se um analisador de $\bullet\text{NO}$ (NOA^{TM208}, Sievers Instruments, Inc., Boulder, CO, USA). As concentrações de $\bullet\text{NO}$ foram determinadas injetando-se alíquotas de peroxinitrito diluído para 1mM em tampão fosfato, pH 7,5, 2 minutos após sua adição ao tampão diretamente na câmara de análise do aparelho. No caso do nitrito e (nitrito + nitrato), soluções contendo peroxinitrito, na ausência e na presença de dióxido de carbono e tempol foram incubadas por 15 minutos

em diversos pH e diluídas 10 vezes em água previamente à análise. Aliquotas retiradas para análise de nitrito foram injetadas na câmara análise previamente preenchida com solução saturada de iodeto de sódio em ácido acético 50% à temperatura ambiente. No caso de análises da concentração de nitrito + nitrato a câmara de análise foi preenchida com solução de VCl_3 em ácido clorídrico 1 M e mantida a 90 °C. Soluções de nitrito de sódio autêntico e de concentrações conhecidas foram utilizadas como padrão para quantificação.

3.6. Estudos de cinética rápida (stopped flow)

A velocidade de decomposição do peroxinitrito em presença e em ausência de tempol foi monitorada em um espectrofotômetro de fluxo interrompido (Applied Photophysics SX-18MV) a 302 nm [Gatti, *et al.*, 1998]. A temperatura foi mantida constante ($25 \pm 0,2$ °C) e as soluções coletadas após mistura para verificação do pH final.

3.7. Captação de ácido sulfênico por NBD-Cl.

Aliquotas das incubações foram tomadas em vários tempos e a reação foi interrompida por diluição com uma solução contendo catalase e NBD-Cl para uma concentração final de 20 U/ml e 0,1 mM respectivamente. O NBD-Cl foi adicionado em excesso (2:1) em relação molar à BSA. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, a solução foi filtrada através de filtros de corte de massa Centricon de 10 kDa, e lavadas algumas vezes com tampão fosfato. As soluções foram ressuspensas em tampão fosfato e os espectros de absorção foram registrados em um espectrofotômetro Aminco SL-2000.

3.8. Atividade enzimática da XOD

A atividade da xantina oxidase foi aferida diariamente antes dos experimentos, acompanhando-se a oxidação da xantina (0,1 mM) a ácido úrico ($\epsilon_{295} = 9.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a 295 nm por 5 minutos à 25 °C e pH 7,4 (tampão fosfato 0,1 M).

3.9. Oxidação da DHR

Para os ensaios nos quais DHR foi empregada concentrações máximas de 80 μM foram utilizadas devido à baixa solubilidade da sonda em água. A oxidação da DHR e conseqüente produção de rodamina foi acompanhada espectrofotometricamente a 500 nm ($\epsilon_{500} = 78.800 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

3.10. Ensaios de emissão de luz

A emissão de luz pelo sistema XOD/AA e peroxinitrito em presença e em ausência de HCO_3^- na região do visível foi medida com um “photoncounter”. O instrumento “photoncounter” foi construído e consistiu de um tubo fotomultiplicador (Thor EMI 9658 AM) resfriado à -20 °C por um refrigerador termoelétrico (FACT 50MKIII, EMI Gencom, Palinview, NY, USA). O potencial aplicado à fotomultiplicadora foi de -1200 V. A saída do tubo foi conectada a um amplificador (modelo 1121, Princeton Instruments, NJ, USA), transmissor dos sinais para o computador. As emissões de luz foram selecionadas em faixas de comprimento de onda específicos com a ajuda de filtros ópticos “cut-off” (Melles Griot visible filters) posicionados entre a cubeta e a

fotomultiplicadora. Os filtros utilizados bloqueavam a passagem da radiação com comprimentos de onda menores que os especificados nominalmente com eficiência superior a 90 % e os escolhidos foram : 435 nm; 495 nm; 540 nm; 590 nm; 610 nm e 630 nm.

3.11. LC/MS- Espectrometria de massas

As incubações de XOD em presença de acetaldeído e DMPO foram analisadas por espectrometria de massas após separação cromatográfica de seus componentes. Tipicamente as incubações foram mantidas à temperatura ambiente por 4 horas para permitir o máximo acúmulo de adutos de DMPO e seu decaimento à nitrona correspondente. Após esse período as misturas foram refrigeradas em geladeira “overnight” e injetadas em um equipamento de HPLC composto de uma bomba LC 10ADVP conectada à um injetor automático SIL-10ADVP (Shimadzu, Tokyo, Japan). O sistema foi equipado com uma coluna 150 x 4.6 mm Supelco C-18 de fase reversa (tamanho de partícula 5 µm) e uma pré-coluna 20 x 2.1 mm Supelco, C-18 de fase reversa (tamanho de partícula 5 µm) conectadas a um “photodiode array” (Shimadzu, SPM-M10AVVP). As colunas foram eluídas com uma mistura água/acetonitrila (5 % v/v) pH 3,0 a um fluxo de 1,0 ml/min. Os dados foram coletados usando o software Shimadzu CLASS-VP, versão 5.3. As análises por espectrometria de massas por ionização à pressão atmosférica (ESI) no modo iônico positivo foram realizadas utilizando um espectrômetro de massas Plataform II (Micromass, Altricham, U. K.). A temperatura do capilar foi mantida em 110°C. OS adutos de DMPO com o radical hidroxila foram analisados com uma voltagem de cone de 30 V. A varredura foi feita na região de massa/carga entre 50 - 150 m/z.

3.12. Cálculos

3.12.1. – Cinética

Todos os cálculos aqui apresentados foram baseados em constantes de velocidade de reação bimolecular tabeladas em <http://allen.rad.nd.edu/Solnkin1> (para radicais livres - Universidade de Notre Dame, Indiana, USA) ou constantes designadas no texto e tabelas. Para os cálculos de tempo de meia vida ($t_{1/2}$) calcularam-se as constantes aparentes de decaimento considerando-se as constantes de reação bimolecular e as concentrações dos reagentes conforme equação (A).

$$k_{app} = k_x [X] + k_y [Y] + k_z [Z] \quad \text{equação (A)}$$

Após o cálculo da constante k_{app} aplicou-se a relação:

$$t_{1/2} = \ln 2 / K_{app} \sim 0,69 / k_{app}$$

Através das equações diferenciais de velocidade foi possível avaliar a quantidade de peroxinitrito que deve reagir com tióis (RSH), CO_2 ou decair nas condições experimentais utilizadas como demonstrado a seguir :

$$-d[\text{ONOO}^-]/dt = -k_d[\text{ONOO}^-] - k_{\text{RSH}}[\text{RSH}] [\text{ONOO}^-] - k_{\text{CO}_2} [\text{CO}_2] [\text{ONOO}^-] = -(k_d + k_{\text{RSH}}[\text{RSH}] + k_{\text{CO}_2}[\text{CO}_2]) [\text{ONOO}^-]$$

$$\% \text{ de } \text{ONOO}^- \text{ que deve reagir com } \text{CO}_2 = k_{\text{CO}_2}[\text{CO}_2] / k_d + k_{\text{RSH}}[\text{RSH}] + k_{\text{CO}_2}[\text{CO}_2] \times 100.$$

Onde k_d é a constante de decaimento (s^{-1}) e k_{RSH} , k_{CO_2} são as constantes de reação bimolecular do peroxinitrito com tióis ($660 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, para GSH, pH 7,4, 25°C) e CO_2 ($2,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pH 7,4, 25°C) respectivamente.

3.12.2. – Desvios

Exceto quando indicado, os desvios calculados para os pontos experimentais são desvios médios padrão para três experimentos independentes.

$$d = \sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 / (n-1)}$$

, onde d = desvio padrão

x_i = ponto experimental

$\bar{x}$ = média aritmética dos valores experimentais

n = número de pontos

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Detecção direta do ânion radical carbonato por EPR de fluxo em misturas de peroxinitrito e CO₂.

Até o final da década de 90 a produção de radicais livres a partir do peroxinitrito permanecia discutível. Diversas tentativas realizadas para demonstrar inequivocamente a formação de radicais na decomposição do oxidante se mostraram infrutíferas. Dentre as possibilidades ainda não testadas, estudos de EPR de fluxo pareceram atraentes para detectar o ânion radical carbonato. Realizamos, então, estudos de EPR de fluxo contínuo de misturas de peroxinitrito e HCO₃⁻/CO₂. De fato, a mistura em fluxo de soluções alcalinas de ONOO⁻ (0,08 mM – 25 mM) com HCO₃⁻/CO₂ (preferencialmente em excesso) permitiu a detecção de um sinal de EPR singlete relativamente largo (5,5 G) consistente com o espectro esperado para um radical composto exclusivamente por átomos sem “spin” nuclear como o CO₃^{•-} (espectros representativos na Figura 1B-D). Para identificação inequívoca do radical, o bicarbonato (H¹²CO₃⁻) foi substituído por bicarbonato isotopicamente marcado H¹³CO₃⁻ (98 %), o que levou à detecção de um espectro dubleto (a_{13C} = 11,3 G) consistente com a presença de um núcleo com “spin” nuclear igual a ½ (Figura 1E). Este dado, juntamente com os parâmetros de EPR consistentes com os do radical CO₃^{•-} produzido em solução através da oxidação de HCO₃⁻ por SO₄^{•-} [Chawla & Fessenden, 1975] permitiu comprovar que CO₃^{•-} é de fato, um produto da decomposição do peroxinitrito em presença de HCO₃⁻/CO₂. Além disso, a ausência de desdobramentos no espectro do radical obtido com H¹²CO₃⁻/¹²CO₂ em toda a faixa de pH estudada (6 - 9) sugere que em ambientes fisiológicos o radical deve estar negativamente carregado (desprotonado). Devido ao seu caráter aniônico o radical CO₃^{•-} deve ter uma ação efetiva como oxidante em ambientes aquosos ou em interfaces de

proteínas e membranas com tais meios. O rendimento de radicais nas misturas de ONOO^- e $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ correlacionou-se precisamente com os pKas do peroxinitrito (6,6) [Merenyi, *et al.*, 1998]

Figura 1. Espectros de EPR do radical $\text{CO}_3^{\bullet-}$ produzido em misturas de peroxinitrito (0,08-1 mM) e HCO_3^- (10 mM) em tampão fosfato (0,25 M, pH 6,9) a temperatura ambiente. (A) peroxinitrito previamente decomposto; (B) 0,08 mM peroxinitrito; (C) 0,3 mM peroxinitrito; (D) 1 mM peroxinitrito; (E) 1 mM peroxinitrito em presença de $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$. Condições instrumentais: Potência 20 mW; Frequência, 9,65 GHz; Amplitude de Modulação, 5 G; constante de tempo, 164 ms; tempo de varredura, 168 s; ganho, $1,12 \times 10^5$. Os espectros foram registrados utilizando-se um fluxo de 14 ml/min de soluções equivalente a um tempo de observação de aproximadamente 1,5 ms.

e do par $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ (6,4) [Dean, 1979] sendo a máxima produção de radicais a pH 6,5 aproximadamente entre os pKa do peroxinitrito e do par bicarbonato/ácido

carbônico, o que é consistente com a reação entre o ONOO^- predominante acima do pH 6,6 e CO_2 mais abundante abaixo do pH 6,4 (Figura 2).

Figura 2. Rendimento do radical $\text{CO}_3^{\bullet-}$ em diferentes pH produzido em misturas de peroxinitrito (10 mM) e HCO_3^- (50 mM). Os rendimentos de radicais estão expressos em unidades arbitrárias e são relativos às alturas dos picos do espectro de EPR obtido. As soluções de HCO_3^- foram preparadas em tampão fosfato (1 M) de vários pH que foi checado após as misturas para detectar qualquer alteração devido à adição de soluções básicas de ONOO^- . As variações de pH detectadas foram inferiores a 0,2 unidades de pH e a média dos valores de pH finais foi utilizada na construção do gráfico. O fluxo utilizado foi de 14 ml/min. O gráfico acima mostrado representa o resultado de uma série de experimentos realizados no mesmo dia com as mesmas preparações de ONOO^- e HCO_3^- . No entanto dados similares foram obtidos com preparações diferentes. Os dados não representam as médias de todos esses resultados devido às dificuldades associadas à obtenção exata dos mesmos pH utilizando tampões e soluções de ONOO^- diferentes.

O rendimento de radicais $\text{CO}_3^{\bullet-}$ em misturas de peroxinitrito (20 mM) e HCO_3^- (100 mM) foi simulado computacionalmente utilizando o software Gepasi 3.2 (Figura 3), (Apêndice). Para esta simulação um rendimento de 35 % de $\text{CO}_3^{\bullet-}$ e $^{\bullet}\text{NO}_2$ foi assumido. Paralelamente, alguns experimentos em fluxos selecionados foram realizados e a concentração de $\text{CO}_3^{\bullet-}$ estimada em cada ponto (Figura 3). Os valores experimentais e os calculados foram similares, principalmente considerando-se que os experimentos geraram concentrações de radicais relativamente baixas, no limite de detecção do espectrômetro de EPR. Desta forma, de acordo com dados previamente disponíveis [Lyman & Hurst 1995; Lyman & Hurst, 1998], os resultados obtidos suportaram um rendimento de radicais $\text{CO}_3^{\bullet-}$ e $^{\bullet}\text{NO}_2$ da ordem de 30-35 % em misturas de peroxinitrito e CO_2 .

Figura 3. Simulação computacional da concentração instantânea de $\text{CO}_3^{\bullet-}$ em misturas de peroxinitrito (20 mM) e HCO_3^- (100 mM) a pH 6,9. Os pontos adicionados à curva são resultados experimentais nos quais o fluxo foi ajustado para os tempos de observação indicados.

4.2. Efeito do par $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ sobre a oxidação de biotióis mediada por peroxinitrito.

Apesar de largamente reconhecido, o efeito do CO_2 sobre as oxidações mediadas pelo peroxinitrito era pouco compreendido. Dados previamente disponíveis na literatura demonstravam que o CO_2 inibia parcialmente a oxidação de tióis mediada por peroxinitrito, mas as metodologias até então empregadas não permitiam distinguir entre oxidação direta (por 2 elétrons) ou radicalar (por um elétron) [Quijano, *et al.*, 1997; Zhang, *et al.*, 1997].

Neste contexto, decidimos reavaliar o efeito do CO_2 sobre a oxidação de biotióis (cisteína, glutatona e albumina) mediada por peroxinitrito. Conforme os dados apresentados na Tabela 2 a adição de $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ (10 mM) à misturas de peroxinitrito (0,5 mM) e glutatona (1 mM) provocou uma inibição de aproximadamente 50% no consumo de tióis confirmando observações anteriores [Zhang, *et al.*, 1997]. A pH 5,4 a adição de $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ não teve efeito aparente no consumo de tióis medido pelo método de Ellman. Resultados bastante semelhantes foram obtidos utilizando-se cisteína como substrato (Tabela 2). Em contrapartida, a quantidade de oxigênio consumida, um diagnóstico da formação de radicais tiila, por misturas de peroxinitrito e glutatona ou cisteína em presença de $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ foi aproximadamente 40% maior para cisteína e glutatona a pH 7,4 (Tabela 2). A pH 5,4 uma pequena inibição no consumo de oxigênio pelo sistema peroxinitrito/RSH pôde ser notada quando $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ (Tabela 2) foi adicionado. Estes dados indicavam que a pH 7,4 o CO_2 re-direciona a reatividade do peroxinitrito no sentido da formação de radicais livres derivados de tióis. Conforme simulações mostradas na Tabela 2 o rendimento de tióis oxidados a pH 7,4 em presença de CO_2 foi similar ao rendimento esperado de radicais livres produzidos na decomposição

do peroxinitrito. A pH 5,4 a protonação mais rápida e conseqüente decomposição do peroxinitrito, produz radicais $\cdot\text{OH}$ e $\cdot\text{NO}_2$ tornando provável que a oxidação de tióis se dê preferencialmente por via radicalar tanto em presença quanto em ausência de CO_2 .

Assim, para caracterizar as espécies radicalares produzidas nestes sistemas procederam-se estudos de EPR de fluxo de misturas de glutathiona ou cisteína e peroxinitrito em presença e em ausência de CO_2 a pH 5,4 e 7,4.

Tabela 2. Comparação dos rendimentos experimentais e simulados de produtos oxidados de tióis formados durante a oxidação de 1 mM GSH ou cisteína por 0,5 mM peroxinitrito em presença ou em ausência de 1 mM CO_2 a 25 °C.

Sistema	Tióis consumidos	O_2 consumido	Concentração Calculada de produtos*		
			$\cdot\text{OH} + \cdot\text{NO}_2$	$\text{CO}_3^{\cdot-} + \cdot\text{NO}_2$	GSOH
	mM	μM	mM	mM	mM
GSH, pH 7,4	$0,72 \pm 0,03$	80 ± 5	0,06		0,40
GSH, pH 7,4/ CO_2	$0,36 \pm 0,03$	$110 \pm 2,5$	<0,02	0,32	0,01
GSH, pH 5,4	$0,26 \pm 0,02$	$75 \pm 2,7$	0,26		0,05
GSH, pH 5,4/ CO_2	$0,30 \pm 0,01$	$55 \pm 1,9$	0,10	0,20	0,02
Cys, pH 7,4	$0,60 \pm 0,05$	$75 \pm 2,0$	0,02		0,46
Cys, pH 7,4/ CO_2	$0,36 \pm 0,01$	$80 \pm 2,5$	<0,02	0,32	0,04
Cys, pH 5,4	$0,37 \pm 0,02$	$65 \pm 3,5$	0,20		0,18
Cys, pH 5,4/ CO_2	$0,24 \pm 0,02$	$50 \pm 1,5$	0,10	0,20	0,09

*vide Materiais e Métodos item 3.12

De fato, conforme mostrado na Figura 4B, a mistura em fluxo de soluções de cisteína (5 mM) com peroxinitrito (5 mM) em presença de $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ (50 mM) a pH 7,4 permitiu a detecção de um espectro triplete cujos parâmetros de EPR ($g = 2,0107$) são consistentes com o do radical cisteína-sulfinila ($\text{Cys-SO}^\bullet$). Em ausência de $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ nenhum sinal pôde ser detectado.

Figura 4. Espectros de EPR de fluxo de radicais cisteína-sulfinila produzidos na mistura de cisteína (5 mM) e peroxinitrito (5 mM) em presença ou em ausência de CO_2 (5 mM). (A) em tampão fosfato 0,3 M, pH 7,4; (B) pH 7,4 equilibrado com CO_2 (5 mM); (C) em tampão acetato 0,3 M; (D) em tampão acetato equilibrado com CO_2 (5 mM); (E) o mesmo que B na presença de DMPO (20 mM). Traços de $\text{CO}_3^{\bullet-}$ estão marcados (●). O espectro em E está deslocado no campo devido a diferença no valor g entre os radicais sulfinila e DMPO/•SCys. As concentrações designadas são aquelas obtidas na câmara de reação após a mistura das soluções. Condições instrumentais: Potência 2 mW; constante de tempo 82 ms; velocidade de varredura 0,6 G/s; amplitude de modulação 2 G; ganho, $8,93 \times 10^5$ exceto para o espectro E que foi registrado com $1,78 \times 10^5$. O fluxo utilizado foi de 20 ml/min.

Em pH 5,4 (Figura 4C, D) a adição de $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ causou um pequeno aumento no sinal relativo ao radical cisteína-sulfinila, provavelmente devido a um aumento no fluxo de radicais derivados do peroxinitrito, resultante da decomposição acelerada do oxidante em presença de CO_2 . A adição de DMPO (25 mM) às misturas de tiol e peroxinitrito em presença de $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ permitiu a detecção do aduto DMPO/ $^{\bullet}\text{SCys}$ implicando o radical cisteína-tiila como precursor dos radicais sulfinila detectados diretamente. De fato, a detecção de radicais tiila livres em solução aquosa não é possível, o que torna o emprego de captadores de spin apropriados essencial.

No caso da glutathiona (Figura 5) resultados bastantes similares foram obtidos. Neste caso a detecção do espectro quarteto permitiu a caracterização do radical glutathiona-sulfinila produzido em rendimentos consideráveis apenas a pH 7,4 em presença de $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$. Como no caso anterior, a adição de DMPO (25 mM) a misturas de GSH (5 mM) e peroxinitrito (5 mM) em presença de $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ (50 mM) a pH 7,4 permitiu a detecção do aduto DMPO/ $^{\bullet}\text{SG}$ implicando radicais glutatiila como precursores dos radicais glutathiona-sulfinila detectados diretamente.

Radicais tiila apresentam constantes de reação bimoleculares com oxigênio da ordem de $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Dessa forma, não surpreende que os radicais centrados em enxofre originalmente produzidos nas misturas de peroxinitrito e tióis, tenham-se convertido em radicais sulfinila, através da reação com oxigênio dissolvido nos tampões equilibrados ao ar utilizados. Também é possível afirmar que quantidades significativamente maiores de radicais tiila foram formados em comparação com a quantidade de radicais sulfinila derivados detectada devido principalmente às baixas concentrações de oxigênio presentes nos tampões. Radicais tiila reagem com constantes de velocidade igualmente elevadas entre si e com tiolato excedente, presentes em concentrações similares ao do O_2 nas condições experimentais utilizadas. De acordo com resultados obtidos e as simulações

apresentadas na Tabela 2 pode-se afirmar que os radicais $RS^\bullet$ produzidos em nosso sistema particionaram em reações com O_2 , RS^- e com outros radicais $RS^\bullet$ em percentagens próximas a 1/3.

Figura 5. Espectros de EPR de fluxo de radicais glutationa-sulfínica produzidos na mistura de GSH (5 mM) e peroxinitrito (5 mM) em presença ou em ausência de CO_2 (5 mM). (A) em tampão fosfato 0,3 M, pH 7,4; (B) pH 7,4 equilibrado com CO_2 (5 mM); (C) em tampão acetato 0,3 M; (D) em tampão acetato equilibrado com CO_2 (5 mM); (E) o mesmo que B na presença de DMPO (20 mM). Traços de $CO_3^{\bullet-}$ estão marcados (•). O espectro em E está deslocado no campo devido a diferença no valor g entre os radicais sulfínica e DMPO/•SGSH. As concentrações designadas são aquelas obtidas na câmara de reação após a mistura das soluções. Condições instrumentais: Potência 2 mW; constante de tempo 82 ms; velocidade de varredura 0,6 G/s; amplitude de modulação 2 G; ganho, $8,93 \times 10^5$ exceto para o espectro E que foi registrado com $1,78 \times 10^5$. O fluxo utilizado foi de 20 ml/min.

Experimentos com tampões pré-equilibrados com nitrogênio e com as concentrações de tióis aumentadas (25 mM) permitiram a detecção de radicais dissulfeto (Figura 6) quando peroxinitrito e as soluções de tióis foram misturadas em presença de

$\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$. Neste caso os radicais tiila produzidos, reagiram preferencialmente com o tiolato excedente produzindo radicais cisteína-dissulfeto e glutathiona-dissulfeto, detectáveis por EPR em ausência de oxigênio ou recombinaaram entre si produzindo espécies diamagnéticas.

Figura 6. Espectros de EPR de fluxo de ânions radicais dissulfeto derivados de Cys e GSH produzidos em misturas de peroxinitrito (5 mM) e cisteína ou glutathiona (5 mM) em presença ou em ausência de CO_2 (5 mM) a pH 7,4. (A) GSH; (B) GSH em presença de CO_2 ; (C) Cys; (D) Cys, em presença de CO_2 . As concentrações designadas são aquelas obtidas após a mistura das soluções. O fluxo utilizado foi de 6 ml/min. Condições Instrumentais: Potência, 2 mW; constante de tempo 82 ms; velocidade de varredura, 0,6 G/s; amplitude de modulação, 2 G; ganho, $1,78 \times 10^6$. As linhas sem ruído são simulações computacionais dos espectros $\text{GSSG}^{\bullet-}$ ($a_{2\text{H}} = 6,9$ G; $a_{2\text{H}} = 7,0$ G) e $\text{CysSSCys}^{\bullet-}$ ($a_{2\text{H}} = 6,6$ G; $a_{2\text{H}} = 7,7$ G)

O conjunto dos dados apresentados suporta que o efeito do CO_2 sobre a oxidação de tióis mediada por peroxinitrito é redirecionar a reatividade do oxidante inibindo a oxidação direta e através de seus radicais derivados ($\text{CO}_3^{\bullet-}$ e $^{\bullet}\text{NO}_2$) estimular a produção de radicais livres centrados em enxofre. Estes por sua vez reagem com oxigênio molecular produzindo radicais sulfinila ou com tiol excedente (rota que deve prevalecer *in vivo*) produzindo radicais dissulfeto (vide Esquema 7). Tais radicais em presença de O_2 devem produzir dissulfetos e $\text{O}_2^{\bullet-}$ que pode ser destruído pela enzima superóxido dismutase. No entanto, a produção de radicais tiila e eventualmente de radicais sulfinila bastante reativos podem causar dano significativo a proteínas e estruturas celulares importantes.

Além dos estudos com tióis de baixo peso molecular foi possível estender as conclusões obtidas também para tióis de alto peso molecular. Conforme mostrado na Figura 7, a adição de $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ à incubações de peroxinitrito e albumina de soro bovino em presença do captador de spin POBN (25 mM) permitiram a detecção de sinais referentes a adutos POBN/ $^{\bullet}\text{S}$ -albumina pelo menos duas vezes mais intensos a pH 7,4. O captador de spin POBN reage eficientemente com radicais proteína-cisteinila, mas eventualmente a captação de radicais proteína-tirosila gerados conjuntamente pode levar a geração de adutos cujos espectros são muito similares. Assim, a identidade do radical protéico formado nas incubações de BSA e peroxinitrito em presença e em ausência de CO_2 foi inequivocamente confirmada repetindo-se os experimentos com albumina pré-tratada com N-etil-maleimida, um agente alquilante de grupos tióis. Neste caso, os sinais de EPR de adutos de POBN foram eliminados tanto em ausência como em presença de CO_2 , confirmando o grupo tiol da albumina como um alvo especialmente importante dos radicais derivados do peroxinitrito ($\text{CO}_3^{\bullet-}$ e $^{\bullet}\text{NO}_2$, principalmente) (Figura 7C e D).

Sinteticamente, nossos resultados contribuíram significativamente para uma melhor compreensão dos efeitos do CO_2 sobre a reatividade do peroxinitrito. Claramente demonstrou-se que o CO_2 serve como um excelente “scavenger” de peroxinitrito inibindo sua reação direta com tióis. Paralelamente, a formação de $\text{CO}_3^{\bullet -}$ estimula a produção de radicais tiila, sulfinila e dissulfeto conforme a disponibilidade de oxigênio e tiol excedente (vide esquema 7).

Esquema 7. Representação esquemática das possíveis rotas pelas quais tióis podem ser oxidados por peroxinitrito em presença e em ausência de CO_2 .

Figura 7. Espectros de EPR de fluxo de radicais adutos POBN/*S-Albumina obtidos em incubações de BSA (1 mM) e peroxinitrito (0,5 mM) em presença de POBN (25 mM). (A) em ausência de CO_2 ; (B) em presença de CO_2 (1 mM); (C) o mesmo que (A) mas com BSA pré-tratada com NEM; (D) o mesmo que (B) mas com BSA pré-tratada com NEM. Condições Instrumentais: Potência 20 mW; constante de tempo, 82 ms; velocidade de varredura, 0,6 G/s; amplitude de modulação, 1 G; ganho $8,93 \times 10^5$.

4.3. Mecanismo pelo qual o tempol direciona a reatividade do peroxinitrito para a formação de espécies nitrosantes.

Estudos de cinética de fluxo interrompido (“stopped-flow”) demonstraram que a adição de tempol (1- 10 μM) não altera a velocidade de decomposição do peroxinitrito (1 mM) (dados não mostrados) confirmando que tempol e peroxinitrito não reagem diretamente como anteriormente sugerido [Carroll, *et al.*, 2000]. Em presença de CO_2 (1 mM), no entanto, a adição de tempol (1- 50 μM) provocou uma expressiva aceleração da velocidade de decomposição do peroxinitrito até o limite de 10 μM (Figura 8). Estes resultados indicaram que em presença de CO_2 houve a produção, nas misturas de

peroxinitrito e tempol, de espécies capazes de reagir rapidamente com parte do peroxinitrito restante acelerando sua decomposição.

De acordo com dados previamente publicados [Coddington, *et al.*, 1999] a decomposição do peroxinitrito em tampão fosfato provocou evolução de oxigênio dependente do pH (Figura 9). É sabido que tal liberação de oxigênio é decorrente da oxidação de parte do peroxinitrito pelos radicais $\cdot\text{OH}$ derivados de sua própria decomposição (vide reações 6 - 8):

Em presença de tempol (10 μM) pôde-se observar a liberação de oxigênio em rendimentos de aproximadamente 30 % da concentração inicial de peroxinitrito (1 mM) em toda a faixa de pH estudada (5,4 – 8,1) (Figura 9). A adição de CO_2 às incubações de peroxinitrito em ausência de tempol, inibiu fortemente a liberação de O_2 (Tabela 3) devido a inibição da formação de radicais $\cdot\text{OH}$. Deve-se notar que a oxidação do peroxinitrito pelo radical $\text{CO}_3^{\cdot-}$ é muito menos eficiente que a oxidação promovida por radicais $\cdot\text{OH}$ ($k_{\text{OH}} = 4,8 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $k_{\text{CO}_3^{\cdot-}} = 7,7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Neste caso o radical $\text{CO}_3^{\cdot-}$ deve decair principalmente através da reação com NO_2^- contaminante. A adição de tempol (10 μM) à incubações de peroxinitrito e CO_2 provocou a liberação de oxigênio em rendimentos similares àqueles observados nas incubações de tempol e peroxinitrito e como anteriormente, independente do pH (aproximadamente 30 % da concentração inicial de peroxinitrito) (Tabela 3).

Figura 8. Efeitos do tempol sobre a constante aparente de decomposição do peroxinitrito na presença de CO₂ em tampão fosfato 0,25 M, pH 7,4. Nesses experimentos peroxinitrito (1 mM) foi rapidamente misturado com CO₂ (2,5 mM) em presença das concentrações indicadas de tempol. A constante de decaimento obtida em presença de CO₂ (2,5 mM) e ausência de tempol (36 s⁻¹) foi menor do que a constante de reação bimolecular entre peroxinitrito e CO₂ reportada na literatura ($2,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). A constante de reação bimolecular entre peroxinitrito (200 μM) e CO₂ em excesso foi $1,2 \pm 0,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a pH 7,4 e 25 °C (inserção).

Figura 9. Efeitos do tempol (10 μ M) sobre a liberação de oxigênio (A) e a produção de óxido nítrico (B) formados na decomposição de peroxinitrito (1 mM) a vários pH. Os experimentos foram realizados utilizando-se tampão fosfato (0,25 M) a 25 °C. Os experimentos foram realizados em ausênci (barras cheias) e em presença (barras vazias) de tempol.

Além do rendimento de oxigênio liberado, o rendimento de $\cdot\text{NO}$ bem como de seus produtos estáveis NO_2^- e NO_3^- foi medido. Conforme os dados apresentados na Figura 9 B a adição de tempol à incubações de peroxinitrito em presença de CO_2 permitiu a detecção de níveis expressivos de $\cdot\text{NO}$. No entanto, os níveis de $\cdot\text{NO}$ detectados se mantiveram muito baixos provavelmente devido à rápida reação do $\cdot\text{NO}$ com $\cdot\text{NO}_2$ proveniente da decomposição do peroxinitrito. De fato, os rendimentos de $\cdot\text{NO}$ detectáveis não ultrapassaram 6 % da concentração inicial de peroxinitrito. Assim, uma alternativa para avaliar a produção de $\cdot\text{NO}$ neste sistema foi a quantificação de NO_2^- e NO_3^- , ambos produtos estáveis do decaimento do $\cdot\text{NO}$. Conforme dados mostrados na Tabela 3 o rendimento de NO_2^- (já descontado o NO_2^- contaminante) variou de acordo com o pH de 6 até 25 % da concentração inicial de peroxinitrito entre os pH 5,4 e 7,4 respectivamente. Em presença de CO_2 rendimentos similares foram obtidos, destacando-se uma pequena inibição na produção de NO_2^- no pH 7,4 consistente com uma menor

oxidação do peroxinitrito por radicais $\text{CO}_3^{\bullet-}$ em comparação com radicais $\bullet\text{OH}$ produzidos na decomposição do peroxinitrito a pH baixos mesmo em presença de CO_2 (vide reações 9 - 13).

Tabela 3. Produção de O_2 , NO_2^- e NO_3^- durante a decomposição de peroxinitrito (1 mM) diversas condições experimentais^a.

Sistema	O_2 (mM)	NO_2^- (mM)	$NO_3^- + NO_2^-$ (mM)
PN, pH 5,4	$0,019 \pm 0,005$	$0,060 \pm 0,011$	$0,954 \pm 0,062$
PN + TPL, pH 5,4	$0,266 \pm 0,011$	$0,714 \pm 0,037$	$0,960 \pm 0,053$
PN, pH 6,4	$0,053 \pm 0,007$	$0,145 \pm 0,018$	$0,936 \pm 0,054$
PN + TPL, pH 6,4	$0,277 \pm 0,011$	$0,677 \pm 0,032$	$0,958 \pm 0,036$
PN, pH 7,4	$0,162 \pm 0,011$	$0,255 \pm 0,016$	$0,977 \pm 0,056$
PN + TPL, pH 7,4	$0,349 \pm 0,023$	$0,755 \pm 0,029$	$0,938 \pm 0,049$
PN + CO_2 , pH 5,4	$0,020 \pm 0,004$	$0,084 \pm 0,014$	$0,891 \pm 0,050$
PN + CO_2 + TPL, pH 5,4	$0,265 \pm 0,007$	$0,722 \pm 0,043$	$0,897 \pm 0,059$
PN + CO_2 , pH 6,4	$0,014 \pm 0,005$	$0,118 \pm 0,014$	$0,889 \pm 0,064$
PN + CO_2 + TPL, pH 6,4	$0,282 \pm 0,012$	$0,713 \pm 0,039$	$0,955 \pm 0,047$
PN + CO_2 , pH 7,4	$0,019 \pm 0,005$	$0,179 \pm 0,012$	$0,956 \pm 0,052$
PN + CO_2 + TPL, pH 7,4	$0,350 \pm 0,024$	$0,762 \pm 0,034$	$0,942 \pm 0,044$

^a Quando presentes as concentrações de CO_2 e tempol foram (1 mM e 10 μ M) respectivamente. Os experimentos foram conduzidos em tampão fosfato (0,25 M) a 25 °C. Os valores apresentados são médias de três experimentos independentes. No caso do NO_2^- e NO_3^- os valores já se encontram corrigidos relativamente a concentração de NO_2^- e de NO_3^- proveniente nas soluções de peroxinitrito.

Em presença de tempol os rendimentos de NO_2^- elevaram-se para aproximadamente 70% da concentração inicial do peroxinitrito independentemente do pH

ou da presença de CO_2 indicando expressiva produção de $\cdot\text{NO}$ no sistema. Interessante, o rendimento de oxigênio e NO_2^- obtidos em presença de tempol (30 % e 70 % respectivamente) foram comparáveis ao rendimento de radicais livres esperado, produzidos no decaimento do peroxinitrito tanto em presença quanto em ausência de CO_2 . Além disso, a formação de NO_2^- em razão estequiométrica aproximada de 2:1 em relação ao oxigênio liberado sugere fortemente a ocorrência da reação entre $\cdot\text{NO}$ e $\cdot\text{NO}_2$ ambos provenientes do peroxinitrito gerando N_2O_3 que sofre hidrólise produzindo 2 NO_2^- (reação 13). A utilização de fenol como sonda, permitiu confirmar que a adição de quantidades catalíticas de tempol a incubações de peroxinitrito e fenol em presença de CO_2 leva a uma expressiva diminuição da nitração e aumento da nitroação dos aromáticos possivelmente via N_2O_3 . A pH 7,4 o rendimento de 4-nitrosafenol foi próximo de 30 % (Tabela 4) mais uma vez consistente com um mecanismo dependente da geração de radicais livres na decomposição do peroxinitrito.

Para obter maiores detalhes a respeito do mecanismo de formação de $\cdot\text{NO}$ e oxigênio derivados do peroxinitrito em presença de tempol e CO_2 , iniciaram-se estudos de EPR de fluxo de misturas do oxidante (1 mM), e CO_2 (2,5 mM) em presença de diferentes concentrações de tempol. Conforme resultados anteriormente descritos, misturas de peroxinitrito e CO_2 possibilitaram a detecção do espectro de EPR do radical $\text{CO}_3^{\cdot-}$ (Figura 10 B). A adição de tempol a estas misturas provocou a inibição do sinal do radical $\text{CO}_3^{\cdot-}$ de uma maneira dependente da concentração do nitróxido até praticamente a supressão total quando tempol (10 μM) foi utilizado, indicando que o tempol reage eficientemente com radicais $\text{CO}_3^{\cdot-}$ (Figura 10). Além disso, o registro do espectro do tempol utilizando-se 1 G de amplitude de modulação permitiu detectar pequenas, mas reproduzíveis diminuições no espectro de EPR do nitróxido, perceptíveis apenas na presença de CO_2 e em fluxo contínuo,

Figura 11. Espectros de EPR de fluxo do radical ânion $\text{CO}_3^{\bullet-}$ e tempol a pH 7,4. (A) Tempol (5 μM); (B) radical $\text{CO}_3^{\bullet-}$ produzido na mistura de ONOO^- (1 mM) com CO_2 (2,5 mM); (C) $\text{CO}_3^{\bullet-}$ e tempol obtidos na mistura de ONOO^- (1 mM) com CO_2 (2,5 mM) e tempol 5 μM ; a linha sobreposta (vermelha) representa a adição computacional de (A) e (B); (D) o mesmo que (A) utilizando 1 G de amplitude de modulação; a linha sobreposta vermelha deslocada para a direita corresponde a (B) utilizando 1 G de amplitude de modulação. As concentrações designadas são as concentrações finais obtidas após a mistura das soluções. O “inset” mostra o efeito do tempol em diminuir a intensidade do sinal do radical $\text{CO}_3^{\bullet-}$ medido através da altura do pico (a. u. = unidades arbitrárias) nas condições experimentais de (B). Condições instrumentais: Potência, 2 mW; constante de tempo, 164 ms; velocidade de varredura, 0,6 G/s; ganho, 2×10^5 ; amplitude de modulação, 5 G, exceto para (D) onde 1 G foi utilizado.

indicando a produção de uma espécie diamagnética resultante da interação de $\text{CO}_3^{\bullet-}$ e tempol. Pode-se notar que consistente com os experimentos de stopped flow 10 μM foi a concentração de saturação de tempol nos experimentos de EPR quando peroxinitrito 1 mM foi utilizado (Figura 10).

Tabela 4. Produção de 4-nitrosofenol, 2- e 4-nitrofenol durante a decomposição de peroxinitrito (1 mM) em presença de CO_2 (1 mM) e fenol (5 mM).

Sistema	4-nitrosoP (mM)	2-nitroP (mM)	4-nitroP (mM)
PN, CO_2 , pH 6,4	$0,007 \pm 0,003$	$0,068 \pm 0,003$	$0,052 \pm 0,003$
PN, CO_2 + TPL, pH 6,4	$0,124 \pm 0,017$	ND	ND
PN, CO_2 , 7,4	$0,011 \pm 0,003$	$0,106 \pm 0,009$	$0,082 \pm 0,008$
PN, CO_2 + TPL, pH 7,4	$0,268 \pm 0,026$	$0,012 \pm 0,004$	$0,014 \pm 0,005$

Quando presente a concentração de tempol utilizada foi de 10 μM . Os experimentos foram conduzidos em tampão fosfato (0,25 M) a 25 °C. A análise e quantificação dos produtos foi feita por HPLC. Os valores apresentados são médias de três experimentos independentes. 4-nitrosoP, 2- e 4-nitroP representam 4-nitrosofenol, 2- e 4-nitrofenol respectivamente. ND = não detectado.

Tomados em conjunto, os dados obtidos sugerem que o tempol não atua diretamente sobre o peroxinitrito mas reage eficientemente com radicais $\text{CO}_3^{\bullet-}$ provenientes de sua decomposição em presença de CO_2 . O produto desta reação é provavelmente o cátion oxoamônio derivado do tempol ($\text{TP}^+=\text{O}$). Dados da literatura [Samuni, *et al.*, 1990] demonstraram que o cátion oxoamônio reage com H_2O_2 com constantes de velocidade bastante elevadas. Analogamente, pode-se imaginar a reação do

cátion oxoamônio com o ânion peroxinitrito ou ácido peroxinitroso cuja oxidação por um elétron leva à produção de oxigênio e $\bullet\text{NO}$ detectados em nossos estudos. Em presença de $\bullet\text{NO}$, o $\bullet\text{NO}_2$ produzido no decaimento do peroxinitrito, reage rapidamente produzindo N_2O_3 um eficiente agente nitrosante, conforme as reações 14 - 19:

Utilizando o fenol como sonda, pudemos comprovar que de fato o tempol inibe a nitração e favorece a nitrosação de aromáticos através da formação de N_2O_3 . O rendimento de fenol nitrosado aproximou-se do rendimento de radicais livres esperado produzidos durante a decomposição do peroxinitrito (30 %) a pH 7,4 (Tabela 4) conferindo assim solidez adicional ao mecanismo proposto.

Em ausência de CO_2 , radicais $\text{CO}_3^{\bullet-}$ não são produzidos na decomposição do peroxinitrito. Neste caso, espera-se que rendimentos semelhantes de radicais $\bullet\text{OH}$ sejam gerados. No entanto, diferente do radical $\text{CO}_3^{\bullet-}$ que apresenta constantes de velocidades de reação significativamente maiores com tempol que com os demais componentes e contaminantes do sistema (vide Tabela 6), o radical $\bullet\text{OH}$ deve reagir com constantes de velocidade similares da ordem de $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ com praticamente todos os compostos presentes, tornando improvável que parcela significativa dos radicais $\bullet\text{OH}$ reaja especificamente com o tempol adicionado em quantidades catalíticas de forma eficiente.

Neste caso, uma explicação possível para os efeitos similares do tempol no redirecionamento da reatividade do peroxinitrito em ausência de CO_2 , é a reação de $\bullet\text{OH}$ com NO_2^- contaminante que pode gerar um excedente de $\bullet\text{NO}_2$. Na ausência de $\bullet\text{NO}$ suficiente, o $\bullet\text{NO}_2$ excedente poderia oxidar o tempol produzindo o cátion oxoamônio [Goldstein, *et al.*, 2003] e assim alimentar o sistema com intermediários reativos que levam à produção de N_2O_3 . É evidente que a reação direta dos radicais $\bullet\text{OH}$ com tempol com constantes da ordem de $3 - 5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [Samuni, *et al.*, 2002] e diretamente com peroxinitrito devem contribuir para a geração de oxigênio, $\bullet\text{NO}$ e consequentemente N_2O_3 a partir de peroxinitrito em ausência de CO_2 .

A oxidação do tempol por $\bullet\text{NO}_2$ ao cátion oxoamônio foi recentemente demonstrada (Goldstein, *et al.*, 2003). Neste trabalho, a constante de reação bimolecular entre tempol e $\bullet\text{NO}_2$ foi determinada e é da ordem de $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Em princípio, espera-se que por reagir rapidamente com $\bullet\text{NO}_2$ o tempol seja um eficiente captador do radical. Apesar disso, os dados aqui apresentados mostraram que a interação entre os radicais $\text{CO}_3^{\bullet-}$ e tempol em presença de peroxinitrito tem como consequência a produção de $\bullet\text{NO}$, cuja reação com $\bullet\text{NO}_2$, gera NO_2^- em quantidades estequiométricas. Este resultado, indica que em presença de $\bullet\text{NO}$ suficiente a reação de $\bullet\text{NO}_2$ com tempol não é favorecida nas condições experimentais empregadas.

Tabela 6. Constantes de reação bimolecular entre os radicais $\cdot\text{OH}$ e $\text{CO}_3^{\cdot-}$ com vários componentes de preparações típicas de peroxinitrito.

Substrato	$k_{\text{CO}_3^{\cdot-}} (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$k_{\text{OH}} (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$
ONOO^-	$7,7 \times 10^6$ [Goldstein, <i>et al.</i> , 1998]	$4,8 \times 10^9$ [Goldstein, <i>et al.</i> , 1998]
H_2O_2	$4,3 \times 10^5$ [Draganic, <i>et al.</i> , 1991]	$2,7 \times 10^7$ [Buxton, <i>et al.</i> , 1988]
NO_2^-	$6,6 \times 10^5$ [Huie, <i>et al.</i> , 1991]	6×10^9 [Logager & Sehested, 1993]

4.4. Produção de radicais $\cdot\text{NO}_2$ e $\text{CO}_3^{\cdot-}$ pela atividade de peroxidase da Cu, Zn-SOD.

A atividade de peroxidase da Cu, Zn-SOD é conhecida desde os anos 70. Entretanto, a descoberta de que formas mutadas da enzima, com atividade peroxidásica aumentada, estão envolvidas em alguns casos da doença esclerose lateral amiotrófica familiar motivou diversos trabalhos sobre os mecanismos pelos quais intermediários oxidantes são produzidos e oxidam compostos inacessíveis ao sítio de ligação do cobre. Recentemente demonstrou-se que a presença de HCO_3^- é fundamental para a atividade peroxidásica da Cu, Zn-SOD [Goss, *et al.*, 1999; Sankarapandi, *et al.*, 1999; Zhang, *et al.*, 2000]. Os mecanismos pelos quais o HCO_3^- promove a oxidação de compostos no meio reacional permanecem em discussão. Todavia, a maior parte dos resultados experimentais disponíveis são consistentes com a produção do radical $\text{CO}_3^{\cdot-}$ [Goss, *et al.*, 1999; Zhang, *et al.* 2000] ou do ânion peroxicarbonato (HCO_4^-) [Elam, *et al.*, 2003]. Apesar de serem fortes oxidantes os mecanismos pelos quais $\text{CO}_3^{\cdot-}$ ou HCO_4^- oxidam diversos substratos são sensivelmente diferentes. Enquanto o primeiro abstrai hidrogênio ou elétrons de seus substratos gerando radicais derivados, o último oxida tióis e metionina, principalmente, por mecanismos que envolvem a transferência de dois elétrons [Bennett, *et al.*, 2001].

Portanto, realizamos estudos detalhados sobre os mecanismos de oxidação da BSA, inacessível ao sítio ativo da SOD, com o objetivo de identificar o oxidante produzido.

Conforme os dados mostrados na Figura 11, a adição de HCO_3^- (25-50 mM) às incubações de Cu,Zn-SOD (2,5 mg/mL) e H_2O_2 (2,5 mM) em presença de albumina sérica bovina (100 mg/mL) permitiu a detecção por EPR de um espectro largo cuja intensidade foi proporcional à concentração de HCO_3^- adicionado (0-50 mM), H_2O_2 (0-5 mM) e Cu,Zn-SOD (0,5-7,5 mg/mL) e relativamente independente da concentração de albumina na faixa entre 25-100 mg/mL.

Figura 11. Espectros de EPR de radicais BSA-tirosila produzidos na incubação de BSA (100 mg/ml), H_2O_2 (2,5 mM), Cu, Zn-SOD (2,5 mg/ml) em ausência (A) ou em presença de HCO_3^- ; (B) 25 mM; (C) 50 mM. Condições instrumentais: Potência, 20 mW; constante de tempo 327 ms; amplitude de modulação, 2,5 G; velocidade de varredura 0,3 G/s; ganho $4,48 \times 10^5$.

Os sinais só puderam ser detectados em presença de todos os componentes do sistema. O sinal de EPR obtido é notavelmente anisotrópico e bastante largo evidenciando a formação de radicais relativamente imobilizados derivados de aminoácidos componentes de proteína. A obtenção dos sinais condicionada à presença de albumina, indica a produção de radicais centrados em aminoácidos da BSA. De fato, os parâmetros de EPR do sinal obtido ($g = 2,004$ e largura total da linha *ca.* 49 G) são consistentes com os parâmetros de radicais proteína-tirosila previamente detectados em BSA tratada com peroxidase de raiz forte em presença de H_2O_2 [Ostdal, *et al.*, 2002; Ostdal, *et al.*, 2001], na enzima prostaglandina H sintase tratada com etil-peróxido de hidrogênio [Shi, *et al.*, 2000] e no fotossistema II de cianobactéria iluminado [Faller, *et al.*, 2002]. A produção de radicais semelhantes ao detectado em nosso sistema, através da incubação de BSA com peroxidase de raiz forte, sugere a formação de radicais tirosila na superfície da BSA acessível ao centro heme-ferril da enzima.

A produção de radicais livres protéicos em presença de HCO_3^- pelo sistema Cu,Zn-SOD/ H_2O_2 é consistente com a formação de $CO_3^{\bullet-}$ pela atividade de peroxidase da enzima uma vez que HCO_4^- deve reagir preferencialmente com tióis e metionina por dois elétrons produzindo oxiácidos derivados de tióis e sulfóxidos respectivamente [Bennett, *et al.*, 2003].

Para confirmar a produção de radicais livres a partir de ânions pequenos experimentos com NO_2^- foram realizados paralelamente.

A substituição do HCO_3^- (25 - 50 mM) por NO_2^- (25 - 50 mM) permitiu a detecção de outro espectro de EPR também anisotrópico dependente da presença de albumina com características bastante diferenciadas, evidenciando a formação de um radical na BSA centrado em outro aminoácido (Figura 12). O espectro ainda mais largo que o detectado em presença de HCO_3^- indica a produção de um radical livre bastante

imobilizado formado no rígido interior hidrofóbico da albumina. De fato, os parâmetros de EPR deste espectro ($g = 2,007$ e largura total de linha *ca.* 52 G) são também consistentes com a produção de um radical proteína-tirosila [Chen-Barrett, *et al.*, 1995].

Ambos espectros puderam ser detectados após 1 minuto da adição de H_2O_2 e observados por períodos de incubação superiores a 1 h indicando a formação de radicais livres relativamente estáveis que se acumularam no tempo mesmo à temperatura ambiente e em presença de oxigênio, fornecendo indícios adicionais consistentes com a produção de radicais proteína-tirosila nos dois casos. Diferente do sinal obtido em presença de HCO_3^- , que atingiu intensidade máxima aos 7 minutos de incubação, o sinal em presença de NO_2^- teve sua intensidade aumentada por aproximadamente 30 minutos após adição de H_2O_2 (Figura 13) e permaneceu detectável por períodos de tempo superiores a 2 h. Este resultado sugere que o radical tirosila gerado em incubações de BSA com Cu,Zn-SOD/ H_2O_2 / NO_2^- é mais estável que o radical tirosila produzido nas incubações com HCO_3^- e que está abrigado em regiões mais hidrofóbicas na estrutura protéica uma vez que se acumula desde os primeiros instantes até tempos prolongados de incubação. A atividade enzimática da Cu,Zn-SOD foi acompanhada em incubações em presença de H_2O_2 e em presença e na ausência de HCO_3^- ou NO_2^- e comparada com a atividade da enzima não exposta a sistemas oxidantes. Conforme dados mostrados na Figura 13 (inserção), pode-se notar que aos 45 minutos de incubação frações aproximadamente iguais a 50 % e 80 % da atividade enzimática inicial da enzima foram mantidas após exposição a H_2O_2 / HCO_3^- e H_2O_2 / NO_2^- respectivamente. De acordo, neste tempo a intensidade do sinal de EPR referente ao radical tirosila gerado na BSA pelo sistema

Figura 12. Espectros de EPR de radicais BSA-tirosila produzidos na incubação de BSA (100 mg/ml), H_2O_2 (2,5 mM), Cu, Zn-SOD (2,5 mg/ml) em ausência (A) ou em presença de NO_2^- ; (B) 25 mM; (C) 50 mM. Condições instrumentais: Potência, 20 mW; constante de tempo 327 ms; amplitude de modulação, 2,5 G; velocidade de varredura 0,3 G/s; ganho $4,48 \times 10^5$.

Figura 13. Produção de radicais proteicos em incubações de BSA (100 mg/mL), Cu,Zn-SOD (2,5mg/mL) e H₂O₂ (2,5 mM) em presença de HCO₃⁻ (50 mM, barras cheias) ou NO₂⁻ (50 mM, barras vazias). As concentrações de radicais foram estimadas pela comparação da dupla integração dos espectros de EPR com aquela de soluções de tempol de concentrações conhecidas em glicerol. Inset: Atividade remanescente da enzima Cu,Zn-SOD exposta à H₂O₂ em ausência (barras brancas) ou em presença de NO₂⁻ (barras cinzas) ou HCO₃⁻ (barras negras) nas condições do experimento de EPR. Os resultados apresentados são médias de três experimentos independentes.

Cu,Zn-SOD/H₂O₂/HCO₃⁻, menos estável, também diminuiu em consequência da inativação da enzima.

Para obter maiores detalhes sobre a localização dos radicais formados, na estrutura da BSA, estudos de captação de spin utilizando o captador DBNBS foram realizados. O DBNBS é um derivado do ácido sulfanílico e apresenta, portanto, um grupo SO₃⁻ em sua estrutura carregado a pH próximos da neutralidade, além disso por possuir

um anel aromático rígido o DBNBS é um composto relativamente volumoso. A presença da carga negativa e o volume do captador devem, portanto limitar a penetração do DBNBS em ambientes hidrofóbicos, como o interior de proteínas.

Assim adicionou-se DBNBS (20 mM) à BSA pré-incubada com H_2O_2 (2,5 mM), Cu, Zn-SOD (2,5 mg/mL) e NO_2^- ou HCO_3^- (50 mM) por 15 minutos. A adição de DBNBS à posteriori, restringe a interferência de radicais não protéicos que tem tempo de vida limitado, tornando a captação de radicais de proteína, em geral relativamente estáveis, mais eficiente. Conforme os dados mostrados na Figura 14 a adição de DBNBS às incubações de BSA/Cu,Zn-SOD/ H_2O_2 em presença de NO_2^- ou HCO_3^- permitiu a detecção por EPR de espectros tripletes anisotrópicos consistentes com produção de radicais nitróxidos imobilizados derivados da reação de radicais de proteína com o captador de spin. Pode-se notar que os espectros obtidos em presença de HCO_3^- são significativamente mais intensos que os obtidos nas incubações com NO_2^- , em oposição aos resultados obtidos em ausência do captador (Figuras 11 e 12). Este resultado é consistente com a produção de radicais livres na superfície da BSA incubada com Cu,Zn-SOD/ H_2O_2 / HCO_3^- acessíveis ao DBNBS. Já em presença de NO_2^- , o rendimento de radicais adutos foi bem inferior confirmando a produção de radicais livres no interior da proteína inacessível ao DBNBS.

Além disso, é plausível considerar que o tiol da BSA seja um alvo importante tanto de radicais $\text{CO}_3^{\bullet-}$ como de radicais $^{\bullet}\text{NO}_2$ devido às altas constantes de velocidade de reação com as quais tíóis reagem com estes radicais. Assim, realizamos estudos de captação de spin adicionais utilizando DMPO como captador. Diferente do DBNBS, bastante utilizado para captação de radicais centrados em carbono, o DMPO é um captador de spin versátil e bastante utilizado para captação de radicais livres centrados em carbono, enxofre, nitrogênio e oxigênio. A incubação de BSA (100 mg/mL) com Cu,Zn-

SOD (2,5 mg/mL), H_2O_2 (2,5 mM) em presença de HCO_3^- (50 mM) e DMPO (50 mM) permitiu a detecção de um espectro de EPR largo com $a_{\beta}\text{H}$ evidente (ca. 10 G) e

Figura 14. Espectros de EPR de radicais DNBBS/ $\bullet$ tirosil produzidos em incubações de BSA (100 mg/mL), Cu,Zn-SOD (2,5mg/mL) e H_2O_2 (2,5 mM) em presença de HCO_3^- (50 mM, A, B) ou NO_2^- (50 mM, C, D). O captador de spin DNBBS (20 mM) foi adicionado 15 minutos depois da H_2O_2 . Todos os experimentos foram realizados a pH 7.4 (Tpi, 0.25 M) e temperatura ambiente. Os espectros B e D referem-se à digestão das incubações A e C respectivamente com proteinase K (de *T. album*) por 2 h a 37 °C. Condições instrumentais: Potência, 20 mW; amplitude de modulação, 2,5 G espectros A e C e 1.0 G espectros B e D; constante de tempo 327.68 ms; velocidade de varredura, 0,6 G/s; ganho 4.48×10^4 .

consistente com a produção de adutos DMPO/ $\bullet$ O-Tyr. A adição de NO_2^- (50 mM) ao invés de HCO_3^- possibilitou a detecção de outro espectro de EPR aparentemente

dominado pelo sinal do radical BSA-tirosila detectado diretamente (Figura 15). A subtração computacional do espectro detectado em ausência do captador (Figura 15C) do espectro obtido em sua presença (Figura 15B) revelou a formação de um radical aduto consistente com a captação pelo DMPO de radicais proteína-Trp[•] ou proteína-TrpO[•] ($a_{\beta}H = 19,0$ G).

Figura 15. Espectros de EPR de radicais de proteína produzidos em incubações de BSA (100 mg/mL), Cu,Zn-SOD (2,5 mg/mL), H₂O₂ (2,5 mM) e HCO₃⁻ (50 mM) ou NO₂⁻ (50 mM) (A) HCO₃⁻ em presença de DMPO 50mM; (B) NO₂⁻ em presença de DMPO (50 mM); (C) em ausência de DMPO e em presença de NO₂⁻ (50 mM). O espectro D é a subtração computacional (B-C). Condições instrumentais : Potência, 20 mW; constante de tempo 327 ms; velocidade de varredura, 0.3 G/s; amplitude de modulação, 2,5 G; ganho, 1×10^5 .

Apesar de não terem sido detectados por “spin trapping” a formação de radicais cisteinila nas incubações de BSA/Cu,Zn-SOD/H₂O₂/NO₂⁻, pôde ser indiretamente comprovada pela substituição de BSA nativa por BSA previamente tratada com N-etil-

maleimida. Neste caso, o sinal de EPR previamente detectado com a proteína nativa foi completamente suprimido (Figura 16) evidenciando o envolvendo do resíduo de cisteína na formação do radical detectado diretamente. A substituição de albumina nativa por albumina pré-tratada com N-etil-maleimida em incubações de BSA/Cu,Zn-SOD/H₂O₂/HCO₃⁻, não provocou modificações consideráveis no espectro sugerindo que neste caso os resíduos de cisteína não foram consideravelmente atacados pelo radical CO₃^{•-}.

Os resultados obtidos indicavam claramente que o resíduo de cisteína 34 situado em um bolsão hidrofóbico da BSA era oxidado pelo [•]NO₂ produzido pelo sistema Cu,Zn-SOD/H₂O₂/NO₂⁻ [Singh, *et al.*, 1998] e participava da formação do radical tirosila detectado diretamente.

No entanto, nos pareceu bastante surpreendente que os radicais CO₃^{•-} não reagissem com os resíduos de cisteína da BSA nas condições experimentais utilizadas, principalmente devido às altas constantes de reação com as quais tióis reagem com CO₃^{•-} ($k \sim 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Assim, decidimos avaliar a velocidade de oxidação de tióis nas incubações de BSA com Cu,Zn-SOD/H₂O₂, em presença e na ausência de HCO₃⁻ e NO₂⁻. Conforme esperado a exposição da BSA à H₂O₂ levou a um consumo gradativo de tiol via oxidação do grupo SH ao ácido sulfênico derivado, pelo peróxido [Carballal, *et al.*, 2003] (Figura 17). A adição de NO₂⁻ às incubações de Cu,Zn-SOD/BSA/H₂O₂ não provocou modificações significativas na velocidade de oxidação de tióis pelo peróxido. Em contrapartida, a adição de HCO₃⁻ às incubações de Cu,Zn-SOD (2,5 mg/mL)/H₂O₂ (2,5 mM)/BSA (100 mg/mL) levou a uma rápida oxidação de tióis à ácido sulfênico principalmente, significativamente acelerada em relação às incubações em ausência de HCO₃⁻ (Figura 17). Tal efeito do HCO₃⁻ foi observado em presença e em ausência da

Figura 16. Espectros de EPR de radicais BSA-tirosila produzidos em incubações de BSA (100 mg/mL), Cu, Zn-SOD (2,5mg/mL), H_2O_2 (2,5 mM) e NO_2^- (50 mM, A, B) ou HCO_3^- (50 mM, C, D) a pH 7,4 (Tpi, 0.25 M) e temperatura ambiente. Experimentos B and D foram realizados com BSA pré-tratada com N-etilmaleimide. Os espectros mostrados foram registrados 15 minutos após a adição de H_2O_2 . Condições instrumentais: Potência: 20 mW; amplitude de modulação, 2,5 G; constante de tempo, 327.68 ms; velocidade de varredura, 0.3 G/s; ganho, 4.48×10^5 .

enzima indicando que a oxidação dos tióis neste caso não foi provocada pela ação de $\text{CO}_3^{\bullet-}$ (Figura 17). A rápida oxidação de tióis por dois elétrons é consistente com a produção de HCO_4^- , produzido em misturas de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HCO}_3^-$. Apesar de ser gerado em nosso sistema, o HCO_4^- não é o intermediário difusível produzido pela atividade de peroxidase da Cu,Zn-SOD. A detecção de radicais de proteína em incubações de BSA/Cu,Zn-SOD/ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HCO}_3^-$, claramente demonstrou a natureza radicalar do intermediário oxidante produzido pela enzima.

Figura 17. Oxidação de tióis em incubações de BSA (100 mg/mL) e H_2O_2 (2,5 mM) em presença de HCO_3^- (Δ) ou em presença de HCO_3^- (50 mM) e Cu,Zn-SOD (2,5 mg/mL) ($\blacktriangle$). Às demais incubações H_2O_2 e Cu,Zn-SOD ($\bullet$) ou $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Cu,Zn-SOD}$ e NO_2^- ($\circ$) foram adicionados. As incubações foram realizadas em tampão fosfato a pH 7.4. A reação foi interrompida pela adição de catalase (20 U/mL) nos tempos indicados. Os resultados mostrados são médias de três experimentos independentes. Inserção: Espectros de absorção

O efeito do HCO_3^- na “ativação” de peróxidos já foi observado e atribuído à formação de HCO_4^- . De fato o HCO_4^- reage com tióis com constantes de velocidade bimolecular até 300 vezes maiores que o peróxido de hidrogênio [Bennett, *et al.*, 2001] (vide reação 20 - 22).

Assim, em presença de HCO_3^- a oxidação dos tióis a ácido sulfênico deve tê-los rapidamente indisponibilizado para reação com $\text{CO}_3^{\bullet-}$, explicando assim a não detecção de adutos de radicais tiila com DMPO neste caso. No caso NO_2^- a formação de radicais tiila pôde ser inferida através dos experimentos com BSA pré-tratada com N-etilmaleimida. No entanto, uma rápida reação intramolecular de transferência de elétron/hidrogênio possivelmente da tirosina 84 situada nas proximidades do grupo tiol da cisteína 34 deve ter evitado que radicais tiila fossem captados com eficiência.

Tomados em conjunto, nossos resultados permitem afirmar com toda segurança que o sistema SOD/ H_2O_2 produz em presença de HCO_3^- e NO_2^- , radicais $\text{CO}_3^{\bullet-}$ e $\text{NO}_2^{\bullet}$ uma vez que a adição de ânions distintos provoca a oxidação por um elétron de resíduos diferentes da BSA. Além disso, os radicais de BSA puderam ser caracterizados como radicais proteína-tirosila derivados de tirosinas superficiais no caso das incubações com Cu,Zn-SOD/ H_2O_2 / HCO_3^- e tirosina localizada em uma região hidrofóbica no caso das incubações com NO_2^- consistente com as propriedades físico-químicas dos radicais $\text{CO}_3^{\bullet-}$ (polar carregado, hidrofílico) e $\text{NO}_2^{\bullet}$ (apolar, hidrofóbico). Diferente do HCO_3^- , a adição de NO_2^- a incubações de SOD/ H_2O_2 conferiu relativa proteção contra inativação da enzima. Mais uma vez a formação de radicais $\text{CO}_3^{\bullet-}$ e $\text{NO}_2^{\bullet}$ pode explicar tal resultado. Devido ao potencial de oxidação mais baixo do NO_2^- ($E^\circ = 0,99 \text{ V}$) [Koppenol, *et al.*,

1992] em relação ao do HCO_3^- ($E^\circ = 1,8 \text{ V}$) [Bonini & Augusto, 2001] e reatividade menor do radical $\cdot\text{NO}_2$ derivado, comparativamente ao $\text{CO}_3^{\cdot-}$ a adição de NO_2^- às incubações protege o sítio ativo da enzima pois oferece um redutor melhor para desativar o oxidante produzido no sítio ativo, cujo produto é menos oxidante e portanto menos danoso à enzima. Radicais $\text{CO}_3^{\cdot-}$ reagem com elevadas constantes de velocidade com resíduos de histidina ($k = 4,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, para o dipeptídeo Gly-His), e uma vez produzidos proximamente a esses resíduos devem contribuir para sua oxidação e conseqüente liberação do cobre.

Alvos importantes dos radicais $\cdot\text{NO}_2$ e $\text{CO}_3^{\cdot-}$ na BSA puderam ser identificados como cisteína 34 (situada em uma região hidrofóbica) e tirosinas da superfície da proteína respectivamente. Além disso, o sistema SOD/ H_2O_2 se mostrou um eficiente gerador de radicais $\text{CO}_3^{\cdot-}$ e $\cdot\text{NO}_2$ e poderá ser utilizado para estudos sobre a reatividade destes oxidantes com outros sistemas de interesse biológico.

4.5. Produção de radicais $\text{CO}_3^{\cdot-}$ durante o "turnover" da enzima xantina oxidase (XOD).

Além da atividade peroxidásica da Cu, Zn-SOD, existia na literatura um trabalho da década de 70 que sugeria a possibilidade de radicais $\text{CO}_3^{\cdot-}$ serem produzidos durante a oxidação de acetaldeído catalisada pela xantina oxidase a pH fortemente alcalino (Hodgson & Fridovich, 1976). Neste trabalho, os autores sugeriram que radicais $\cdot\text{OH}$ produzidos por mecanismos de Fenton oxidavam o HCO_3^- produzindo $\text{CO}_3^{\cdot-}$. Entretanto, novos trabalhos [Hodges, *et al.*, 2000; Bennett, *et al.*, 2001] nos levaram a propor em recente artigo de revisão [Augusto, *et al.*, 2002] um mecanismo alternativo para produção de $\text{CO}_3^{\cdot-}$ durante o "turnover" da XOD a pH fisiológico. Para fornecer embasamento experimental a esta proposta, novos estudos foram realizados. Na maior parte deles, altas

concentrações de catalase foram utilizadas para minimizar o acúmulo de H_2O_2 e reações de Fenton.

Conforme os dados mostrados na Figura 18 a adição de HCO_3^- (50 - 200 mM) a incubações de xantina oxidase (10 mU/ml), acetaldeído (5 mM) e dihidrorodamina 1, 2, 3 (80 μM) em presença de catalase (200 U/ml) a pH 7,4, aumentou significativamente a oxidação da DHR de uma maneira dependente da concentração de HCO_3^- , um dado consistente com uma produção aumentada de radicais livres mediada pelo $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$. Paralelamente, verificou-se o efeito do HCO_3^- (100 mM) sobre o “turnover” da XOD através da redução do citocromo c Fe(III) (50 μM). Conforme dados mostrados na Tabela 7 a adição de HCO_3^- (100 mM) não alterou significativamente a velocidade de redução do citocromo c Fe(III) mediada pela XOD, evidenciando assim, que a oxidação maior de DHR em presença de HCO_3^- não se deve à alterações no “turnover” da enzima.

Figura 18. Oxidação de DHR (80 μM) mediada por XOD (10 mU/mL) incubada com acetaldeído (5 mM) em ausência ou em presença de diversas concentrações de HCO_3^- . (A) 200 mM; (B) 100mM; (C) 50 mM e (D) sem adição de HCO_3^- . As incubações foram realizadas em tampão fosfato (pH 7,4; 250 mM) na presença de catalase 200 U/mL à $25 \pm 2^\circ\text{C}$. A formação de rodamina foi acompanhada a 500 nm ($\epsilon = 78.800 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Inserção: Absorbância aos 20 minutos de incubação de misturas de XOD/acetaldeído/ HCO_3^- (100 mM) e DHR em presença de DHR a 500 nm.

Tabela 7. Velocidade inicial de redução de citocromo c Fe(III) e concentração de citocromo c Fe(II) aos 10 minutos de incubação mediada pelo sistema XOD (10 mU/ml)/acetaldeído (5 mM) em presença e em ausência de HCO_3^- .

Sistema	V_o ($\mu\text{M}/\text{min}$)	[cit c Fe(II)] (μM)
XOD/AA	$3,5 \pm 0,3$	$18,4 \pm 1,0$
XOD/AA/ HCO_3^-	$2,7 \pm 0,2$	$17,6 \pm 0,5$

Apesar de indicar uma produção aumentada de espécies reativas mediada pelo HCO_3^- os experimentos com DHR não permitem identificar os oxidantes produzidos no sistema XOD/AA/ HCO_3^- . Assim iniciamos estudos de EPR na tentativa de evidenciar a produção de $\text{CO}_3^{\bullet-}$ através de sua reatividade peculiar com o captador de spin DMPO. Apesar de o DMPO não gerar produtos de adição estáveis com o radical $\text{CO}_3^{\bullet-}$, este captador tem sido utilizado para evidenciar a formação de radicais $\text{CO}_3^{\bullet-}$ em sistemas enzimáticos [Zhang, *et al.*, 2000]. De fato, o radical $\text{CO}_3^{\bullet-}$ oxida o DMPO ao cátion radical derivado ($\text{DMPO}^{\bullet+}$), que reage com a água produzindo $\text{DMPO}/^{\bullet}\text{OH}$. O radical aduto $\text{DMPO}/^{\bullet}\text{OH}$ é também produzido pela captação de radicais $^{\bullet}\text{OH}$ pelo DMPO (reações 23, 24).

Neste caso específico, no entanto, é possível diferenciar o radical originalmente produzido adicionando-se dimetilsulfóxido (DMSO) às incubações. O radical $^{\bullet}\text{OH}$ é extremamente reativo e apresenta constantes de velocidade de reação bimolecular próximas do limite difusional com DMPO e DMSO. Assim, a adição de DMSO ao sistema em concentrações adequadas (razoavelmente superiores à de DMPO) deve inibir formação de $\text{DMPO}/^{\bullet}\text{OH}$. Em contrapartida o radical $\text{CO}_3^{\bullet-}$ não reage eficientemente com DMSO [Zhang, *et al.*, 2002] e assim a produção de $\text{DMPO}/^{\bullet}\text{OH}$ mediada por radicais $\text{CO}_3^{\bullet-}$ não é prevenida pela inclusão de DMSO ao meio reacional. Conforme os dados mostrados na Figura 19 a adição de HCO_3^- (50-100 mM) às incubações de XOD (10 mU/ml) e acetaldeído (5 mM) em presença de DMPO (80 mM) e catalase (200 U/ml) a pH 7,4 provocou significativo aumento na detecção por EPR de adutos $\text{DMPO}/^{\bullet}\text{OH}$, consistente com uma maior produção de $\text{CO}_3^{\bullet-}$.

Figura 19. Oxidação de DMPO (80 mM) incubado com XOD (10 mU/ml)/ acetaldéido (5 mM) em presença de catalase (200 U/ml) e em ausência (A) ou em presença de diferentes concentrações de HCO_3^- . (B) 50 mM; (C) 100 mM e (D) 200 mM HCO_3^- . As incubações foram realizadas em tampão fosfato pH 7,4 (250 mM). Os espectros foram registrados à temperatura ambiente e após 1 minuto da adição do substrato à incubação. Condições instrumentais: Potência 20 mW; Constante de tempo 328 ms; amplitude de modulação 1 G; ganho . Os adutos de DMPO foram identificados com base em suas constantes de acoplamento hiperfino como $\text{DMPO}^\bullet\text{COCH}_3$ (○) e $\text{DMPO}^\bullet\text{OH}$ (●).

A adição de concentrações elevadas de catalase e os resultados mostrados na Tabela 7, permitem excluir que reações de Fenton ou uma geração aumentada de $\text{O}_2^{\bullet-}$ mediada pela XOD possam ter contribuído significativamente para o aumento da produção de $\text{DMPO}^\bullet\text{OH}$ dependente de HCO_3^- . A adição de DMSO (15 % concentração

final) não provocou alterações notáveis nos espectros referentes às incubações de XOD/acetaldéido/ HCO_3^- em presença de DMPO confirmando que os adutos $\text{DMPO}/^{\bullet}\text{OH}$ são produzidos em sua maioria por mecanismos que não envolvem a produção de $^{\bullet}\text{OH}$. Em contrapartida, a adição de ácido 4-hidroxi-fenilacético (25 mM) e triptofano (20 mM) que reagem eficientemente com $\text{CO}_3^{\bullet-}$ inibiram quase totalmente os sinais referentes ao aduto $\text{DMPO}/^{\bullet}\text{OH}$ (Figura 20).

Figura 20. Espectros de EPR do radical aduto $\text{DMPO}/^{\bullet}\text{OH}$ produzidos na incubação de (A) XOD (25 mU/ml) em presença de acetaldéido (2,5 mM), HCO_3^- (200 mM) e DMPO (80 mM) a temperatura ambiente e pH 7,4. (B) adição de HPA (25 mM); (C) adição de triptofano (20 mM); (D) adição de DMSO (10 %). Condições Instrumentais; Potência, 40 mW; Constante de tempo 327 ms; velocidade de varredura 0,3 G/s, amplitude de modulação, 1 G; ganho 8×10^5 . Cada espectro apresentado é o resultado da acumulação de 4 varreduras.

Para evidenciar a produção de $\text{DMPO}^{\bullet+}$ e conseqüentemente de $\text{CO}_3^{\bullet-}$ em nosso sistema, incubamos DMPO (80 mM), XOD (10 mU/mL) e acetaldeído em presença de HCO_3^- (200 mM) em tampão fosfato (250 mM, pH 7,4) preparado com água isotopicamente marcada H_2O^{17} (54 % H_2O : 46 % H_2O^{17}). A incorporação de O^{17} ao DMPO através da reação do $\text{DMPO}^{\bullet+}$ com água, provoca desdobramentos adicionais na estrutura hiperfina do espectro de EPR devido ao spin nuclear do O^{17} igual a 5/2. De fato foi possível notar novas linhas pouco intensas no espectro de EPR referentes ao aduto $\text{DMPO}/^{17}\text{OH}$ produzido na incubação de DMPO com XOD/AA/ HCO_3^- em presença de H_2O^{17} (Figura 21 marcadas com •). Na verdade, o spin nuclear elevado do O^{17} juntamente com os spins nucleares do nitrogênio e do próton do DMPO provocam o desdobramento do sinal do elétron desemparelhado em diversas linhas (15 linhas) diminuindo muitas vezes sua intensidade. Além disso, a água isotopicamente marcada com O^{17} comercial apresenta abundância relativa de O^{17} próxima a 50 % o que contribui para a obtenção de espectros de $\text{DMPO}/^{17}\text{OH}$ ainda menos intensos. Todavia, apesar de pouco intenso a simulação computacional do espectro experimental demonstrou que parte significativa dos adutos *ca.* 70 % (30 % da área do espectro) $\text{DMPO}/^{\bullet}\text{OH}$ foi produzida via formação de $\text{DMPO}^{\bullet+}$ (Figura 21).

Desta forma, além dos experimentos de EPR incubações de XOD/AA/ HCO_3^- em tampão fosfato preparado com H_2O^{16} e H_2O^{18} foram analisados por espectrometria de massa acoplada a cromatografia líquida LC/MS. As análises das amostras incubadas com tampão preparada com H_2O^{18} demonstraram que um pico pouco intenso mas consistente com a nitrona derivada do aduto $\text{DMPO}/^{18}\text{OH}$ (132 a.m.u.) foi produzido [Guo, Q., *et al.*, 2003] (Figura 22). A substituição de H_2O^{18} por H_2O^{16} permitiu a detecção de um novo pico com intensidade similar e massa igual a 131 a.m.u. consistente com a detecção do aduto $\text{DMPO}/^{16}\text{OH}$. As análises por espectrometria de massa das incubações de

DMPO/XOD/AA em presença de HCO_3^- e H_2O^{18} constituíram importante evidência experimental a favor da produção de $\text{CO}_3^{\bullet-}$ durante o “turnover” da XOD, nas condições empregadas.

Figura 21. Espectros de EPR de incubações de XOD (10 mU/ml)/ Acetaldeído (5 mM) em presença de catalase (200 U/ml) e HCO_3^- (200 mM) e DMPO (80 mM). As incubações foram realizadas em tampão fosfato pH 7,4 (250 mM) preparado com H_2O^{16} (B) ou H_2O^{17} (aprox. 45 %) (C). O espectro (A) foi obtido diluindo-se a incubação de XOD/AA/ HCO_3^- com solução de persulfato de amônio (0,5 mM) (1:1 v/v). O espectro (D) é o mesmo que (C) ampliado 5 x. Cada espectro representa a acumulação de 4 varreduras. Condições instrumentais: Potência, 40 mW; Constante de tempo 327 ms; velocidade de varredura 0,3 G/s, amplitude de modulação, 1 G; ganho 8×10^5 .

Figura 22. Espectros de massas de adutos de DMPO produzidos em (A) incubações de Fe (II) (0,5 mM)/EDTA (0,6 mM) e H₂O₂ (1 mM) em presença de DMPO (40 mM) e (B) incubações de XOD (10 mU/ml)/acetaldeído (5 mM) em presença de HCO₃⁻ (200 mM) e catalase (200 U/ml) a temperatura ambiente e pH 7,4 (Tpi 250 mM).

Além disso, compararam-se os perfis de emissão de luz de incubações de XOD/ HCO_3^- /catalase/acetaldéido e peroxinitrito/ HCO_3^- . De fato, Hodgson & Fridovich, em trabalho anterior [Hodgson & Fridovich, 1976] reportaram a emissão de luz induzida por HCO_3^- em misturas de XOD/acetaldéido a pH alcalino. No entanto, naquela época a ausência de um sistema gerador de $\text{CO}_3^{\bullet-}$ conhecido não permitiu a caracterização inequívoca do radical mediada pela XOD. Atualmente sabe-se que peroxinitrito em presença de CO_2 decai instantaneamente produzindo quantidades apreciáveis de radicais $\text{CO}_3^{\bullet-}$ [Merenyi, *et al.*, 1997; Bonini, *et al.*, 1999; Meli, *et al.*, 1999; Goldstein, *et al.*, 2001]. De acordo com os resultados mostrados na Figura 23, a incubação de XOD/ HCO_3^- /acetaldéido em presença de catalase, gerou perfil de emissão de luz bastante similar `aquele observado em misturas de peroxinitrito/ CO_2 , com máximo de emissão na região 500-590 nm conforme anteriormente observado [Hodgson & Fridovich 1976; Denicola, *et al.*, 1996]. Pode-se notar também que as cinéticas de emissão (Figura 23, inset) encontram-se de acordo com o padrão esperado para geração de produtos luminescentes por uma reação enzimática (direita) e pela rápida decomposição do peroxinitrito em presença de CO_2 (esquerda). Dessa forma, os resultados obtidos suportam fortemente a geração de $\text{CO}_3^{\bullet-}$ durante o “turnover” da XOD em presença de HCO_3^- .

Figura 23. Perfis de emissão de luz de misturas de (A) peroxinitrito (180 mM) infundido a um fluxo de 0,8 ml/min em uma solução tamponada com fosfato pH 7,4 (0,4 M) contendo HCO_3^- (100 mM) e (B) de incubações de XOD (50 mU/ml)/acetaldeído (12,5 mM) em presença de HCO_3^- (100 mM) e catalase (200 U/ml). Os insets exemplificam a cinética de emissão tipicamente registrada em cada caso.

Claramente o conjunto das evidências obtidas favorece a produção de radicais $\text{CO}_3^{\bullet-}$ pela enzima XOD incubada com substrato doador de elétrons em presença de HCO_3^- . É sabido que apesar de variável, a maior parte das preparações de XOD apresenta alto teor de ferro associado fortemente à enzima. No entanto, a presença de concentrações elevadas de catalase em todos os experimentos realizados neste estudo excluem a possibilidade de que radicais hidroxila tenham influenciado significativamente os resultados. Além disso a repetição dos experimentos de oxidação da DHR com XOD pré-incubada por 48 h com Chellex-100 (uma resina quelante de metais) forneceu dados similares aos mostrados na Figura 18, dando suporte adicional para um papel essencial do radical $\text{CO}_3^{\bullet-}$ na promoção das oxidações observadas (dados não mostrados).

Estudos adicionais sobre a influência do pH na atividade da XOD e a oxidação da DHR indicaram que mecanismos de Fenton de fato, não devem estar envolvidos na produção de $\text{CO}_3^{\bullet-}$ e conseqüentemente na oxidação da sonda consideravelmente. O aumento do pH até 9,5 provocou aumento da atividade da XOD relativamente ao pH 7,4 medida espectrofotometricamente através da velocidade de redução do citocromo c Fe(III) (dados não mostrados). Contrariamente, o aumento de pH de 7,0 para 9,5 provocou redução de *ca.* 90 % no rendimento de rodamina (produto de oxidação da DHR) (Figura 18, inset). A constante de velocidade bimolecular para a reação de $^{\bullet}\text{OH}$ com CO_3^{2-} é cerca de 100 vezes maior que com HCO_3^- . Assim, pH elevados tendem a promover a produção de radicais $\text{CO}_3^{\bullet-}$ através da oxidação de CO_3^{2-} por radicais $^{\bullet}\text{OH}$ gerados por mecanismos de Fenton. Considerando-se que a absorvidade molar (ϵ) da rodamina não varia consideravelmente com o pH na faixa estudada, os dados obtidos nestes estudos indicaram que a oxidação da DHR pelo sistema XOD/AA parece ser dependente da presença de CO_2 mais abundante a pH baixo fornecendo suporte experimental para a hipótese inicialmente formulada (vide esquema 4).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados gerados em nossos estudos, aqui apresentados, contribuíram significativamente para o esclarecimento de pontos centrais sobre a química e bioquímica do peroxinitrito e de seus radicais derivados, sobretudo o $\text{CO}_3^{\bullet-}$. A demonstração inequívoca e pioneira da formação de radicais $\text{CO}_3^{\bullet-}$ a partir de peroxinitrito em meio aquoso e pH fisiológico foi importante para ratificar e estabelecer o peroxinitrito como gerador de radicais livres e conseqüentemente abriu novas perspectivas de pesquisa na área. Neste primeiro trabalho também obtivemos informações relevantes do ponto de vista biológico sobre as propriedades físico-químicas do radical $\text{CO}_3^{\bullet-}$ que foram confirmadas *a posteriori*, a saber : a ausência de desdobramentos na estrutura hiperfina do radical gerado em misturas de peroxinitrito e CO_2 indicava que na faixa de pH estudada (6,5 – 8,5) o radical $\text{CO}_3^{\bullet-}$ estaria na forma aniônica já que a presença de um núcleo com spin ($S_{H^+} = \frac{1}{2}$) deveria desdobrar a linha referente ao elétron desemparelhado em duas. Assim, uma vez produzido o radical $\text{CO}_3^{\bullet-}$ deve reagir com estruturas expostas ao meio aquoso, o que confirmamos posteriormente com estudos sobre a oxidação de BSA pelo sistema Cu, Zn-SOD/ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HCO}_3^-$ que demonstraram a formação de radicais tirosila superficiais [Bonini, *et al.*, submetido; Ostdal, *et al.*, 2002; Ostdal, *et al.*, 2001]. Com base nas constantes de velocidade de reação do $\text{CO}_3^{\bullet-}$ com diversos compostos pode-se prever que seus principais alvos *in vivo* devem ser tióis, resíduos de tirosina, triptofano e metionina da superfície de proteínas e resíduos de guanina no DNA (vide Tabela 8). Uma vez produzido o $\text{CO}_3^{\bullet-}$ deve reagir quase que exclusivamente por abstração de hidrogênio ou elétron gerando biorradicais. De acordo, a adição de CO_2 a misturas de peroxinitrito e tióis potencializou a produção de radicais deles derivados (Figuras 4-7). Foi possível demonstrar que a rápida reação entre

peroxinitrito e CO_2 minimizou a reação direta entre o oxidante e os tióis e conseqüentemente a oxidação de tióis. Em contrapartida, a decomposição do aduto $[\text{ONOOCO}_2^-]$ gera 35 % de radicais livres ($\text{CO}_3^{\bullet-}$ e $^{\bullet}\text{NO}_2$) que oxidam tióis produzindo os radicais tiila correspondentes. De fato, pela primeira vez os radicais sulfinila e tiol-dissulfeto de glutatona e cisteína foram inequivocamente identificados como intermediários reativos produzidos na oxidação de tióis por peroxinitrito através de seus parâmetros de EPR. Devido às concentrações reduzidas de oxigênio intracelular uma vez produzidos os radicais tiila devem reagir preferencialmente com tióis excedentes gerando radicais dissulfeto e $\text{O}_2^{\bullet-}$. Nossos resultados suportam a idéia de que outra função importante dos tióis intracelulares é minimizar o dano oxidativo resultante da produção de radicais livres oxidantes, uma vez que o produto final $\text{O}_2^{\bullet-}$ é rapidamente decomposto pela enzima superóxido dismutase [Winterbourn, 1993].

Inerente à decomposição do peroxinitrito, o $^{\bullet}\text{NO}_2$ deve reagir *in vivo* principalmente com resíduos de aminoácidos componentes de proteínas (especialmente tirosina, triptofano e cisteína), e com a maioria dos antioxidantes plasmáticos e ácidos graxos constituintes de membranas (vide Tabela) [Augusto, *et al.*, 2002 e referências]. Dentre as principais reações do $^{\bullet}\text{NO}_2$ *in vivo* estão a abstração de hidrogênio ou elétrons de biomoléculas, que produzem respectivamente nitrito e radicais derivados das moléculas oxidadas, e a adição à duplas ligações, particularmente importante no caso da reação do $^{\bullet}\text{NO}_2$ com lipídeos insaturados [Pryor, & Lightsey, 1981; Huie, 1994].

Tabela 9 – Constantes de reação bimolecular entre o radical dióxido de nitrogênio e algumas moléculas de relevância biológica.

Composto	k (M ⁻¹ s ⁻¹)	Referência
Ânion Superóxido	4.5 x 10 ⁹	Logager & Sehested, 1993
Linoleato	2.0 x 10 ⁵	Prutz, <i>et al.</i> , 1985
Araquidonato	1.0 x 10 ⁶	Prutz, <i>et al.</i> , 1985
Gly-Tyr-OH	3.2 x 10 ⁵	Prutz, <i>et al.</i> , 1985
Gly-Trp-H	1.0 x 10 ⁶	Prutz, <i>et al.</i> , 1985
Cys-S ⁻	2.4 x 10 ⁸	Prutz, <i>et al.</i> , 1985
Ascorbato	3.5 x 10 ⁷	Alfassi, <i>et al.</i> , 1990
Urato	1.8 x 10 ⁷	Simic & Jovanovic, 1989

Recentemente foi demonstrado que ambos radicais CO₃^{•-} e [•]NO₂ reagem com constantes de velocidades elevadas com tempol e outros nitróxidos [Samuni, comunicação pessoal, Goldstein, *et al.*, 2003]. Antecipadamente à publicação destes trabalhos, demonstramos que tempol reage eficientemente com CO₃^{•-} por EPR de fluxo gerando espécies diamagnéticas derivadas do tempol, possivelmente o cátion oxoamônio. Este último, atua sobre o peroxinitrito restante decompondo-o para [•]NO e O₂. Em presença de [•]NO₂ o [•]NO reage produzindo um agente nitrosante, o N₂O₃, ao invés de radicais livres muito deletérios, sendo um provável mecanismo pelo qual o tempol minimiza o dano oxidativo em uma série de modelos de inflamação [Cuzzocrea, *et al.*, 2001; Cuzzocrea, *et al.*, 1997]. *In vivo*, o N₂O₃ deve reagir com tióis produzindo nitroso-tióis derivados ou sofrer hidrólise produzindo NO₂⁻. Esta atividade do tempol de redicionar a reatividade do peroxinitrito produzindo intermediários nitrosantes ao invés

de oxidantes pode ser útil na investigação da formação de peroxinitrito em sistemas mais complexos como culturas de células e animais experimentais submetidos à estímulos inflamatórios.

Apesar de a atividade de peroxidase da Cu, Zn-SOD ser conhecida desde meados da década de 70, as discussões sobre a identidade do intermediário oxidante produzido pela enzima permanecem em aberto até o momento. Os resultados obtidos constituíram uma importante evidência experimental a favor da produção de $\text{CO}_3^{\bullet-}$ e $^{\bullet}\text{NO}_2$ a partir de HCO_3^- e NO_2^- respectivamente pela enzima.

É provável que isoformas mutadas da enzima Cu,Zn-SOD que possuem a atividade de peroxidase aumentada contribuam para o aparecimento e progressão da esclerose lateral amiotrófica familiar (fALS) [vide por exemplo Hall, *et al.*, 1998]. Um mecanismo potencial para explicar a morte dos neurônios motores é a produção de radicais $\text{CO}_3^{\bullet-}$. Dessa forma, a caracterização do intermediário oxidante produzido pelo sistema Cu,Zn-SOD/ H_2O_2 / HCO_3^- deve nortear o desenvolvimento de terapias que minimizem a progressão desta patologia.

Além da Cu, Zn-SOD, os resultados obtidos indicaram que a enzima XOD pode ser outra importante fonte de radicais $\text{CO}_3^{\bullet-}$ *in vivo*. O substrato fisiológico mais comum da XOD é a xantina. No entanto, ambos xantina e seu produto de oxidação, ácido úrico, devem ser eficientes captadores de radicais $\text{CO}_3^{\bullet-}$. Assim, pode-se antever que estudos que empreguem a XO como substrato, serão complexos e possivelmente gerarão dados imprecisos se realizados através do emprego de técnicas indiretas, como as utilizadas nos estudos aqui apresentados. De qualquer forma, nossos resultados indicaram que independentemente do substrato a produção de radicais $\text{CO}_3^{\bullet-}$ mediada pela enzima XOD pode ser um evento extremamente relevante *in vivo*. Atualmente, considera-se que a XOD está envolvida no dano oxidativo provocado por condições de isquemia e

reperusão devido à sua capacidade de produzir H_2O_2 e $\text{O}_2^{\bullet-}$ que eventualmente podem, por mecanismos de Fenton, produzir radicais $^{\bullet}\text{OH}$. No entanto, tempol [Krishna, *et al.*, 1992; Krishna, *et al.*, 1996; Offer, *et al.*, 2000] e urato (eficientes captadores de radicais $\text{CO}_3^{\bullet-}$) [Spitsin, *et al.*, 2000; Kean, *et al.*, 2000] têm-se mostrado excepcionais supressores de lesões oxidativas à tecidos e células submetidos a tais condições. Esta observação, juntamente com os resultados obtidos em nossos estudos e as concentrações aumentadas de CO_2 em ambientes isquêmicos, implicam uma provável participação dos radicais $\text{CO}_3^{\bullet-}$ na produção das lesões neste caso específico e em todos os outros processos, que envolvam a participação da enzima xantina oxidase.

Neste contexto nossos trabalhos não foram importantes apenas para demonstrar a formação de radicais $\text{CO}_3^{\bullet-}$ em sistemas biológicos relevantes. No decorrer de nossos estudos, ferramentas úteis e novas metodologias foram testadas e deverão possibilitar futuras investigações sobre a produção e destino biológico de peroxinitrito e seus radicais derivados ($\text{CO}_3^{\bullet-}$ e $^{\bullet}\text{NO}_2$). Portanto, na medida em que contribuiu para responder diversas questões básicas sobre a reatividade dos oxidantes derivados do $^{\bullet}\text{NO}$, este trabalho evoluiu e abordou outros assuntos envolvendo a busca de técnicas que possibilitassem um estudo aprofundado sobre o envolvimento do $^{\bullet}\text{NO}$ e outros radicais livres em oxidações biológicas. Além do peroxinitrito os estudos realizados com enzimas confirmaram e estenderam o conhecimento corrente de como radicais $\text{CO}_3^{\bullet-}$ podem ser produzidos *in vivo* e exercer seus múltiplos papéis.

Evidentemente que os estudos aqui apresentados, devem ser extrapolados e validados com novos experimentos envolvendo culturas de células, e animais experimentais. Todavia, muitos de nossos resultados tem servido de base para novos estudos. Alguns já concluídos [de Menezes, S. L. & Augusto, O., 2001] e tantos outros

em progresso, evidenciando que novos caminhos e oportunidades de pesquisa foram abertos.

Finalmente, deve-se destacar que um entendimento mais completo sobre a produção e reatividade biológicas de peroxinitrito, radicais $\text{CO}_3^{\bullet-}$ e $^{\bullet}\text{NO}_2$ por qualquer via conhecida ou a ser descoberta, pode contribuir significativamente para o desenvolvimento de metodologias de terapia e prevenção de dano oxidativo, envolvido no agravamento de uma gama enorme de patologias humanas.

6. REFERÊNCIAS

Alfassi, Z. B., Huie, R. E., Neta, P. and Shoute, L. C. T. (1990) Temperature-dependence of the rate constants for reactions of inorganic radicals with organic reductants. *J. Phys. Chem.*, **94**, 8800-8805.

Alvarez, B., Ferrer-Sueta, G., Freeman, B. A. and Radi, R. (1991) Kinetics of peroxynitrite reaction with aminoacids and human serum albumin. *J. Biol. Chem.*, **274**, 842-848.

Aracava, Y., Schreier, S., Phadke, R., Deslauriers, R. and Smith, I. C. (1981) Spin label reduction kinetics, a procedure to study the effect of drugs on membrane permeability: the effects of monosodium urate, dimethyl sulfoxide and amphotericin B. *J. Biochim. Biophys. Methods*, **5**, 83-94.

Augusto, O., Gatti, R. M. and Radi, R. (1994) Spin-Trapping studies of peroxynitrite decomposition and of 3-morpholinocydonimine N-Ethylcarbamide autooxidation: Direct evidence for metal-independent formation of free radical intermediates. *Arch. Biochem. Biophys.*, **310**, 118-125.

Augusto, O., Bonini, M. G., Amanso, A. M., Linares, E., Santos, C. X. C. and de Menezes, S. L. (2002) Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in Biology. *Free Rad. Biol. Med.* **32**, 841-859.

Babior, B. M., Takeuchi, C., Ruedi, J., Gutierrez, A. and Wentworth, P., Jr. (2003) Investigating antibody-catalyzed ozone generation by human neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 3031-3034.

Babior, B. M., Lambeth, J. D. and Nauseef, W. (2002) The neutrophil NADPH oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **397**, 342-344.

Babior, B. M. (1995) The respiratory burst. *Curr. Opin. Hematol.*, **2**, 55-60.

Banan, A., Fields, J. Z., Decker, H., Zhang, Y. and Keshavarzian, A. (2000) Nitric oxide and its metabolites mediate ethanol-induced microtubule disruption and intestinal barrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **294**, 997-1008.

Baxter, M. A., Leslie, R. G. and Reeves, W. G. (1983) The stimulation of superoxide anion production in guinea-pig peritoneal macrophages and neutrophils by phorbol-myristate acetate, opsonized zymosan and IgG2-containing soluble immune complex. *Immunology*, **48**, 657-665.

Bayol-Denizot, C., Daval, J. L., Neter, P. and Minn, A. (2000) Xenobiotic-mediated production of superoxide by primary cultures of rat cerebral endothelial cells, astrocytes and neurons. *Biochim. Biophys. Acta*, **1497**, 115-126.

Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A. and Freeman, B. A. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 1620-1624.

Bennett, D., Yao, H. and Richardson, D. E. (2001) Mechanism of sulfide oxidations by peroxymonocarbonate. *Inorg. Chem.*, **40**, 2996-3001.

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

Bonini, M. G. and 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.

Bonini, M. G., Fernandes, D. C. and Augusto, O. (2003) submitted to *Biochemistry*.

- Borbat, P. P., Costa-Filho, A. J., Earle, K. A., Moscicki, J. K. and Freed, J. H. (2001) Electron spin resonance in studies of membranes and proteins. *Science*, **291**, 266-269.
- Boveris, A. and Cadenas, E. (1975) Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett.*, **54**, 311-314.
- Boveris, A., Cadenas, E and Stoppani, A. O. (1976) Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem. J.*, **156**, 435-444.
- Briviba, K., Kissner, R., Koppenol, W. H. and Sies, H. (1998) Kinetic study of the reaction of glutathione peroxidase with peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.*, **11**, 1398-1401.
- Brookes, P. S., Levonen, A. L., Shiva, S., Sarti, P., Darley-Usmar, V. (2002) Mitochondria: regulators of signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Rad. Biol. Med.*, **33**, 755-764.
- Buettner, G. R. (1993) The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.*, **300**, 535-543.
- Buxton, G. V., Greenstock, C. L., Helman, H. P. and Ross, A. B. (1988) *J. Phys. Chem., Ref. Data*, **17**, 513-886.
- Carballal, S., Radi, R., Kirk, M. C., Barnes, S., Freeman, B. A., and Alvarez, B. (2003) Sulfenic acid formation in Human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Biochemistry*, **42**, 9906-9914.
- Carroll, R. T., Galatsis, P., Borosky, S., Kopec, K. K., Kumar, V., Althaus, J. S. and Hall, E. D. (2000) 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-piperidine-1-oxyl (Tempol) inhibits peroxynitrite-mediated phenol nitration. *Chem. Res. Toxicol.*, **13**, 294-300.

- Cerutti, P. A. (1985) Prooxidant states and tumor promotion. *Science*, **227**, 375-381.
- Chandok, M. R., Ytterberg, A. J., van Wijk, K. J. and Klessig, D. F. (2003) The pathogen-inducible nitric oxide synthase (iNOS) in plants is a variant of the P protein of the glycine decarboxylase comple. *Cell*, **113**, 469-482.
- Chawla, O. P. and Fessenden, R. W. (1975) Electron spin resonance and pulse radiolysis studies of some reactions of $\text{SO}_4^{\bullet-}$. *J. Phys. Chem.* **79**, 2693-2700.
- Chen, S.-N., and Hoffman, M. Z. (1975) Effect of pH on the reactivity of carbonate radical in aqueous solution. *Radiat. Res.*, **62**, 18-27.
- Chen, S.-N., and Hoffman, M. Z. (1973) Rate constants for the reaction of the carbonate radical with compounds of biochemical interest in neutral aqueous solution. *Radiat. Res.*, **56**, 40-47.
- Chen-Barrett, Y., Harrison, P. M., Treffry, A., Quail, M. A., Arosio, P., Santambrogio, P. and Chasteen, N. D. (1995) Tyrosyl radical formation during the oxidative deposition of iron in human apoferritin. *Biochemistry*, **34**, 7847-7853.
- Coddington, J. W., Hurst, J. K. and Lyman, S. V. (1999) Hydroxyl radical formation during peroxyxynitrous acid decomposition. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 2438-2443.
- Cuzzocrea, S., McDonald, M. C., Mazzon, E., Filipe, H. M., Centorrino, T., Lepore, V., Terranova, M. L., Ciccolo, A., Caputi, A. P. and Thiemermann, C. (2001) Benecitial effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, on the multiple organ failure induced by zymosan in the rat. *Crit. Care Med.* **29**, 102-111.
- Cuzzocrea, S., Filipelli, A., Zingareli, B., Falciani, P., Caputi, A. P. and Rossi, F. (1997) Role of nitric oxide in a nonseptic shock model induced by zymosan in the rat. *Shock*, **7**, 351-357.

- Czapski, G.; Holcman, J.; Bielski, B.H.J. (1994) *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 11465-11469.
- Darley-USmar, V. M., Hogg, N., O'Leary, V. J., Wilson, M. T. and Moncada, S. (1992) The simultaneous generation of superoxide and nitric oxide can initiate lipid peroxidation in human low density lipoprotein. *Free Rad. Res. Commun.*, **17**, 9-20.
- de Menezes, S. L. and Augusto, O. (2001) EPR detection of glutathionyl and protein-tyrosyl radicals during the interaction of peroxynitrite and macrophages (J774). *J. Biol. Chem.*, **276**, 39879-39884.
- Dean, J. A. (1979) Lange's Handbook of chemistry 12th edition, pp 5-13, McGraw Hill Book Co., New York.
- Draganic, Z. D., Negron-Mendoza, A., Sehested, K., Vujosevic, S. I., Navarro-Gonzales, R., Albarran-Sanches, M. G. and Draganic, I. G. (1991) Radiolysis of aqueous solutions of ammonium bicarbonate over a large dose range. *Radiat. Phys. Chem.*, **38**, 317-321.
- Denicola, A., Souza, J. M., and Radi, R. (1998) Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 3866-3871.
- Denicola, A., Freeman, B. A., Trujillo, M. and Radi, R. (1996) Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations. *Arch. biochem. Biophys.*, **333**, 49-58.
- Dunford, H. B. (1995) One electron oxidations by peroxidases. *Xenobiotica*, **25**, 725-733.
- Elam, J. S., Malek, K., Rodriguez, J. A., Doucette, P. A., Taylor, A. B., Hayward, L. J., Cabelli, D. E., Valentine, J. S. and Hart, P. J. (2003) An alternative mechanism of bicarbonate-mediated peroxidation by copper-zinc superoxide dismutase. Rates enhanced

via proposed enzyme-associated peroxycarbonate intermediate. *J. Biol. Chem.*, **278**, 21032-21039.

Eriksen, T. E. and Fransson, G. (1988) Radical induce oxidation of glutathione in alkaline aqueous solution. *Radiat. Phys. Chem.*, **32**, 163-167.

Eriksen, T. E.; Lind, J.; Merenyi, G. (1985) *Radiat. Phys. Chem.* **26**, 197-199.

Faller, P.; Rutherford, A. W. and Debus, R. J. (2002) Tyrosine D oxidation at cryogenic temperature in photosystem II. *Biochemistry*, **41**, 12914-12920.

Felix, K.; Lengfelder, E.; Deters, D.; Weser, U. (1993) Pulse radiolytically determined superoxide-dismutase mimicking activity of copper putrescine-pyridine, a dischiff base coordinated copper complex. *BioMetals*, **6**, 11-15.

Fridovich, I. (1970) Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, **245**, 4053-4057.

Furtmuller PG, Arnhold J, Jantschko W, Pichler H and Obinger C. (2003) Redox properties of the couples compound I/compound II and compound II/native enzyme of human myeloperoxidase. *Biochem. Biophys. Acta*, **301**, 551-557.

Gallez, B., Bacic, G., Goda, F., Jiang, J., O'Hara, A., Dunn, J. F. and Swartz, H. M. (1996) Use of nitroxides for assessing perfusion, oxygenation, and viability of tissues: in vivo EPR and MRI studies. *Magn. Reson. Med.*, **35**, 97-106.

Gaston, B., Reilly, J., Drazen, J. M., Fackler, J., Ramlev, P., Arnette, D., Mullins, M. E., Sugarbaker, D. J., Chee, C., Singel, D. J., Loscalzo, J. and Stamler, J. S. (1993) Endogenous nitrogen oxides and bronchodilator S-nitrosothiols in human airways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.*, **90**, 10957-10961.

Gatti, R. M., Radi, R., Augusto, O. (1994) Peroxynitrite-mediated oxidation of albumin to the protein-thiyl free radical. *FEBS Lett.*, **348**, 287-290.

Gatti, R. M., Alvarez, B., Vásquez-Vivar, J., Radi, R. and Augusto, O. (1998)

Formation of spin trap adducts during the decomposition of peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.*, **349**, 36-46.

Gerasimov, O. V. and Lymar, S. V. (1999) The yield of hydroxyl radical from the decomposition of peroxynitrous acid. *Inorg. Chem.*, **38**, 4317-4321.

Gherzi-Egea, J. F., Maupoil, V., Ray, D. and Rochette, L. (1998) Electronic spin resonance detection of superoxide and hydroxyl radicals during the reductive metabolism of drugs by rat brain preparations and isolated cerebral microvessels. *Free Rad. Biol. Med.*, **24**, 1074-1081.

Giorgio, S., Linares, E., Ischiropoulos, H., Von Zuben, F. J., Yamada, A. and 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.

Godber, B. L., Doel, J. J., Durgan, J., Eisenthal, R. and Harrison, R. (2000) A new route to peroxynitrite: a role for xanthine oxidoreductase. *FEBS Lett.*, **475**, 93-96.

Goldstein, S., Samuni, A., and Russo, A. (2002) Reaction of cyclic nitroxides with nitrogen dioxide: the intermediacy of oxiammonium cations. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 8364-8370.

Goldstein, S., Czapski, G., Lind, J. and Merényi, G. (2001) Carbonate radical ion is the only observable intermediate in the reaction of peroxynitrite with CO₂. *Chem. Res. Toxicol.*, **14**, 1273-1276.

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

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

Goss, S. P., Singh, R. J. and Kalyanaraman, B. (1999) Bicarbonate enhances the peroxidase activity of Cu, Zn-superoxide dismutase activity. Role of carbonate anion radical. *J. Biol. Chem.*, **274**, 28233-28239.

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

Gow, A. J., Duran, D., Thom, S. R. Ischiropoulos, H. (1996) Carbon dioxide enhancement of peroxynitrite-mediated protein tyrosine nitration. *Arch. Biochem. Biophys.*, **333**, 42-48.

Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R. (1982) Analysis of nitrate, nitrite and [15] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.*, **126**, 131-138.

Griendling, K. K. and Uchio-Fukai, M. (2000) Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. *Regul. Pept.*, **91**, 21-27.

Guo, Q., Qian, S. Y., and Mason, R. P. (2003) Separation and identification of DMPO adducts of oxygen centered radicals formed by organic hydroperoxides by HPLC/ESR, ESI/MS and MS/MS. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **14**, 862-871.

Hall, E. D., Andrus, P. K., Oostveen, J. A., Fleck, T. J. and Gurney, M. E. (1998) Relationship between oxygen radical-induced lipid peroxidative damage to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *J. Neurosci. Res.*, **53**, 66-77.

Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. in *Free Radicals Biology and Medicine*, 3rd edition, Oxford Science Publications, 1999, London, UK, pp 246-350.

Hanafy, K. A., Krumenacker, J., S. and Murad, F. (2001) NO, nitrotyrosine and cyclic GMP in signal transduction. *Med. Sci. Monit.*, **7**, 801-819.

Harrison, R. (2002) Structure and function of xanthine oxidoreductase: Where are we now?. *Free Rad. Biol. Med.*, **33**, 774-797.

Hille, R. and Nishino, T. (1995) Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *FASEB J.*, **9**, 995-1003.

Hink, H. U., Santanam, N., Dikalov, S., McCann, L., Nguyen, A. D., Pathasarathy, S., Harrison, D. G., and Fukai, T. (2002) Peroxidase properties of extracellular superoxide dismutase : role of uric acid in modulating in vivo activity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **22**, 1402-1408.

Hix, S., Kadiiska, M. B., Mason, R. P., and Augusto, O. (2000) In vivo metabolism of tert-butyl hydroperoxide to methyl radicals. EPR spin trapping and DNA methylation studies. *Chem. Res. Toxicol.*, **13**, 1056-1064.

Hodges, G. R., Young, M.-J., Paul, T. and Ingold, K. U., (2000) How should xanthine oxidase-generated superoxide yields be measured?. *Free Rad. Biol. Med.*, **29**, 434-441.

Hodgson, E. K. and Fridovich, E. K. (1975) The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: chemiluminescence and peroxidation. *Biochemistry*, **14**, 5299-5303.

Hodgson, E. K. and Fridovich, I. (1976) The mechanism of the activity-dependent luminescence of xanthine oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **172**, 202-205.

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

Huie, R. E. and Padmaja, S. (1993) The reaction of NO with superoxide. *Free Rad. Res. Commun.*, **18**, 195-199.

Huie, R. E. (1994) The reaction kinetics of NO₂. *Toxicology*, **89**, 193-216.

Huie, R. E., Shoute, L. C. T. and Neta, P. (1991) Temperature dependence of the rate constants for reactions of the carbonate radical with organic and inorganic reductants
Int. J. Chem. Kinet., **23**, 541-552.

Husted, E. J. and Beth, A. H. (1999) Nitroxide spin-spin interactions: applications to protein structure and dynamics. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **28**, 129-153.

Ignarro, L. J. (2002) Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: A historical overview. *J. Physiol. Pharmacol.*, **53**, 503-514.

Kean, R. B., Spitsin, S. V., Mikheeva, T., Scott, G. S. and Hooper, D. D. (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, P. G. and Koppenol, W. H. (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.

Koppenol, W. H. (1998) Peroxynitrite uncloaked?. *Chem. Res. Toxicol.*, **11**, 716-717.

Koppenol, W. H., Moreno, J. J., Pryor, W. A., Ischiropoulos, H. and Beckman, J. S. (1992) Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res. Toxicol.*, **5**, 834-842.

Korshunov, S. S., Shulachev, V. P. and Starkov, A. A. (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.*, **416**, 15-18.

Kraiev, A. G., Williams, T. D. and Bigelow, D. J. (1998) Enzymatic reduction of 3-nitrotyrosine generates superoxide. *Chem. Res. Toxicol.*, **11**, 495-502.

Krishna, M. C., Grahame, D. A., Samuni, A., Mitchell, J. B. and Russo, A. (1992) Oxoammonium cation intermediate in the nitroxide-catalyzed dismutation of superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 5537-5541.

Krishna, M. C., Russo, A., Mitchell, J. B., Goldstein, S., Dafni, H. and Samuni, A. (1996) Do nitroxide antioxidants act as scavengers of O₂⁻ or as SOD mimics?. *J. Biol. Chem.*, **271**, 26026-26031.

Kuppusamy, P., Li, H., Ilangovan, G., Cardounel, A. J., Zweier, J. L., Yamada, K., Krishna, M. C. and Mitchell, J. B. (2002) Noninvasive imaging of tumor redox status and its modification by tissue glutathione levels. *Cancer Res.*, **62**, 307-312.

Kurimoto, M., Endo, S., Hirashima, Y., Hamada, H., Ogiichi, T. and Takaku, A. (1999) Growth inhibition and radiosensitization of cultured glioma cell by nitric oxide generating agents. *J. Neurooncol.*, **42**, 35-44.

Leone, A. M., Francis, P. L., Rhodes, P. and Moncada, S. (1994) A simple method for the measurement of nitrite and nitrate in plasma by high performance capillary electrophoresis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **200**, 951-957.

Liochev, S. I. and Fridovich, I. (2002) Copper, zinc superoxide dismutase and H₂O₂. Effects of bicarbonate on inactivation and oxidations of NADPH and urate, and on consumption of H₂O₂. *J. Biol. Chem.* **277**, 34674-34678.

- Liu, X., Miller, M. J., Joshi, M. S., Thomas, D., D. and Lancaster, J. R., Jr. (1998) Accelerated reaction of nitric oxide with O₂ within the hydrophobic interior of biological membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 2175-2179.
- Logager, T. and Sehested, K. (1993) Formation and decay of peroxynitric acid: a pulse radiolysis study. *J. Phys. Chem.*, **97**, 10047-10052.
- Lowenstein, C. J., Glatt, C. S., Bredt, D. S. and Snyder, S. H. (1992) Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 6711-6715.
- Lyons, C. R., Orloff, G. J. and Cunningham, J. M., (1992) Molecular cloning and functional expression of inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J. Biol. Chem.*, **267**, 6370-6374.
- Lymar, S. V. and Hurst, J. K. (1995) Rapid reaction between peroxynitrite ion and carbon dioxide – implications for biological activity. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 8867-8868.
- Lymar, S. V. and Hurst, J. K. (1996) Carbon dioxide: physiological catalyst for peroxynitrite-mediated cellular damage or cellular protectant?. *Chem. Res. Toxicol.*, **9**, 845-850.
- Lymar, S. V. and Hurst, J. K. (1998) Radical nature of peroxynitrite reactivity. *Chem. Res. Toxicol.*, **11**, 714-715.
- Lymar, S. V. and Hurst, J. K. (1998) CO₂-catalyzed one-electron oxidations by peroxynitrite: Properties of the reactive intermediate. *Inorg. Chem.*, **37**, 294-301.
- Mardiney, M. 3rd, Jackson, S. H., Spratt, S. K., Li, F., Holland, S. M. and Malech, M. L. (1997) Enhanced host defense after gene transfer in the murine p-47phox deficient model of chronic granulomatous disease. *Blood*, **89**, 2268-2275.

- Markert, M., Andrews, P. C. and Babior, B. M. (1984) Measurements of O_2^- production by human neutrophils. The preparation and assay of NADPH oxidase-containing particles from human neutrophils. *Methods Enzymol.*, **105**, 358-365.
- Marx, J. (2002) Immunology: Antibodies kill by producing ozone. *Science*, **298**, 1319.
- Mason, R. P. Free-Radical metabolite formation by mammalian peroxidases. In: Fowler, B. A., ed. *Mechanisms of cell injury: implications for human health*. New York, John Wiley & Sons limited; 1987, 67-83
- McCord, J. M., Keele, B. B., Jr., and Fridovich, I. (1971) An enzyme-based theory for obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 1024-1027.
- Mehlhorn, R. J. and Keith, A. D. (1972) in *Membrane Molecular Biology* (Fox, C. F., and Keith, A. D., eds) pp. 192-227, Sinauer Associates, Stamford, CT.
- Meli, R., Nauser, T. and Koppenol, W. H. (1999) Direct observation of intermediates in the reaction of peroxynitrite with carbon dioxide. *Helv. Chim. Acta*, **82**, 722-725.
- Mérenyi, G. and Lind, J. (1997) Thermodynamics of peroxynitrite and its CO_2 adduct. *Chem. Res. Toxicol.*, **10**, 1016-1020.
- Mérenyi, G., Lind, J., Goldstein, S. and Czapski, G. (1998) Peroxynitrous acid homolyses into NO_2^* and *OH radicals. *Chem. Res. Toxicol.*, **11**, 712-713.
- Miles, A. M., Bohle, D. S., Glassbrenner, P. A., Hansert, B., Wink, D. A. and Grisham, M. B. (1996) Modulation of superoxide-dependent oxidation and hydroxylation reactions by nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, **271**, 40-47.

Millar, T. M., Kanczer, J. M., Bodamyali, T., Blake, D. R. and Stevens, C. R. (2002) Xanthine oxidase is a peroxynitrite synthase: newly identified roles for a very old enzyme. *Redox Rep.*, **7**, 1-6.

Misra, H. P. and Fridovich, I. (1971) The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins. *J. Biol. Chem.*, **246**, 6886-6890.

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

Morgenstein, D. E, Gifford, M. A., Li, L. L., Doershuk, C. M. and Dinauer, M. C. (1997) Absence of respiratory burst in X-linked chronic granulomatous disease mice leads to abnormalities in both host defense and inflammatory response to *Aspergillus fumigatus*. *J. Exp. Med.*, **185**, 207-218.

Murray, H. W., (1982) Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis II. Oxygen-dependent killing of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *J. Immunol.*, **129**, 351-357.

Nakao, L. S., Kadiiska, M. B., Mason, R. P., Grijalba, M. T., and Augusto, O. (2000) *Free Rad. Biol. Med.*, **29**, 721-729.

Nathan, C. (2003) Immunology: Oxygen and the inflammatory cell. *Nature*, **422**, 675-676.

Nathan, C. (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.*, **61**, 3051-3064.

Nedosparov, A., Rafikov, R., Beda, N. and Nudler, E. (2000) An autocatalytic mechanism of protein nitrosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **97**, 13543-13548.

Ostdal, H.; Davies, M., J. and Andersen, H. J. (2002) Reaction between protein radicals and other molecules. *Free Rad. Biol. Med.*, **33**: 201-209.

Ostdal, H.; Sogaard, S. G.; Bendixen, E. and Andersen, H. J. (2001) Protein radicals in the reaction between H₂O₂- activated metmyoglobin and bovine serum albumin. *Free Rad. Res.*, **35**: 757-766.

Pick, M.; Rabani, J.; Yost, F.; Fridovich, I. (1974) Catalytic mechanism of manganese-containing superoxide-dismutase of escherichia-coli studied by pulse-radiolysis. *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 7329-7333.

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

Pryor, W. A., Lightsey, J. W. (1981) Mechanisms of nitrogen-dioxide reactions: initiation of lipid peroxidation and the production of nitrous acid. *Science* **214**, 435-437.

Quijano C., Hernandez-Saavedra, D., Castro, L., McCord, J. M., Freeman, B. A. and Radi, R. (2001) Reaction of peroxynitrite with Mn-superoxide dismutase. Role of the metal center in decomposition kinetics and nitration. *J. Biol. Chem.*, **276**, 11631-11638.

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

Radi, R., Beckman, J. S., Bush K. M. and Freeman, B. A. (1991) Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The citotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, **266**, 4244-4450.

Radi, R., Cosgrove, T. P., Beckman, J. S. and Freeman, B. A. (1993) Peroxynitrite-induced luminol chemiluminescence. *Biochem. J.*, **290** Pt-1, 51-57.

Radi, R., Denicola, A. and Freeman, B. A. (1999) Peroxynitrite reactions with carbon dioxide-bicarbonate. *Methodes Enzymol.*, **301**, 353-367.

Reska, K. J., Matuszak, Z., Chignell, C. F. and Dillon J. (1999) Oxidation of biological electron donors and antioxidants by a reactive lactoperoxidase metabolite from nitrite (NO₂⁻): an EPR and spin trapping study. *Free Rad. Biol. Med.*, **26**, 669-678.

Reska, K. J., McCormick, M. L. and Britigan, B. E. (2001) Peroxidase- and nitrite-dependent metabolism of the anthracycline anticancer agents daunorubicin and doxorubicin. *Biochemistry*, **40**, 15349-15361.

Reth, M. (2002) Hydrogen peroxide as a second messenger in lymphocyte activation. *Nat. Immunol.*, **3**, 1129-1134.

Samuni, A., Goldstein, S., Russo, A., Mitchell, J. B., Krishna, M. C. and Neta, P. (2002) Kinetics and mechanism of hydroxyl radical and OH-adduct radical reactions with nitroxides and with their hydroxylamines. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 8719-8724.

Samuni, A., Krishna, C. M., Mitchell, J. B., Collins, C. R. and Russo, A. (1990) Superoxide reaction with nitroxides. *Free Radical Res. Commun.*, **9**, 241-249.

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

Santos, C. X. C., Anjos, E. I. and Augusto, O. (1999) Uric acid oxidation by peroxynitrite: Multiple reactions, free radical formation, and amplification of lipid oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **372**, 285-294.

Schreier, S., Malheiros, S. V. and de Paula, E. (2000) Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects. *Biochim Biophys Acta.*, **1508**, 210-234.

Shafer, A. M., Bennett, V. J., Kim, P. and Voss, J. C. (2003) Probing the binding pocket and endocytosis of a G protein-coupled receptor in live cells reported by a spin-labeled substance P agonist. *J. Biol. Chem.*, in press.

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

Sharov, V. S., Driomina, D. S., Briviba, K. and Sies, H. (1998) Sensitization of peroxynitrite chemiluminescence by the triplet carbonyl sensitizer coumarin 525. Effect of CO₂. *Photochem. Photobiol.*, **68**, 797-801.

Shi, W.; Hoganson, C. W.; Espe, M.; Bender, C. J.; Babcock, G. T.; Palmer, G.; Kulmacz, R. J. and Tsai, A. (2000) Electron paramagnetic resonance and electron nuclear double resonance spectroscopic identification and characterization of the tyrosyl radicals in prostaglandin H synthase 1. *Biochemistry*, **39**, 4112-4121.

Shiva, S., Brookes, P. S., Patel, R. P., Anderson, P. G. and Darley-USmar, V. (2001) Nitric oxide partitioning into mitochondrial membranes and the control of respiration at cytochrome c oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **98**, 7212-7217.

Sies, H. (1987) Antioxidant activity in cells and organs. *Am. Ver. Respir. Dis.*, **136**, 478-480.

Simic, M. G. and Jovanovich, V. (1989) Antioxidation mechanisms of uric acid. *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 5778-5782.

Singh, R. J., Goss, S. P., Joseph, J. and Kalyanaraman, B. (1998) Nitration of gamma-tocopherol and oxidation of alpha-tocopherol by copper-zinc superoxide dismutase/H₂O₂/NO₂⁻: role of nitrogen dioxide free radical. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 12912-12917.

Spack, L., Havens, P. L. and Griffith, O. W. (1997) Measurements of total plasma nitrite and nitrate in pediatric patients with the systemic inflammatory response syndrome. *Crit. Care Med.*, **25**, 1071-1078.

- Spitsin, S. V., Scott, G. S., Kean, R. B., Mikheeva, T. and Hooper, D. C. (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, G. L., Jin, X. and Pryor, W. A. (1995) Stopped-flow kinetic study of the reaction of ascorbic acid with peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.*, **322**, 500-505.
- St-Pierre, J., Buckingham, J. A., Roebuck, S. J. and Brand, M. D. (2002) Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J. Biol. Chem.*, **277**, 44784-44790.
- Thomson, L. , Trujillo, M., Telleri, R. and radi, R. (1995) Kinetics of cytochrome c 2+ oxidation by peroxynitrite: implications for superoxide measurements in nitric oxide-producing biological systems. *Arch. Biochem. Biophys.*, **319**, 491-497.
- Uppu, R. M., Squadrito, G. L. and Pryor, W. A. (1997) Acceleration of peroxynitrite oxidations by carbon dioxide. *Arch. Biochem. Biophys.*, **327**, 335-343.
- van Dalen, C. J., Winterbourn, C. C., Senthilmohan, R. and Kettle, A. J. (2000) Nitrite as a substrate and inhibitor of myeloperoxidase. Implications for nitration and hypochlorous acid production at site of inflammation. *J. Biol. Chem.*, **275**, 11638-11644.
- van der Vliet, A., Eiserich, J. P., Halliwell, B. and Cross, C. E. (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.
- Vásquez-Vivar, J., denicola, A., Radi, R. and Augusto, O. (1997) Peroxynitrite-mediated decarboxylation of pyruvate to both carbon dioxide and carbon dioxide radical anion. *Chem. Res. Toxicol.*, **10**, 786-794.

Whittle, B. J., Boughton-Smith, N. K. and Moncada, S. (1992) Biosynthesis and role of the endothelium derived vasodilator, nitric oxide, in the gastric mucosa., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **664**, 126-139.

Winterbourn, C. C. (1993) Superoxide as an intracellular radical sink. *Free Rad. Biol. Med.*, **14**, 85-90.

Wu, W., Chen, Y. and Hazen, S. L. (1999) Eosinophil peroxidase nitrates protein tyrosyl residues. Implications for oxidative damage by nitrating intermediates in eosinophilic inflammatory disorders. *J. Biol. Chem.*, **274**, 25933-25944.

Xie, Q., Cho, H. J., Calaycay, J., Mumford, R. A., Swiderek, K., M., Lee, T. D., Ding, A., Troso, T. and Nathan, C. (1992) Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*, **256**, 225-228.

Zhang, H., Joseph, J., Gurney, M., Becker, D. and Kalyanaraman, B. (2002) Bicarbonate enhances peroxidase activity of Cu, Zn-superoxide dismutase. Role of the carbonate anion radical and scavenging of the carbonate anion radical by metalloporphyrin antioxidant enzyme mimetics. *J. Biol. Chem.*, **277**, 1013-1020.

Zhang, H., Joseph, J., Felix, C. and Kalyanaraman, B. (2000) Bicarbonate enhances the hydroxylation, nitration, and peroxidation reactions catalyzed by copper, zinc-superoxide dismutase. Intermediacy of carbonate anion radical.

Zhang, H., Squadrito, G. L., Uppu, R. M., Lemercier, J. N., Cueto, R. and Pryor, W. A. (1997) Inhibition of peroxynitrite-mediated oxidation of glutathione by carbon dioxide.

APÊNDICE I

A simulação foi da concentração de $\text{CO}_3^{\bullet-}$ produzida em misturas de peroxinitrito (20 mM) e $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ (100 mM), pH 6,9 foi realizada considerando-se as reações e equilíbrios abaixo:

* A constante de decomposição do aduto $[\text{ONO}_2\text{CO}_2^-]$ não foi determinada mas estima-se que seja superior a $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [Lyman & Hurst, 1995; Merenyi & Lind, 1997].

APÊNDICE II - Estruturas

TEMPOL

DMPO

POBN

DBNBS