UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

ELIZIANE DE SOUZA PATRICIO

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DO HIDROPERÓXIDO DE URATO
COM A PROTEÍNA DISSULFETO ISOMERASE (PDI)
EM PROCESSOS INFLAMATÓRIOS**

Versão corrigida

São Paulo

Data de depósito na SPG

23/06/2014

ELIZIANE DE SOUZA PATRICIO

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DO HIDROPERÓXIDO DE URATO COM
A PROTEÍNA DISSULFETO ISOMERASE (PDI) EM PROCESSOS
INFLAMATÓRIOS**

**Dissertação apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo, para obtenção do Título
de Mestre em Ciências**

Área de concentração Bioquímica

Orientadora: Prof^ª Dr^a Flavia Carla Meotti

São Paulo

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

“Avaliação da interação do hidroperóxido de urato com a proteína dissulfeto isomerase (PDI) em processos inflamatórios”

ELIZIANE DE SOUZA PATRÍCIO

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

Aprovado (a) por:

Prof. Dra. Flávia Carla Meotti
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dra. Sayuri Miyamoto
IQ - USP

Prof. Dra. Denise de Castro Fernandes
FM - USP

SÃO PAULO
11 de julho de 2014

À minha família pelo amor, apoio e ensinamentos

AGRADECIMENTOS

A Deus que é o meu sustento em todo tempo, minha alegria e minha força e que me concedeu essa maravilhosa oportunidade de crescimento profissional e pessoal durante o desenvolvimento do mestrado.

À minha família pelo amor, apoio e incentivo incondicionais para que eu realize meus sonhos. Palavras tornam-se simples demais para expressar o quanto amo e sou grata a cada um de vocês.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Flavia Carla Meotti, pela confiança depositada e pela oportunidade de aprendizado constante, incentivo e exemplo de profissional entusiasmada e comprometida e de líder que sabe ouvir e ensinar. Obrigada pela compreensão em momentos difíceis. Obrigada por vibrar comigo em cada experimento bem sucedido e por trabalhar junto na bancada sempre que foi preciso. Obrigada por todas as conversas edificantes e pelas discussões sobre novas ideias, sobre ciência e sobre a vida. Seu exemplo levarei para o resto de minha carreira.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado. Ao CNPq e NAP-Redoxoma pelo apoio financeiro.

Ao Prof^o Dr^o Paolo Di Mascio do Instituto de Química-USP (IQ-USP) e Fernanda Manso Prado (IQ-USP) pela colaboração na caracterização química do hidroperóxido de urato.

Ao Prof^o Dr^o Francisco Rafael Martins Laurindo do Instituto do Coração (InCor-HC/FMUSP) pelo apoio e discussões sobre os experimentos com a PDI. Obrigada pelo grande exemplo como docente e pesquisador durante a disciplina que realizei no InCor.

À Prof^a Dr^a Ohara Augusto (IQ-USP) pela discussão sobre os experimentos de cinética enzimática e pela disponibilização de seu laboratório para realização de diversos experimentos.

Aos professores do IQ-USP Dr^a Iolanda Midea Cuccovia, Dr^o Roberto Kopke Salinas, Dr^o Hernan Chaimovich, Dr^o Maurício da Silva Baptista, Dr^a Marisa H.G. Medeiros, Dr^a Alícia Kowaltowski, que gentilmente disponibilizaram seus laboratórios para realização de experimentos.

Ao Prof^o Dr^o Tony Kettle (Otago University, Nova Zelândia) pela discussão dos resultados.

Ao Dr^o Raphael Queiroz (IQ-USP) por toda atenção e tempo dedicados para ensinar-me sobre cultivo de células e demais experimentos.

À Dr^a Ana Iochabel Soares Moretti (InCor - HC/FMUSP) por toda paciência, atenção e tempo dedicados para ensinar-me a expressar proteínas.

Ao Dr^o Filipe da Silva Lima (IQ-USP) pela importante colaboração na análise dos dados de cinética.

Ao Emerson Finco Marques (IQ-USP) pelo auxílio na realização dos experimentos de espectrometria de massas de proteína.

Ao Dr^o Asif IqBal (IQ-USP) pela colaboração na realização dos ensaios de cinética utilizando o espectrofotômetro de fluxo interrompido.

Ao Marcus Prates (IQ-USP) pela amizade e colaboração na realização dos experimentos.

Ao Tony Dadamos (IQ-USP) pela colaboração para determinação do potencial de redução do hidroperóxido de urato.

Aos técnicos Márcia Aparecida, Ivone, Fernando, Edlaine, Berê, Janaína, Izaura e Divino pela prestatividade, paciência e cooperação.

A todos os professores das disciplinas que realizei durante o mestrado, tão importantes para meu crescimento profissional.

A todos os funcionários da Secretaria da Bioquímica e Pós-graduação e demais funcionários do Instituto de Química essenciais para o desenvolvimento das atividades da instituição.

Aos amigos e colegas de laboratório e departamento pela agradável convivência e colaboração: Larissa, Marcela, Laura F., Catarina, Filipe, Luciana, João, Sabrina, Faby, Maisa, Isabel, Alyne, Ronaldo, Laura M., Débora, Diana, Verônica, Orlando, Angélica e Marilene.

Aos amigos da Representação Discente: Tatiana, Filipe Augusto (Panda), Gustavo, Gilberto, Artur e Rodrigo. Foi muito bom conhecer e trabalhar com cada um de vocês.

Ao Profº Drº João Batista Calixto pela excelente oportunidade de realizar minha iniciação científica em seu laboratório no Depto. de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Ao Drº Robson Costa, pela amizade, paciência e todos os enormes ensinamentos durante a iniciação científica. Sua contribuição foi fundamental para meu crescimento e amadurecimento científico. Sou muito grata a você.

A minha amiga Gecione Neckel (Geci) pelo enorme incentivo no início de minha carreira científica. Obrigada por acreditar em mim. Sua amizade tem um valor inestimável e fez uma grande diferença em minha vida!

Aos amigos e colegas do laboratório e departamento onde realizei minha iniciação científica: Cláudia, Eduardo Cargnin, Maíra Bicca, Ju Fabris, Marianne, Stefânia, Alessandra, Raphael, Israel, Emerson, Edinéia, Kathryn, Juliana Chaves, Rodrigo, Allison, Juliana Gonçalves, Aline, Maíra Colla, Alice, Jarbas e Pedro, agradeço pelos conhecimentos passados a mim, apoio e incentivo. Vocês contribuíram para meu crescimento e amadurecimento científico.

À Layara Abiko pela grande amizade! Obrigada por todo incentivo durante o mestrado, por estudar comigo, por ficar trabalhando até tarde só para eu não voltar sozinha para casa, pelos bons e maus momentos compartilhados, obrigada por torcer por meus sonhos, pela agradável companhia e principalmente por fazer-me rir todos os dias! Guardarei com carinho as lembranças desse tempo. Sua amizade é um legado para o resto de minha vida!

Aos amigos e colegas de laboratório: Greice Kelle e Phillipe. Obrigada pela amizade, pelas longas conversas e por escutarem com paciência até as coisas mais simples pelas quais às vezes nos deixamos afligir.

À Bianca Geraldo, pela amizade, agradável companhia, atenção e compreensão nos últimos tempos. Obrigada por todos os bons momentos compartilhados!

À Adriana Domarques pela amizade, pelas boas e divertidas conversas! Sua alegria é contagiante!

À Ivone, pelo enorme carinho, pelos abraços confortantes, paciência em ouvir as coisas mais simples e principalmente por esse sorriso que deixava o laboratório mais bonito.

Aos amigos que fiz no Grupo Pedras Preciosas e na minha igreja em São Paulo, agradeço pelo apoio em todos os momentos, que me ajudaram com muito carinho sempre que precisei, pelos momentos da alegria e confraternização. Meus dias em São Paulo foram mais felizes pela presença de cada um de vocês.

Obrigada a todos que participam ou participaram de minha caminhada até aqui!

*“Lança o teu pão sobre as águas, porque
depois de muitos dias o acharás.”*

Eclesiastes 1:11

Vá até onde os teus sonhos te levarem

Ismênia Texeira Patricio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Biossíntese do ácido úrico.....	22
Figura 1.2 Produtos de oxidação do ácido úrico.....	29
Figura 1.3 Mecanismos de reação de fotooxidação.....	31
Figura 1.4 Mecanismos de reação dos hidroperóxidos.....	33
Figura 1.5 Modificações oxidativas da cisteína induzidas por hidroperóxidos.....	37
Figura 1.6 Estrutura da PDI humana.....	39
Figura 1.7 Reações redox da PDI em substratos contendo grupos tióis.....	41
Figura 3.1 Síntese do hidroperóxido de urato através de fotooxidação do tipo I com riboflavina triplete excitada.....	45
Figura 4.1 Formação do hidroperóxido de urato a partir de reação de fotossensibilização do Tipo I.....	58
Figura 4.2 Caracterização por CLAE-MS/MS do hidroperóxido sintetizado por fotooxidação.....	60
Figura 4.3 Determinação do coeficiente de absorvidade molar (ϵ) do hidroperóxido de urato.....	62
Figura 4.4 Análise da velocidade de degradação do hidroperóxido de urato.....	63
Figura 4.5 Análise da reatividade do hidroperóxido de urato com aminoácidos livres.....	65
Figura 4.6 Quantificação da GSH e GSSG após reação da GSH com hidroperóxido de urato.....	66
Figura 4.7 Hidroperóxido de urato oxida cisteínas presentes na PDI.....	67

Figura 4.8 Modificações oxidativas nos resíduos de cisteína dos sítios catalíticos da PDI.....	69
Figura 4.9 Cinética de oxidação da PDI pelo hidroperóxido de urato.....	71
Figura 4.10 Produtos de oxidação do DHE na presença de urato.....	72
Figura 4.11 Consumo de O ₂ por neutrófilos (dHL-60) ativados na presença de urato.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-OH-E ⁺	2-hidroxietídio
AMP	adenosina monofosfato
AP-1	activator protein-1
ATP	adenina trifosfato
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CO ₂	dióxido de carbono
COX-2	ciclooxigenase-2
DCV	doenças cardiovasculares
DHE	dihidroetidina
dHL-60	células HL-60 diferenciadas em neutrófilos
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTNB	5,5-ditiobis(ácido 2-nitrobenzóico)
DTPA	ácido dietilenotriamina penta acético
DTT	ditiotreitól
E.P.M.	erro padrão da média
E ⁺	etídio
<i>E</i> ^o	potencial de redução padrão
Ero1 α ou β	endoplasmic reticulum oxidoreductase 1 α ou β
EROS	espécies reativas de oxigênio
FAD	flavina adenina dinucleotídeo
FOX	ferrous oxidation xylenol orange
GMP	guanosina monofosfato
GPxs	glutathione peroxidases

GSH	glutathiona reduzida
GSSH	glutathiona oxidada
GTP	guanosina trifosfato
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HL-60	células leucêmicas promielocíticas humanas
HO•	radical hidroxila
HOOU	hidroperóxido de urato
hPDI	PDI humana
IL-1 β	interleucina-1 β
IL-6	interleucina-6
LDL	lipoproteínas de baixa densidade
LH	lipídeos
LOOH	hidroperóxidos de lipídeos
MCP-1	proteína quimiotática de monócitos 1
MPO	mieloperoxidase
MRP4	multidrug resistance protein 4
NaCl	cloreto de sódio
NAD ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídio
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NaOH	hidróxido de sódio
NF- $\kappa\beta$	nuclear factor- $\kappa\beta$
NO•	óxido nítrico
Nox	NADPH oxidase
¹ O ₂	oxigênio singlete
O ₂	oxigênio molecular

OAT1 e OAT3	organic anion transporter 1 e 3
$\text{OH}^\bullet$	radical hidroxila
ONOO^-	peroxinitrito
p38 MAPK	mitogen activated protein kinase
PBS	phosphate buffered saline
PDI	proteína dissulfeto isomerase
PMA	acetato de forbol miristato
Prxs	peroxirredoxinas
RE	retículo endoplasmático
RNA	ácido ribonucleico
$\text{RO}^\bullet$	radical alcoxila
$\text{RO}_2^\bullet$	radical peroxila
ROOH	hidroperóxido orgânico
Sen	fotossensibilizador
$\text{S}_\text{N}2$	substituição nucleofílica bimolecular
SOH	ácido sulfênico
SO_2H	ácido sulfínico
SO_3H	ácido sulfônico
Srx	sulfirredoxinas
Sub	substrato
T.A.	temperatura ambiente
TFA	ácido trifluoro acético
$\text{TNF-}\alpha$	fator de necrose tumoral- α
URAT1	uric acid transporter 1
UVA	ultravioleta A

VSMC	células do músculo liso vascular
XDH	xantina desidrogenase
XO	xantina oxidase
ϵ	coeficiente de absorvidade molar

RESUMO

PATRICIO, E. S. **Avaliação da interação do hidroperóxido de urato com a Proteína Dissulfeto Isomerase (PDI) em processos inflamatórios.** 2014. 99 p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A oxidação do ácido úrico (7,9-diidro-1H-purina-2,6,8(3H)-triona) pela mieloperoxidase (MPO) gera o radical de urato que, em presença do radical ânion superóxido combinam para formar o hidroperóxido de urato (HOOU). Considerando os altos níveis de MPO, ácido úrico e superóxido na placa de ateroma espera-se que o ácido úrico seja oxidado a HOOU neste microambiente inflamatório. O HOOU é um oxidante mais forte que o peróxido de hidrogênio e pode oxidar grupos tiólicos de proteínas como a proteína dissulfeto isomerase (PDI). Como consequência à oxidação da PDI, ocorre uma modulação positiva sobre a NADPH oxidase (Nox) com aumento da produção de superóxido por neutrófilos. Sendo assim, a formação do HOOU no leito vascular poderia elucidar os mecanismos moleculares pelos quais o urato colabora para a progressão da aterosclerose em pacientes com hiperuricemia. Para investigar a interação do HOOU com a PDI, padronizou-se a síntese química do HOOU através de um sistema de fotooxidação do tipo I, utilizando urato, riboflavina (fotossensibilizador) e luz UVA. Inicialmente padronizou-se o tipo de irradiação e tempo de reação com o melhor rendimento para a síntese do HOOU. O HOOU formado e seu produto de redução o álcool 5-hidroxiisourato foram separados, identificados e caracterizados através de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC/MS). Após a purificação, determinou-se o coeficiente de absortividade molar em 308 nm ($\epsilon_{308} = 6537 \pm 377 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) e o tempo de meia-vida, aproximadamente 41 minutos à 22°C,

do HOOU. O HOOU foi capaz de reagir seletivamente com o aminoácido metionina e com o tripeptídeo glutathione. Além disso, o HOOU não forma adutos estáveis com a glutathione, sendo que toda glutathione consumida foi transformada em glutathione dissulfeto. Quando incubado com a PDI (10 μM), cerca de 70 e 100% do total de HOOU (3 μM) foi consumido após 30 e 120 segundos, respectivamente, enquanto que a PDI (23 μM) teve seus grupos tiólicos oxidados após a incubação com 140 μM HOOU por 30 min a 22°C. O HOOU oxidou os resíduos de cisteína dos dois sítios catalíticos da PDI com uma constante de velocidade da reação de $1,5 \pm 0,04 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, demonstrando uma interação favorável com essa proteína no meio biológico e um possível papel modulatório do HOOU sobre a via PDI-Nox. Interessantemente, o ácido úrico aumentou a produção de superóxido e o consumo de oxigênio de células HL-60 diferenciadas em neutrófilos (dHL-60) e ativadas com acetato de miristato de forbol (PMA). Essa regulação poderia ser mediada através da formação do HOOU durante o “burst” oxidativo dos neutrófilos que oxidaria a enzima PDI induzindo um consequente aumento da atividade da Nox.

Palavras-chave: ácido úrico (urato), mieloperoxidase, hidróperóxido de urato, proteína dissulfeto isomerase (PDI) e inflamação.

ABSTRACT

PATRICIO, E. S. **Evaluation of the interaction of urate hydroperoxide with protein disulfide isomerase (PDI) in inflammatory processes.** 2014. 99 p. M. Sc. Dissertation – Graduate Program in Biochemistry, Chemistry Institute, University of São Paulo, São Paulo.

The oxidation of the uric acid (7,9-dihidro-1H-purine-2,6,8(3H)-trione) by myeloperoxidase (MPO) generates the urate radical. In inflammatory conditions the superoxide reacts with urate radical to form the urate hydroperoxide (HOOU). Taking into account the high amount of MPO, urate and superoxide in the atheroma plaque, it is likely that HOOU is being formed in this inflammatory environment. The HOOU is a strong oxidizing agent and can react with thiol groups from proteins, like the protein disulfide isomerase (PDI). As a consequence of its oxidation, PDI positively modulates NADPH oxidase (Nox) and increases superoxide production by neutrophils. Therefore, the formation of HOOU in the vascular sheet would contribute to tissue damage and would explain the positive correlation between hyperuricemia and the risk for cardiovascular disease. To investigate the interaction of HOOU with PDI, we performed the chemical synthesis of the compound by the Type I photooxidation, using UVA irradiation and riboflavin as a photosensitizer. Initially, we standardized the irradiation light and the time of the reaction that produced the highest income. The HOOU and its reduced product 5-hydroxiisourate were separate, identified and characterized by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC/MS). We also determine the molar extinction coefficient of HOOU at 308 nm ($\epsilon_{308} = 6537 \pm 377 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). The half-life of the compound was 41 min at 22°C. The HOOU selectively oxidized methionine and glutathione. The reaction of HOOU with glutathione did not

form any stable adducts. Thus, all consumed glutathione generated glutathione disulfide. When incubated with PDI (10 μ M), 70 and 100% of the total amount of HOOU (3 μ M) was consumed within 30 and 120 seconds, respectively. Besides, the PDI (23 μ M) had its thiol groups oxidized after incubation with 140 μ M HOOU for 30 min at 22°C. The HOOU oxidized the cysteine residues from the catalytical sites of PDI with a second order rate constant of $1.5 \pm 0.04 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. This result suggests a favorable interaction of HOOU with this protein in the biological system, as well as a possible modulatory role of HOOU on the PDI-Nox pathway. Interestingly, urate increased superoxide production and oxygen consumption by neutrophil-like cells (differentiated HL-60 cells). This effect could be mediated by the formation of HOOU during the neutrophil oxidative burst, followed by the oxidation of PDI, a positive regulation of Nox and an increase in superoxide production.

Keywords: uric acid (urate), myeloperoxidase, urate hydroperoxide, protein disulfide isomerase (PDI) and inflammation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 O ácido úrico	21
1.2 Papel dual do ácido úrico: antioxidante ou pró-oxidante	23
1.3 Mecanismos de oxidação do ácido úrico – formação do hidroperóxido de urato	27
1.4 Hidroperóxidos de interesse biológico	30
1.5 Reatividade de hidroperóxidos e sinalização redox	35
1.6 Proteína dissulfeto isomerase	38
2 OBJETIVOS	44
3 MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1 Síntese do hidroperóxido de urato por fotooxidação do tipo I	45
3.2 Detecção do hidroperóxido pelo ensaio modificado da oxidação do alaranjado de xilenol (FOX)	46
3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada à espectrometria de massas	46
3.4 Análise espectroscópica do hidroperóxido de urato	47
3.5 Determinação da constante de velocidade de decomposição (k) do hidroperóxido de urato e consumo na presença de PDI	48
3.6 Análise da reatividade do hidroperóxido de urato com aminoácidos livres	49
3.7 Quantificação da glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) após reação da glutathiona com o hidroperóxido de urato	49
3.8 Dosagem de proteínas	50
3.9 Expressão e purificação da PDI	51
3.10 Redução da PDI	51
3.11 Quantificação de cisteínas livres pelo ensaio de DTNB	51
3.12 Determinação da velocidade de reação do hidroperóxido de urato com a PDI	52
3.13 Análise da oxidação de resíduos cisteína através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada à espectrometria de massas	53
3.14 Cultura de células	54
3.15 Detecção de superóxido com dihidroetidina (DHE)	54
3.16 Consumo de oxigênio	56
3.17 Análise estatística	56
4 RESULTADOS	57

4.1 Síntese e caracterização química do hidróperóxido de urato.....	57
4.1.1 Produção do hidróperóxido de urato a partir de reações de fotooxidação do Tipo I.....	57
4.1.2 Caracterização do hidróperóxido de urato e do álcool 5-hidroxiisourato por CLAE acoplada à Espectrometria de Massas em tandem (CLAE-MS/MS).....	59
4.1.3 Caracterização do espectro de absorção e determinação do coeficiente de absortividade molar.....	62
4.1.4 Determinação do tempo de meia-vida do hidróperóxido de urato.....	63
4.2 Reatividade química do hidróperóxido de urato.....	64
4.2.1 Hidróperóxido de urato oxida seletivamente aminoácidos livres.....	64
4.2.2 Mecanismo de reatividade do hidróperóxido de urato com grupo tiol do peptídeo glutathiona.....	65
4.3 Interação do hidróperóxido de urato com a PDI.....	67
4.3.1 Hidróperóxido de urato oxida cisteínas da PDI.....	67
4.3.2 Hidróperóxido de urato oxida as cisteínas catalíticas da PDI.....	68
4.3.3 Cinética de reação do hidróperóxido de urato com a PDI.....	70
4.4 Ação pró-oxidante do urato.....	72
4.4.1 Efeito dual do urato sobre a concentração de superóxido produzida por neutrófilos (dHL-60) ativados.....	72
4.4.2 Medida do consumo de oxigênio por neutrófilos (dHL-60) ativados na presença de urato.....	73
5 DISCUSSÃO.....	75
6 CONCLUSÃO.....	82
REFERÊNCIAS.....	84
SÚMULA CURRICULAR.....	94

1 INTRODUÇÃO

1.1 O ácido úrico

Em humanos o ácido úrico (7,9-diidro-1H-purina-2,6,8(3H)-triona) é o produto final do metabolismo das purinas. Por ser um ácido orgânico fraco (pK_a 5,4) em pH fisiológico apresenta-se majoritariamente ionizado na forma de ânion urato estando presente intracelularmente e nos fluidos biológicos (Simic, Jovanovic, 1989). Sua biossíntese é catalisada pela enzima xantina oxidoreductase expressa em todos os tecidos, porém com maior atividade no fígado e na mucosa do intestino delgado. Essa enzima possui duas isoformas: xantina desidrogenase (XDH; EC 1.17.1.4) e xantina oxidase (XO; 1.17.3.2) que sucessivamente oxidam hipoxantina para xantina e então para urato (Figura 1.1). A XDH possui como cofator a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) sendo a forma predominante em tecidos bem oxigenados, porém pode ser convertida, através de clivagem proteolítica, para XO em diversas circunstâncias tais como hipóxia/reperfusão, comum em pacientes com doenças cardiovasculares (DCV). Essa isoforma utiliza o oxigênio como aceptor de elétrons, gerando superóxido e consequentemente peróxido de hidrogênio (George, Struthers, 2009; So, Thorens, 2010; Doehner, Landmesser, 2011; PubChem, 2014).

A homeostase do ácido úrico depende do balanço entre a ingestão de purinas, biossíntese, excreção e reabsorção de urato nos túbulos renais e a excreção no intestino que ocorrem através de transportadores especializados (URAT1, MRP4, OAT1, e OAT3) localizados nas células do túbulo renal proximal, epitélio intestinal e do músculo liso vascular (Hediger et al., 2005; So, Thorens, 2010).

Figura 1.1 Biossíntese do ácido úrico. O ácido úrico é formado enzimaticamente a partir das purinas provenientes do ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA), guanosina trifosfato (GTP) e adenina trifosfato (ATP). AMP: adenosina monofosfato; GMP: guanosina monofosfato; NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo; NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido.

Humanos, primatas, pássaros, répteis e insetos não apresentam a enzima uricase (urato oxidase), que em outras espécies converte o urato para alantoína. Como consequência os humanos acumulam urato apresentando valores plasmáticos entre 200 e 400 μM , os quais são muito maiores quando comparados a outras espécies como camundongos ($\sim 30\text{-}50\ \mu\text{M}$) (Hediger et al., 2005; Halliwell, Gutteridge, 2007; So, Thorens, 2010). Em 1981 Ames e colaboradores propuseram que esse acúmulo de urato no sangue seria uma adaptação evolutiva, visto que o ácido úrico apresenta ação antioxidante semelhante ao ácido ascórbico, o qual não é produzido endogenamente (Ames et al., 1981; Hediger et al., 2005; Sautin, Johnson, 2008).

1.2 Papel dual do ácido úrico: antioxidante ou pró-oxidante

A ação antioxidante do urato parece ser particularmente importante no sistema nervoso central (Kutzing, Firestein, 2008; Cipriani et al., 2010). Estudos epidemiológicos sugerem que baixos níveis de urato estejam relacionados com doenças como esclerose múltipla e neurite óptica (Toncev et al., 2002; Knapp et al., 2004; Peng et al., 2008). Corroborando com esses dados, o tratamento com ácido úrico melhora o quadro clínico de camundongos com encefalomielite autoimune experimental (modelo animal de esclerose múltipla) (Hooper et al., 1998), sendo essa ação atribuída por alguns autores à capacidade do urato em reagir com o peroxinitrito (Hooper et al., 2000). O ácido úrico também parece ter um efeito neuroprotetor em outras patologias neurodegenerativas, tais como a Doença de Alzheimer e a Doença de Parkinson, que apresentam o estresse oxidativo como um dos elementos importantes do seu desenvolvimento (Weisskopf et al., 2007; Euser et al., 2009; Bowman et al., 2010; Cipriani et al., 2010).

Embora o urato possa apresentar os efeitos benéficos supracitados, concentrações elevadas desse ânion no plasma ocasionadas por fatores genéticos e/ou ambientais (dieta e idade) podem ser prejudiciais em determinadas circunstâncias (Sautin, Johnson, 2008; de Oliveira, Burini, 2012). Além do risco de gota e nefrolitíase, dados epidemiológicos têm demonstrado que a hiperuricemia, definida como concentração plasmática de urato $>420 \mu\text{M}$ (7 mg/dl) em homens e $>300 \mu\text{M}$ (6 mg/dl) em mulheres, está correlacionada com a progressão de DCV como aterosclerose e hipertensão na ausência de outras alterações metabólicas (Choi et al., 2005; Hediger et al., 2005; Viazzi et al., 2005; Alderman, 2007; Feig et al., 2008; So, Thorens, 2010; de Oliveira, Burini, 2012).

Atualmente as DCV são a principal causa de morte e morbidade no Brasil e no mundo (WHO, 2014; Mansur, Favarato, 2012) visto que a progressão da aterosclerose pode causar trombose e consequentemente infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral. O desenvolvimento da aterosclerose é multifatorial e está associado principalmente à hiperlipidemia, diabetes, hipertensão e tabagismo (Schoen, 2005). Trata-se uma doença inflamatória crônica, multifocal e latente das artérias de médio e grande calibre; sua patogênese envolve disfunção endotelial, desequilíbrio no metabolismo lipídico e resposta imune, sendo caracterizada pela formação de placas de ateroma constituídas por neutrófilos, linfócitos, células espumosas derivadas de macrófagos, componentes de matriz extracelular, proliferação de células musculares lisas, endurecimento, isto é, espessamento da parede arterial (Droge, 2002; Falk, 2006; Weber, Noels, 2011; Libby, 2012).

Os processos oxidativos contribuem expressivamente para o desenvolvimento da aterosclerose e seus consequentes eventos cardiovasculares (Stocker, Keaney, 2004; Madamanchi, Runge, 2013). Dentre os mecanismos conhecidos pelos quais substâncias reativas

oxidativas contribuem para aterogênese inclui-se: promoção da peroxidação lipídica; ativação de fatores de transcrição redox sensíveis, estimulando a expressão de genes pró-inflamatórios; oxidação de proteínas e danos no DNA mitocondrial e nuclear (Stocker, Keaney, 2004; Elahi et al., 2009; Niki, 2011; Li et al., 2013; Madamanchi, Runge, 2013).

Sendo assim, a participação do ácido úrico na aterosclerose pode estar associada à possibilidade desse metabólito tornar-se um pró-oxidante dependendo do microambiente (Johnson et al., 2003; Hayden, Tyagi, 2004; Sautin, Johnson, 2008), visto que sua ação antioxidante é dependente da presença de ácido ascórbico para neutralizar o radical de urato e limitada a ambientes hidrofílicos como o plasma (Muraoka, Miura, 2003; Kanellis, Kang, 2005; So, Thorens, 2010). De fato, a presença de urato aumenta a peroxidação lipídica induzida por metais livres (Bagnati et al., 1999; Filipe et al., 2002) e a reação do urato com o peroxinitrito pode gerar, dentre outros produtos, o radical aminocarbonila capaz de propagar reações oxidativas (Santos et al., 1999).

Além disso, em células mononucleares cristais de ácido úrico estimulam a síntese das moléculas pró-inflamatórias: interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), importantes no desenvolvimento da aterosclerose (Glantzounis et al., 2005; Kleemann et al., 2008; Sprague, Khalil, 2009; Billiet et al., 2014). Porém, mesmo em sua forma solúvel e em concentrações fisiológicas, o urato ativa vias inflamatórias em células do músculo liso vascular tais como p38 MAPK (*mitogen activated protein kinase*) e os fatores de transcrição NF- κ B (*nuclear factor- κ B*) e AP-1 (*activator protein-1*) aumentando a expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2) e da proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) causando proliferação celular (Kanellis et al., 2003; Corry et al., 2008).

Interessantemente, esses efeitos do urato parecem ser dependentes de mecanismos redox ainda pouco compreendidos. De fato, o aumento na produção de MCP-1 induzido pelo urato em adipócitos ocorre apenas na presença de superóxido proveniente da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase (Baldwin et al., 2011). Nessas células o urato é capaz de ativar a NADPH oxidase (Nox) exacerbando a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) (Sautin et al., 2007).

Os neutrófilos expressam grande quantidade de Nox, mieloperoxidase (MPO) e lipooxigenases (Swirski, Nahrendorf, 2013), contribuindo para o estresse oxidativo, um dos principais fatores responsáveis pela disfunção endotelial, crescimento da lesão e instabilidade da placa de ateroma (Zernecke et al., 2008; Rotzius et al., 2010; Weber, Noels, 2011). Estudos em humanos e modelos animais têm sugerido uma correlação direta entre a quantidade de neutrófilos circulantes e eventos cardiovasculares. Placas com características histológicas de propensão ao rompimento, com o grande acúmulo lipídico e pouco colágeno, apresentam um maior número de neutrófilos (Baetta, Corsini, 2010; Guasti et al., 2011). Esse tipo celular é o primeiro a migrar para as áreas de lesão tecidual, estimulando o recrutamento de monócitos e à maturação destes em macrófagos com fenótipo pró-inflamatório (M1) (Weber, Noels, 2011; Soehnlein, 2012).

Devido à contribuição dos polimorfonucleares para o desenvolvimento e progressão da aterosclerose, proteínas provenientes dessas células, como a MPO, estão sendo consideradas como possíveis biomarcadores para o diagnóstico de DCV (Schindhelm et al., 2009; Soehnlein, 2012). A MPO é especialmente importante nessa patologia, pois gera diversas espécies reativas, incluindo ácido hipocloroso, cloroaminas, radicais de tirosila e dióxido de nitrogênio, as quais podem causar a oxidação de proteínas e lipídeos presentes em lipoproteínas de baixa e alta densidade, promovendo a formação das células espumosas e acúmulo de colesterol na parede

arterial. A MPO pode ainda desestabilizar as placas de ateroma através da ativação de metaloproteinases e diminuir a biodisponibilidade do vasodilatador óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$), resultando em disfunção endotelial (Podrez et al., 2000; Klebanoff, 2005; Schindhelm et al., 2009).

1.3 Mecanismos de oxidação do ácido úrico – formação do hidroperóxido de urato

As propriedades antioxidantes do ácido úrico provem da sua capacidade de doar elétrons devido às duplas ligações presentes em sua estrutura (de Oliveira, Burini, 2012), dessa maneira pode reagir com importantes oxidantes biológicos tais como radicais peroxila ($\text{RO}_2^\bullet$), radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$), oxigênio singlete e peroxinitrito (ONOO^-) (Masuda et al., 1975; Ames et al., 1981; Becker, 1993; Santos et al., 1999; de Oliveira, Burini, 2012).

A transferência direta de dois elétrons do urato para oxidantes como o ácido hipocloroso produz dehidrourato e conseqüentemente alantoína, que pode ser degradada para ácido glioxálico ou formar ácido cianúrico, oxônico ou parabânico após reagir com outras espécies reativas (Figura 1.2) (Becker, 1993; Santos et al., 1999). Por isso, essas moléculas são investigadas como possíveis marcadores de estresse oxidativo (Kaur, Halliwell, 1990; Hellsten et al., 2001).

Já a transferência de apenas um elétron do urato para agentes oxidantes produz o radical de urato que é relativamente estável (Figura 1.2), devido à delocalização do elétron no anel purínico (Maples, Mason, 1988; Becker, 1993). Esse radical pode sofrer dismutação retornando a forma de urato; ser oxidado formando alantoína ou reduzido a urato na presença de ascorbato. O radical de urato pode ainda reagir rapidamente com o ânion radical superóxido ($k = 8 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) (Halliwell, Gutteridge, 2007).

Meotti e colaboradores (2011) demonstraram que a enzima MPO pode usar o ácido úrico como substrato formando o radical de urato, o qual na presença de um sistema gerador de radical superóxido, situação que imita o “burst” oxidativo inflamatório, reage formando o hidroperóxido de urato (Figura 1.2), cuja atividade biológica ainda não foi caracterizada.

Sendo assim, visto que o urato está presente em altas concentrações nos fluidos biológicos, no microambiente inflamatório da placa de ateroma onde há grande quantidade de superóxido e MPO, o agente oxidante hidroperóxido de urato poderia ser formado, possibilitando a regulação de vias de sinalizações inflamatórias que apresentam proteínas redox sensíveis. Essa hipótese amplia a participação da MPO na aterogênese e poderia elucidar, ao menos em parte, os mecanismos moleculares envolvidos na progressão da aterosclerose em pacientes com hiperuricemia, os quais ainda são pouco compreendidos.

Figura 1.2 Produtos de oxidação do ácido úrico. As setas contínuas representam reações diretas e a seta pontilhada via de degradação indireta. ER: espécies reativas; T.A.: temperatura ambiente. Baseado em Kahn et al. (1997); Kahn e Tipton (1998); Halliwell e Gutteridge (2007) e Meotti et al. (2011).

1.4 Hidroperóxidos de interesse biológico

Os hidroperóxidos (R-O-O-H) pertencem à classe dos peróxidos orgânicos, sendo considerados derivados estruturais do peróxido de hidrogênio onde um dos átomos de hidrogênio foi substituído (Ando, 1992). Os hidroperóxidos apresentam um importante papel em reações de oxidação e sua reatividade é geralmente atribuída a baixa energia da ligação O-O ($\approx 34 \text{ kcal.mol}^{-1}$ para um peróxido genérico) que facilita sua clivagem homolítica, a basicidade do grupo O-O e a acidez da ligação O-H (Bach, 2006). Os substituintes R (alquila ou arila) também podem modificar as propriedades funcionais dos hidroperóxidos através de efeitos eletrônicos e/ou estéricos, hiperconjugação e ligações de hidrogênio, alterando fatores como energia de dissociação de ligação, potenciais redox e pKa (Hartung, Svoboda, 2006).

Para síntese de hidroperóxidos orgânicos são utilizados reagentes que já apresentam a ligação O-O, tais como o peróxido de hidrogênio, o oxigênio singlete ou triplete, o ânion radical superóxido ou o ozônio (Ando, 1992). Portanto, reações que têm como reagentes qualquer uma destas espécies podem ser utilizadas para geração de hidroperóxidos. Como exemplo, temos as reações de fotooxidação, as quais consistem na combinação de um substrato, luz e oxigênio na presença de uma molécula que absorva luz, chamada de fotossensibilizador (Iesce et al., 2005). Essas reações podem ser classificadas como tipo I ou II; em ambos os casos o fotossensibilizador (^1Sen) absorve energia passando para os estados excitados singlete ($^1\text{Sen}^*$) e posteriormente triplete ($^3\text{Sen}^*$) através de cruzamento intersistema (transição não radiativa entre dois estados eletrônicos de multiplicidade diferentes $S_1 \rightarrow T_1$) (Figura 1.3) (Greer, 2006; Cardoso et al., 2012; Marian, 2012).

Figura 1.3 Mecanismos de reação de fotooxidação. A reação do tipo I representada demonstra o mecanismo por transferência de um elétron. Sen: fotossensibilizador; CIS: conversão intersistema; Sub: substrato. Adaptado de Greer (2006) e Cardoso et al. (2012).

Nas reações do tipo I ocorre transferência de um elétron ou hidrogênio do substrato (Sub) para o fotossensibilizador (${}^3\text{Sen}^*$), formando um cátion radical ou radical do substrato ($\text{Sub}^{\bullet+}$ ou $\text{Sub}^{\bullet}$) e um ânion radical do fotossensibilizador (${}^2\text{Sen}^{\bullet-}$) ou sua forma reduzida radicalar (${}^2\text{SenH}^{\bullet}$), respectivamente. Em seguida, o fotossensibilizador (${}^2\text{Sen}^{\bullet-}$ ou ${}^2\text{SenH}^{\bullet}$) é oxidado pelo oxigênio molecular (${}^3\text{O}_2$) gerando o ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) que reagirá com substrato ($\text{Sub}^{\bullet+}$ ou $\text{Sub}^{\bullet}$) ocasionando sua oxigenação (Figura 1.3) (Quintero, Miranda, 2000; Choe et al., 2005; Cardoso et al., 2012). Já na reação do tipo II ocorre transferência de energia do fotossensibilizador para o oxigênio molecular produzindo oxigênio singleto (${}^1\text{O}_2$) que reagirá com o substrato gerando produtos oxigenados (Figura 1.3) (Greer, 2006).

No ambiente celular a formação de hidroperóxidos ocorre através da oxidação de biomoléculas por ${}^1\text{O}_2$ ou radicais, mas também por ação enzimática (Cadet, Di Mascio, 2006; Augusto, Myiamoto, 2011). As bases nitrogenadas timina, uracila, citosina e guanina são susceptíveis à oxidação não enzimática originando seus respectivos hidroperóxidos (Cadet et al., 2006; Prado et al., 2009); para revisão ver Cadet e Di Mascio (2006). Esse tipo de oxidação também é responsável pela geração de hidroperóxidos de lipídeos, todavia esses também podem

ser sintetizados por lipooxigenases, ciclooxigenases, citocromo P450 e heme-peroxidases (Kuhn, Borchert, 2002; Girotti, 2008; Augusto, Miyamoto, 2011). Na literatura também já foram descritos hidroperóxidos dos resíduos de lisina, valina, leucina, histidina, tirosina e triptofano. A peroxidação de aminoácidos pode ser mediada por espécies reativas ou por sistemas peroxidase/H₂O₂ (Davies, 2004; Miyamoto et al., 2007; Das et al., 2010; Davies, 2011). Nesse último caso, enzimas como a MPO oxidam o substrato produzindo um radical que reagirá com o superóxido formando o produto oxigenado (Winterbourn et al., 2004; Davies, 2011). Esse mecanismo também é responsável pela oxidação do ácido úrico gerando hidroperóxido de urato, cuja atividade biológica permanece inexplorada (Figura 1.2) (Meotti et al., 2011).

Os hidroperóxidos podem participar de reações radicalares (após redução por um elétron causada por metais de transição) ou oxidações envolvendo a transferência de dois elétrons (Davies, 2005; Girotti, 2008; Davies, 2011) (Figura 1.4). Sendo assim, apresentam funções fisiológicas distintas, pois dependendo de sua reatividade, especificidade e microambiente podem ampliar a peroxidação lipídica e/ou reagir com aminoácidos sensíveis à oxidação, tais como tirosina, triptofano, metionina e cisteína, promovendo consequências diversas como inativação de enzimas ou modulação de vias de sinalização de acordo com o aminoácido/proteínas alvo.

A) Reações envolvendo a transferência de 1e⁻ **B) Reações envolvendo a transferência de 2e⁻**

Figura 1.4 Mecanismos de reação dos hidroperóxidos. (A) Redução do hidroperóxido pelo íon ferroso (Reação de Fenton) formando um radical alcóxila (RO[•]); se o ROOH for H₂O₂, RO[•] será o radical hidroxila (HO[•]). O radical formado pode reagir com diversas biomoléculas como hidroperóxidos de lipídeos (LOOH), lipídeos (LH) ou aminoácidos. **(B)** Reações do hidroperóxido envolvendo a transferência de 2e⁻ com os aminoácidos cisteína e metionina.

Certos hidroperóxidos orgânicos são instáveis dependendo de sua estrutura química; já outros como os hidroperóxidos de lipídeos são menos reativos, mas podem participar de reações de decomposição que aumentam sua toxicidade. Nesses casos, as constantes de velocidade de decomposição em solução dependem da concentração, da natureza do hidroperóxido, das características do solvente, temperatura e da presença de catalisadores como ácidos, bases e íons metálicos (Hiatt, Irwin, 1968). A partir dos hidroperóxidos podem ser formados álcoois, compostos carbonílicos, ¹O₂ ou espécies radicalares (radicais alcóxila, peróxila, radicais

centrados em átomos de carbono ou superóxido) de acordo com os reagentes envolvidos na reação. Álcoois e aldeídos específicos derivados de hidroperóxidos têm sido investigados como possíveis marcadores estáveis de dano oxidativo (Ando, 1992; Davies, 2004; Davies, 2005; Cadet, Di Mascio, 2006; Miyamoto et al., 2007; Augusto, Miyamoto, 2011).

Sendo assim, para diminuir a toxicidade dos hidroperóxidos e modular suas funções no organismo, esses compostos apresentam sistemas de detoxificação específicos formados por peroxirredoxinas (Prxs), glutathione peroxidases (GPxs) e catalase, enzimas especializadas na redução de hidroperóxidos pela transferência de dois elétrons (Augusto, Miyamoto, 2011).

Através da ação das Prxs, o H_2O_2 , peroxinitrito e uma ampla variedade de hidroperóxidos orgânicos são reduzidos, diminuindo a toxicidade desses compostos. As Prxs são divididas em três classes pelo número e localização das cisteínas catalíticas: 2-Cys Prxs típicas (Prx I-IV); 2-Cys Prx atípica (Prx V); e 1-Cys Prx (Prx VI). Em todas as Prxs uma cisteína do sítio ativo (cisteína peroxidásica; Cys–SPH) é oxidada para ácido sulfênico (Cys–SOH) após reagir com um peróxido. Em 2-Cys Prxs, esse ácido sulfênico reage com outro grupo tiol da proteína gerando um dissulfeto. Nas 2-Cys Prx típicas o segundo tiol (cisteína de resolução; Cys–SrH) está presente em outra subunidade da enzima, já na 2-Cys Prx atípica ele está localizado na mesma subunidade (Wood et al., 2003; Rhee et al., 2012).

Já as GPxs (1-4) são selenoperoxidases que reduzem o H_2O_2 para H_2O ou hidroperóxidos de lipídeos (LOOH) e hidroperóxidos sintéticos para seus respectivos hidróxidos utilizando a glutathione (GSH) como equivalente redutor (Reações 1 e 2) (Kuhn, Borchert, 2002; Brigelius-Flohe, Maiorino, 2013).

Por fim, a catalase trata-se de uma hemoproteína específica para detoxificação do H_2O_2 , catalisando sua redução para H_2O e O_2 (Reação 3) (Halliwell, Gutteridge, 2007).

1.5 Reatividade de hidroperóxidos e sinalização redox

Vias de sinalização celular podem ser moduladas por hidroperóxidos ou outras espécies derivadas do oxigênio ou nitrogênio (sinalização redox). O principal mecanismo envolvido ocorre através da oxidação reversível de determinados resíduos de cisteína, alterando a estrutura e/ou atividade enzimática de proteínas específicas (Winterbourn, Hampton, 2008; Brigelius-Flohe, Flohe, 2011; Bindoli, Rigobello, 2013). Essas modificações oxidativas podem ser pontes dissulfeto, ácido sulfênico, ácido sulfínico, cisteínas glutathioniladas ou nitrosiladas (Janssen-Heininger et al., 2008).

A cisteína é o aminoácido chave na sinalização redox devido à presença do grupo tiol (-SH) em sua cadeia lateral, pois o átomo de enxofre pode sofrer modificações oxidativas reversíveis e assumir diversos estados de oxidação (-2 a +4) (Reddie, Carroll, 2008; Lo Conte; Carroll, 2013) (Figura 1.5 A). O grupo tiol atua como um nucleófilo e torna-se mais reativo quando desprotonado, ou seja, na forma de ânion tiolato ($-\text{S}^-$). Sendo assim o pKa do resíduo de cisteína atua como um fator importante para determinar sua reatividade. O valor médio do pKa de

um tiol em uma cisteína livre ou em peptídeos é de aproximadamente 8,6; mas pode variar entre 3,5 e 10 em proteínas dependendo da estrutura primária e secundária (Janssen-Heininger et al., 2008; Chung et al., 2013; Gupta, Carroll, 2014).

Devido ao seu baixo potencial de redução em proteínas (E° -0,27 a -0,125 V) o ânion tiolato reage facilmente com uma ampla variedade de oxidantes, através da transferência de um elétron, quando o agente oxidante é um radical, ou através de dois elétrons na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou hidroperóxidos foco desse capítulo (Reddie, Carroll, 2008; Roos, Messens, 2011; Gupta, Carroll, 2014). Uma revisão mais detalhada sobre a reação de cisteína com espécies radicalares pode ser encontrada em Lo Conte e Carroll (2013) e Reddie e Carroll (2008).

A reação entre hidroperóxidos orgânicos e o ânion tiolato ocorre através de uma substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) semelhante ao processo envolvendo o H_2O_2 . No estado de transição forma-se uma ligação parcial do oxigênio distal com o átomo de enxofre e com o grupo abandonador (Figura 1.5 B) (Flohe et al., 2011; Bindoli, Rigobello, 2013). Como produtos obtêm-se um álcool, produto da redução do hidroperóxido, e o ácido sulfênico (-SOH), que pode ser reduzido para dissulfeto através da reação com tióis inter ou intramoleculares ou oxidado para ácido sulfínico (-SO₂H), caso a concentração de peróxido esteja elevada e a formação de dissulfetos não seja preferencial. O ácido sulfínico foi considerado por muito tempo como uma modificação irreversível, porém recentemente demonstrou-se que quando formado em 2-Cys Prxs pode ser reduzido através da ação enzimática de sulfirredoxinas (Srx) (Woo et al., 2005; Lowther, Haynes, 2011). Todavia, o ácido sulfínico pode ainda ser oxidado de maneira irreversível a ácido sulfônico (-SO₃H) (Figura 1.5 A) (Reddie, Carroll, 2008; Roos, Messens, 2011).

Figura 1.5 Modificações oxidativas da cisteína induzidas por hidropéroxidos. (A) Tióis em sua forma dissociada (ânion tiolato), interagem com hidropéroxidos, levando a formação do ácido sulfênico conforme o mecanismo apresentado em (B). O ácido sulfênico, se não estiver em um ambiente inacessível, pode ser reduzido novamente para ânion tiolato, oxidado para ácido sulfínico ou reagir com um ânion tiolato intra ou intermolecular gerando dissulfeto. A formação de ácido sulfênico e dissulfeto são processos reversíveis nos sistemas biológicos. Já o ácido sulfínico pode ser reduzido apenas quando formado em 2-Cys Prx através da ação enzimática de sulfiredoxinas (Srx). O número de oxidação do átomo de enxofre está entre parênteses. **(B)** Mecanismo de formação do ácido sulfênico através da reação entre o ânion tiolato e hidropéroxidos. O nucleófilo tiolato ($R-S^-$) ataca o oxigênio eletrofílico do hidropéroxido ($RO-OH$), formando uma ligação parcial do oxigênio distal com o átomo de enxofre e com o grupo abandonador durante o estado de transição; como produtos obtêm-se o ácido sulfênico ($R-SOH$) e respectivo álcool (ROH) do hidropéroxido. Adaptado de Bindoli e Rigobello (2013).

As velocidades de reação dos tiolatos com hidropéroxidos orgânicos ou H_2O_2 variam entre 10 a $10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ dependendo do microambiente (Forman et al., 2004; Reddie, Carroll, 2008). Fatores como o tamanho e tipo do hidropéroxido bem como a acessibilidade do grupo tiol e características do sítio catalítico na proteína alvo podem influenciar, por isso um mesmo peróxido

pode apresentar diferentes velocidades de reação com proteínas distintas (Davies, 2004; Janssen-Heininger et al., 2008; Gupta, Carroll, 2014).

Prxs e algumas GPx são proteínas tiólicas que apresentam altas constantes de velocidade de reação com H_2O_2 e hidroperóxidos ($\sim 10^4$ a $10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) (Flohe et al., 2011). Todavia, outras proteínas como tirosina fosfatases, embora não sejam cineticamente competitivas (10 a $40 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), também podem reagir com o H_2O_2 através de resíduos de cisteína essenciais para suas funções, influenciando cascatas de sinalização (Reddie, Carroll, 2008; Winterbourn, Hampton, 2008; Gupta, Carroll, 2014). De fato, estudos baseados em análise computacional e proteômica sugerem que cisteínas reativas com potencial para modular atividade podem estar presentes em mais de 500 proteínas (Fomenko et al., 2007; Weerapana et al., 2010; Finkel, 2011).

Desse modo, amplia-se a diversidade de proteínas tiólicas que podem participar de sinalização redox, tornando-as alvos interessantes para investigarmos as atividades biológicas dos hidroperóxidos.

1.6 Proteína dissulfeto isomerase

Dentre as proteínas tiólicas pode-se destacar a proteína dissulfeto isomerase (PDI), que pertence à superfamília das tiorredoxinas, composta por ditiol/dissulfeto oxirredutases que apresentam similaridade com a tiorredoxina, proteína de 10 KDa que possui o motivo catalítico Cys-X-X-Cys (Wilkinson, Gilbert, 2004). A PDI (PDIA1; EC 5.3.4.1) é o membro fundador de uma família com aproximadamente 20 proteínas homólogas (Hatahet, Ruddock, 2009). Dentre essas, acredita-se que a PDIA1 seja a mais sintetizada, com expressão constitutiva na maioria dos tecidos e órgãos. Está presente abundantemente no lúmen do retículo endoplasmático (RE), mas

também pode ser secretada por diversas células como hepatócitos, endotélio e plaquetas ativadas, localizando-se na parte externa da membrana plasmática ou no meio extracelular (Wilkinson, Gilbert, 2004; Xu et al., 2014).

A PDI é codificada pelo gene *P4HB*, possui 508 aminoácidos e 57 KDa sendo composta por quatro domínios: **a**, **b**, **b'** e **a'** arranjados em formato de 'U' torcido; com uma região de conexão **x** entre os domínios **b'** e **a'** e uma extensão C-terminal **c** que possui a sequência de aminoácidos KDEL presente em proteínas do RE (Xu et al., 2014). Essa proteína possui dois sítios ativos idênticos e independentes (CGHC) localizados um em cada domínio: **a** e **a'** (Figura 1.6) (Wilkinson, Gilbert, 2004). Lappi e colaboradores (2004) utilizando o domínio **a** da PDI demonstraram que o triptofano (W52) adjacente ao sítio ativo desse domínio pode ser utilizado como um marcador espectroscópico do estado redox desse sítio, visto que a fluorescência emitida pelo resíduo diminui após oxidação, sendo uma ferramenta útil para estudos de cinética (Lappi et al., 2004; Karala et al., 2009; Lappi, Ruddock, 2011).

Figura 1.6 Estrutura da PDI humana. (A) Representação esquemática da PDI humana (hPDI) com os domínios *a*, *b*, *b'* e *a'* e as regiões *x* e *c*; a posição de todos os resíduos de cisteína presentes na estrutura estão demonstrados assim como os resíduos de triptofano adjacentes aos sítios catalíticos. (B) Representação do tipo *Ribbon* da estrutura cristalográfica da hPDI na forma reduzida. Cada domínio está colorido como em (A). Adaptado de Wang et al. (2013).

Os resíduos de cisteína N-terminais de cada sítio estão posicionados na superfície da proteína com os grupamentos tióis acessíveis para reações redox apresentando valores de pKa entre 4,5 e 5,6; enquanto as cisteínas C-terminais são menos expostas e possuem valores de pKa entre 9 e 12. Todavia, alguns estudos sugerem que durante reações bioquímicas, o domínio *a* sofre mudanças conformacionais que alteram o pKa das cisteínas C-terminais para 6,1 (Gruber et al., 2006; Xu et al., 2014).

Devido à presença desses resíduos de cisteína essa enzima catalisa a formação e redução de pontes dissulfeto (atividade oxirredutase) e o rearranjo de dissulfetos incorretos (atividade isomerase) em proteínas e peptídeos, e atua como uma chaperona, podendo essa atividade ser independente de sua função oxirredutase (Figura 1.7) (Laurindo et al., 2012; Xu et al., 2014). Contudo, a oxidação do sítio *a'* altera a conformação da PDI expondo áreas hidrofóbicas que contribuem para atividade chaperona (Wang et al., 2012).

Figura 1.7 Reações redox da PDI em substratos contendo grupos tióis. Em ambientes mais redutores, como fora do RE, a PDI apresenta maior atividade redutase. Já no interior do RE possui maior atividade como tiol oxidase e/ou isomerase importantes para o enovelamento correto de proteínas. Adaptado de Laurindo et al. (2008).

O ciclo catalítico da PDI no RE é dependente de sua oxidação, que ocorre preferencialmente pela ação das flavoenzimas Ero1 α ou β (*endoplasmic reticulum oxidoreductase*), que oxidam a PDI através da transferência de dois elétrons, via flavina adenina dinucleotídeo (FAD), para o oxigênio molecular produzindo H₂O₂; mas a formação de dissulfetos na PDI pode também ocorrer pela interação com a glutatona oxidada (GSSG), Prx IV ou GPx 7/8 (Wilkinson, Gilbert, 2004; Laurindo et al., 2012). Além de seu importante papel no enovelamento de proteínas, a PDI é uma subunidade da enzima prolil 4-hidroxilase e da proteína de transferência de triglicerídeos microsomal estabilizando esses complexos proteicos no RE (Pihlajaniemi et al., 1987; Wetterau et al., 1990; Wilkinson, Gilbert, 2004).

A compreensão sobre as funções da PDI no RE ou fora dessa organela tem crescido nos últimos anos. Estudos sugerem que alterações na expressão e/ou atividade dessa enzima poderiam estar relacionadas com o desenvolvimento de diversas patologias como câncer, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (Laurindo et al., 2008; Laurindo et al., 2012; Xu et al.,

2014). Corroborando com essas evidências demonstrou-se que a PDI extracelular participa de diversas funções biológicas tais como: coagulação, ativação plaquetária e formação de trombos. Além disso, modula a integrina $\alpha M\beta 2$, regulando o recrutamento de neutrófilos em processos de inflamação vascular (Hahm et al., 2013).

De grande relevância, demonstrou-se que a PDI exerce um papel regulatório sobre as NADPH oxidases 1, 2 e 4, sendo esse efeito dependente da modulação redox da PDI (Janiszewski et al., 2005; Paes et al., 2011). Dentre as NADPH oxidases, a Nox 2 apresenta-se com uma subunidade catalítica flavocitocromo b_{558} ligada à membrana, um heterodímero de $gp91^{phox}$ e $p22^{phox}$, além das subunidades regulatórias presentes no citosol ($p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $p40^{phox}$) e GTPases. Sob ativação, estas subunidades formam um complexo multimérico na membrana plasmática da célula ou na membrana do fagossoma, nos casos de fagocitose. A ativação da subunidade $p47^{phox}$ é particularmente importante, pois constitui a subunidade redox sensível, modulada pela PDI. A subunidade catalítica da Nox transfere um elétron do NADPH do citosol para o oxigênio, formando superóxido (Bedard, Krause, 2007). Este processo é importante durante a resposta imune contra patógenos, mas também pode ter outras funções ainda pouco entendidas.

Por exemplo, a produção de superóxido pela Nox pode ser responsável pela sinalização secundária de fatores de transcrição dependentes de processos redox e a consequente remoção de óxido nítrico pela reação entre o radical superóxido e o óxido nítrico ($\sim 10^9 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$) é um importante fator responsável pela alteração da atividade vascular (Nauseef, 2008; Leto et al., 2009; Lassegue, Griendling, 2010). Por fim, vale a pena destacar que o superóxido, como mencionado anteriormente, é um precursor do hidropéroxido de urato.

Visto que o hidróperóxido de urato trata-se um agente oxidante, esse composto formado no microambiente pró-inflamatório como a placa de ateroma poderia modular vias de sinalização inflamatórias que apresentam proteínas redox sensíveis, tal como a via PDI-Nox. Esse mecanismo poderia propagar ainda mais modificações oxidativas na célula, induzindo alterações do tecido vascular, progressão da inflamação e retardo do reparo (resolução). Desse modo, a formação do hidróperóxido de urato no leito vascular poderia parcialmente elucidar os mecanismos moleculares envolvidos na progressão da aterosclerose em pacientes com hiperuricemia.

2 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Portanto, este trabalho teve como objetivo investigar os efeitos do hidroperóxido de urato (HOOU) sobre a proteína dissulfeto isomerase (PDI) e a ação pró-oxidante do urato em células HL-60 diferenciadas em neutrófilos, buscando elucidar possíveis mecanismos pró-inflamatórios do hidroperóxido de urato.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- padronizar síntese química do hidroperóxido de urato;
- avaliar as características químicas e espectroscópicas desse composto;
- avaliar a reatividade do HOOU com antioxidantes de baixo peso molecular;
- avaliar sua possível interação com a PDI, investigando os resíduos alvos de oxidação assim como a cinética de interação;
- avaliar o efeito do urato sobre a produção de superóxido de células HL-60 diferenciadas em neutrófilos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Síntese do hidropéroxido de urato por fotooxidação do tipo I

O hidropéroxido de urato foi sintetizado segundo o método descrito por Clausen et al. (2010) com pequenas modificações (Figura 3.1). Em resumo, soluções-estoque de urato (10 mM) e riboflavina (500 μ M) foram preparadas em NaOH (20 mM) e tampão fosfato (10 mM; pH = 6,8), respectivamente; a reação entre urato (0-600 μ M) e riboflavina (40 μ M) foi realizada em tampão fosfato (10 mM; pH = 6,8) em placa para cultura de células com 6 poços exposta à radiação UVA (365 nm) (irradiador 2 UV-A com 6 lâmpadas para UV-A (GE); Novatecnica Campinas-Brasil; $\sim 1,5$ mW/cm²) e Visível (405-630 nm) (arranjo com 8 lâmpadas fluorescentes; $\sim 3,0$ mW/cm²) a 20°C sob agitação contínua. Em todos os experimentos a solução tampão fosfato e fase móvel aquosa foram agitadas com Chelex[®] (Sigma Aldrich) por pelo menos uma hora para remoção de metais traço.

Figura 3.1 Síntese do hidropéroxido de urato através de fotooxidação do tipo I com riboflavina triplete excitada. Rib: riboflavina; CIS: cruzamento intersistema; SOD: superóxido dismutase. Adaptado de Clausen et al. (2010).

3.2 Detecção do hidroperóxido pelo ensaio modificado da oxidação do alaranjado de xilenol (FOX)

O hidroperóxido foi quantificado pelo ensaio modificado da oxidação do alaranjado de xilenol, do inglês ferrous oxidation xylenol orange – FOX, após adição de catalase (10 U/mL) às amostras, segundo o método descrito por Wolff (1994) adaptado para baixas concentrações de peróxido (Winterbourn et al., 2004), onde 220 µL de amostra foram adicionados a 80 µL do reagente de FOX. O método de FOX baseia-se na oxidação do Fe^{2+} (sulfato ferroso amoniacal) a Fe^{3+} por hidroperóxidos em meio ácido. Por sua vez, o íon férrico forma um complexo com o alaranjado de xilenol de coloração violeta que possui absorção entre 540-600 nm (Nourooz-Zadeh, 1999). Antes da leitura das absorbâncias em 560 nm no leitor de microplaca (Infinite M200; Tecan[®]), as amostras foram deixadas no escuro por 40 minutos. A quantificação do peróxido é inferida através da realização de curva padrão com o peróxido de hidrogênio (0 – 10 µM, o peróxido de hidrogênio da solução inicial foi quantificado através de seu coeficiente de absorvidade molar $\epsilon_{240\text{nm}} = 43,6 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada à espectrometria de massas

O hidroperóxido de urato foi separado e identificado utilizando um sistema de CLAE (Shimadzu) com duas bombas LC-10ADVP, injetor automático SIL-10ADVP, detector de absorvância UV SPD-10AVVP, controlador de sistema SCL-10AVP conectado a um computador e software CLASS-VP, versão 5.03. O sistema CLAE estava acoplado a um espectrômetro de massas triplo-quadrupolo (Quattro II, Altricham, UK). Utilizou-se no sistema CLAE uma coluna TSK-Gel amide-80 (3 µm; 4,6 mm × 15 cm) (Tosoh Bioscience; Tóquio, Japão) e a fase móvel

acetato de amônio, 10 mM, pH = 6,8 (solvente A) e acetonitrila (solvente B). A separação cromatográfica foi feita com fluxo de 0,2 mL/min usando 60% do solvente B por 15 min. A análise foi realizada utilizando a fonte de ionização electrospray no modo negativo e a detecção através dos modos Full Scan (50-400 m/z) e Íons-produto dos íons com m/z 199 e 183. As temperaturas de dessolvatação e da fonte de ionização foram 100 e 200°C, respectivamente. A voltagens aplicadas foram 4,5 kV para o capilar, 15 V para o cone de amostragem e 5V para o cone extrator, utilizando uma energia de colisão de 10 eV e 15 eV para o íon de m/z 199 e 183 respectivamente.

3.4 Análise espectroscópica do hidroperóxido de urato

Para determinar o coeficiente de absortividade molar do hidroperóxido de urato realizou-se a síntese do composto através da reação entre urato (400 µM) e riboflavina (40 µM) em tampão fosfato (10 mM; pH = 6,8) sob irradiação UVA (365 nm) por 10 minutos conforme descrito no item 3.1. Logo após, a reação foi coletada e injetada (100 µL) em um sistema de CLAE (Shimatzu) com duas bombas LC-20AT e LC-10AD, injetor automático SIL-20A, detector de absorbância UV SPD-20A, controlador de sistema CBM-20A conectado a um computador e software LCsolution. Os compostos foram eluídos utilizando uma coluna TSK-Gel amide-80 (3 µm; 4,6 mm × 15 cm) e fase móvel acetato de amônio, 10 mM, pH = 6,8 (solvente A) e acetonitrila (solvente B) em um gradiente de 60% do solvente B com fluxo 0,2 mL/min durante 15 min. O hidroperóxido de urato foi coletado e o excesso de acetonitrila evaporado com argônio (Ar). Essa solução de hidroperóxido de urato foi diluída em tampão acetato de amônio (10 mM, pH = 6,8), obtendo-se as concentrações finais de 10, 20, 40, 50, 70 e 100 % (v/v). Em seguida,

realizou-se a leitura da absorbância (308 nm) em um espectrofotômetro (UV-2550; Shimadzu) e a concentração de hidroperóxido nessas soluções foi quantificada através do método modificado de FOX (item 3.2). As absorbâncias obtidas foram correlacionadas com as concentrações e através da Lei de Lambert-Beer ($Abs = \epsilon \cdot c \cdot l$; onde Abs: absorbância; ϵ : coeficiente de absortividade molar; c: concentração; l: caminho óptico) determinou-se o coeficiente de absortividade molar.

3.5 Determinação da constante de velocidade de decomposição (k) do hidroperóxido de urato e consumo na presença de PDI

O hidroperóxido de urato foi sintetizado através da reação entre urato (2,5 mM) e riboflavina (200 μ M) em tampão fosfato (20 mM; pH = 6,0) sob irradiação UVA (365 nm) por 10 minutos. Logo após, a reação foi coletada e injetada (100 μ L) em um sistema de CLAE conforme descrito no item 3.3. Os compostos foram eluídos utilizando uma coluna TSK-Gel amide-80 (10 μ m; 7,8 mm $\times$ 30 cm) e fase móvel acetato de amônio, 10 mM, pH = 6,8 (solvente A) e acetonitrila (solvente B) em um gradiente de 60% do solvente B com fluxo 0,8 mL/min durante 15 min. O hidroperóxido de urato foi coletado e o excesso de acetonitrila evaporado com argônio (Ar). Para determinar a constante de velocidade de decomposição do hidroperóxido de urato adicionou-se catalase (20 U/mL) à amostra. Já para avaliar o consumo desse composto devido a reação com a PDI, o hidroperóxido de urato ($\sim$ 3 μ M) foi incubado com essa proteína (10 μ M). Após a adição das enzimas, as amostras foram mantidas a 22°C e alíquotas foram retiradas, em tempos determinados, para quantificação da concentração de hidroperóxido através do ensaio modificado de FOX (item 3.2).

3.6 Análise da reatividade do hidroperóxido de urato com aminoácidos livres

Para avaliar a reatividade do hidroperóxido de urato com aminoácidos susceptíveis à oxidação, o hidroperóxido de urato (200 – 450 μM) foi incubado com histidina, triptofano, metionina, lisina (1 mM) ou taurina (5 mM), na presença de catalase (50 U/mL), durante 60 minutos. As amostras foram mantidas a 22 °C e alíquotas foram retiradas, em tempos determinados, para quantificação da concentração de hidroperóxido através do ensaio modificado de FOX (item 3.2). Ainda, o espectro de absorção (220-400 nm) do hidroperóxido de urato (260 μM) antes e após a reação (1 seg) com metionina (300 μM) foi monitorado utilizando um leitor de microplaca (Synergy[®]).

3.7 Quantificação da glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) após reação da glutathiona com o hidroperóxido de urato

A GSH e GSSG foram simultaneamente quantificadas utilizando-se um sistema de CLAE com detecção eletroquímica (ESA). O sistema consistiu de bombas modelo 584, detector CoulArray 5600A e UV-visível SPD-10AV-vp (Shimadzu). As amostras foram separadas em uma coluna Kinetex C18 Phenomenex (2,6 μm ; 4,6 mm $\times$ 10 cm) mantida a 25 °C. A fase móvel A era composta de tampão fosfato de sódio 25 mM, 25 μM de ácido octassulfônico e 1% de acetonitrila, o pH foi ajustado para 2,5 utilizando-se ácido fosfórico (H_3PO_4). A fase móvel B consistiu de uma solução de acetonitrila 1%. As amostras foram separadas com um fluxo de 0,7 ml/min utilizando-se 100% de fase móvel A (0 - 8 min), seguido de gradiente de 100-0 % de A (8 - 9 min), mantido 0 % de A por um minuto (9 – 10 min), retornando a 100 % em um minuto (10 – 11 min). A coluna foi equilibrada pelos dois minutos seguintes (11 – 13 min). A GSH eluiu em

2,5 min e a GSSG em 5 min. O monitoramento da GSH foi realizado com os potenciais de 400 e 600 mV e a GSSG com potencial de 950 mV. A quantificação foi feita através da aquisição da área dos picos em relação à curva padrão.

A curva padrão da GSH foi realizada a partir de uma solução de GSH 500 μ M (Sigma-Aldrich). Esta solução foi diluída para as concentrações de: 3,75; 7,5; 15; 30 e 50 μ M; um volume de 10 μ l das referidas soluções foram injetados na coluna, totalizando a concentração de 37,5; 75; 150; 300 e 500 pmol/coluna. A curva padrão da GSSG foi realizada a partir de uma solução de GSSG 300 μ M (Sigma-Aldrich). Esta solução foi diluída para as concentrações de: 3,75; 7,5; 15 e 30 μ M; um volume de 10 μ l das referidas soluções foram injetados na coluna, totalizando a concentração de 37,5; 75; 150 e 300 pmol/coluna.

Preparação da amostra: o hidroperóxido de urato foi obtido conforme descrito no item 3.3. Após sua separação e quantificação através do seu coeficiente de absorção ϵ_{308} nm, a concentração de 100 μ M de hidroperóxido de urato, ou o mesmo volume de seu veículo (fase móvel acetato de amônio), foi incubada com um total de 500 μ M de GSH em temperatura ambiente. Ao final de 10 minutos as amostras foram colocadas no gelo e diluídas 10 vezes antes da injeção no sistema CLAE.

3.8 Dosagem de proteínas

A concentração de proteína foi determinada através do método colorimétrico de Bradford a 595 nm (Bradford, 1976). Realizou-se curva de calibração utilizando albumina sérica bovina (BSA) nas concentrações de 0 a 5 μ g/mL.

3.9 Expressão e purificação da PDI

A PDI recombinante foi expressa em bactérias *E. coli* BL21 transformadas com plasmídio pET28a contendo cDNA para PDI-6x His tag humana conforme descrito por Paes e colaboradores (2011) e purificada utilizando resina de cobalto e um gradiente de imidazol (10, 50, 100 e 150 mM). A quantificação de proteína foi realizada através do ensaio de Bradford (item 3.8) e a pureza da proteína avaliada por SDS-PAGE 10%.

3.10 Redução da PDI

A PDI purificada foi reduzida com ditioneitol (DTT; 50 mM, 1h, 37°C). Em seguida, o agente redutor foi removido através de gel filtração (coluna HiTrap 5 mL; Amersham Biosciences), utilizando como fase móvel tampão fosfato (5 mM, pH=7,4) ou bicarbonato de amônio (50 mM, pH=7,4) com fluxo de 2 mL/min em um sistema de cromatografia líquida para separação rápida de proteínas (FPLC; Akta Purifier, GE). Após a coleta, a proteína foi concentrada por centrifugação (4°C, 2500g) utilizando Centriplus® (50 kDa) e os tióis livres quantificados conforme descrito no item 3.11.

3.11 Quantificação de cisteínas livres pelo ensaio de DTNB

Após incubar a PDI (23 µM) com hidróperóxido de urato (140 µM) ou veículo (fase móvel acetato de amônio) por 30 minutos a 22°C, ou após a redução da proteína (item 3.10) os tióis livres da PDI (7 µM) foram quantificados pela reação com 5,5-ditiobis(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB; 800 µM, tampão fosfato 50 mM, pH=7,4) em tampão glicina (100 mM,

pH 8,5) contendo dodecil sulfato de sódio (SDS; 0,3%) por 10 min a temperatura ambiente e a medida da absorbância foi feita a 412 nm ($\epsilon = 1,36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) em espectrofotômetro (UV-2550; Shimadzu) (Quijano et al., 1997).

3.12 Determinação da velocidade de reação do hidroperóxido de urato com a PDI

A constante de velocidade de oxidação da PDI pelo hidroperóxido de urato foi determinada utilizando um espectrofotômetro de fluxo interrompido (modelo SX-18MV). A PDI reduzida ($4 \mu\text{M}$; $\sim 5 \mu\text{molSH} \cdot \mu\text{mol proteína}^{-1}$) foi misturada com diferentes concentrações de hidroperóxido de urato (20, 40, 60, 80, 100, 120 μM) em 10 mM de acetato de amônio, pH= 6,8. A reação de oxidação foi monitorada pela diminuição da intensidade da fluorescência intrínseca da proteína (Ex=280 nm, filtro de emissão= 340 nm; 25 °C). A determinação dos comprimentos de onda de excitação e emissão foi executada experimentalmente utilizando um espectrômetro de fluorescência Hitachi F7000 a fim de evitar uma possível interferência da fluorescência intrínseca do hidroperóxido de urato. As constantes de velocidade observadas (k_{obs}) foram determinadas pelo ajuste das curvas experimentais de decaimento de fluorescência à equação exponencial:

$$y = y_0 + A_1 \cdot e^{-x/t_1} + A_2 \cdot e^{-x/t_2}$$

Já constante de velocidade de segunda ordem foi calculada a partir do coeficiente angular do gráfico de k_{obs} versus as concentrações de hidroperóxido de urato.

3.13 Análise da oxidação de resíduos cisteína através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada à espectrometria de massas

A PDI (24 μ M) foi incubada com o hidroperóxido de urato (121 μ M) ou veículo a 22 °C durante 30 min. O excesso de água foi removido em Speed vacuum (Heto) durante 1h. Em seguida, as amostras foram ressuspensas em tampão Tris-HCl (50 mM, pH=8,5) e a desnaturação realizada com guanidina (1,7 M; 30 min, 50°C, 600 rpm). As cisteínas livres foram alquiladas com iodoacetamida (14 mM; 2 h, 600 rpm, protegido da luz). Após diluir as amostras em Tris-HCl, utilizou-se para digestão proteica tripsina (Trypsin Gold, Promega; 100 μ g, 37°C; 17 h, 250 rpm) na presença de cloreto de cálcio (100 mM). Os peptídeos gerados foram analisados através de LC-MS/MS, utilizando um sistema de CLAE (1D-nano LC; Shimadzu) com coluna de concentração e dessalinização (Monolithic Trap, 0,075x150 mm, GLScience) acoplado a um espectrômetro de massas Electrospray q-TOF Ultra-High Resolution (UHR q-TOF; Bruker Daltonics MaXis 3G, Billerica, Estados Unidos). Utilizou-se no sistema CLAE uma coluna ZORBAX 300SB-C18 (3,5 μ m; 150 mm $\times$ 75 μ m, Agilent Technologies) e a fase móvel água (solvente A) e acetonitrila (solvente B). A separação cromatográfica foi feita com fluxo de 0,2 mL/min usando um gradiente de 5% do solvente B por 5 min, com aumento linear para 40% de B até 40 min, seguido de um acréscimo linear para 95% de B em 1 min, mantendo-se 95% de B por mais 4 min, com posterior decréscimo para 5% de B em 1 min, mantendo-se 5% de B por mais 14 min. A análise foi realizada utilizando fonte de ionização Captive spray nano ESI (Bremen, Alemanha) no modo positivo (50 -1500 m/z), 0,3 μ L/min, voltagem do capilar 1700 V, *dry heater* 150 °C, gás secante 6.0 l/min e nitrogênio para a dissociação induzida por colisão (*collision-induced dissociation-CID*). O espectrômetro foi calibrado internamente com *lock mass* (m/z

1221,9906) e externamente usando ESI low concentration tuning mix com variação de m/z de 100 a 2000. Os dados foram processados utilizando o software DataAnalysis v. 4.0.

3.14 Cultura de células

Células leucêmicas promielocíticas humanas (HL-60) (BCRJ, RJ, Brasil) foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640, contendo soro fetal bovino (20%), estreptomicina (100 $\mu\text{g/mL}$) e penicilina (100 U/mL), a 37°C em atmosfera umidificada e com CO₂ (5%). As células HL-60 (5 x 10⁵/mL) foram diferenciadas em neutrófilos (dHL-60) pela adição de dimetilsulfóxido (DMSO; 1,3%) no meio RPMI-160 suplementado com soro fetal bovino (10%), estreptomicina (100 $\mu\text{g/mL}$) e penicilina (100 U/mL). As células foram mantidas nesse meio de cultura durante cinco dias a 37°C em atmosfera umidificada e com CO₂ (5%), para maturação completa a neutrófilos. Para realizar os experimentos as células foram centrifugadas (10 min, 1400 rpm) e o sobrenadante descartado. O sedimento celular obtido foi ressuspensão em salina estéril (NaCl 0,9%) e novamente centrifugado, nas mesmas condições supracitadas, por duas vezes. Ao final, as células foram ressuspensas em PBS/glicose (10 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄; 137 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂, 1 g/L glicose) ou em PBS/glicose contendo 100 μM de DTPA (ácido dietilenotriamina penta acético).

3.15 Detecção de superóxido com dihidroetidina (DHE)

A sonda dihidroetidina (DHE) pode ser oxidada pelo ânion radical superóxido ao produto 2-hidroxi-etídio (2-OH-E⁺), permitindo avaliar a concentração desse radical. Outras substâncias

também podem oxidar o DHE, ocorrendo à formação de etídio (E^+). Células HL-60 diferenciadas (dHL-60) ($6,6 \times 10^6/\text{mL}$) em PBS/glicose/DTPA e DHE $50 \mu\text{M}$, foram incubadas com urato ($0-500 \mu\text{M}$) por 5 min a 37°C , em um volume final de $300 \mu\text{L}$. Logo após, as células foram ativadas com acetato de forbol miristato (PMA) (100 ng/mL) e mantidas a 37°C por 30 min. Após centrifugação (10 min; $400g$; 4°C), o sobrenadante foi recolhido e armazenado a -80°C . Os produtos de oxidação do DHE foram analisados pela injeção de $60 \mu\text{L}$ do sobrenadante em um sistema de CLAE (Shimadzu, Tóquio, Japão) com duas bombas LC-20AT, detector de fluorescência RF-10AxL, detector de absorbância UV SPD-20A, controlador de sistema CBM 20A, conectado a um computador e software LC-X. Utilizou-se uma coluna Phenomenex Synergi, Polar-RP 80A ($4 \mu\text{m}$, $150 \times 60 \text{ mm}$) e fase móvel 10 % de acetonitrila e 0,1 % de ácido trifluoro acético (TFA) em água milli-Q (solvente A) e 40 % de água milli-Q e 0,1 % de TFA em acetonitrila (solvente B) com fluxo de $0,6 \text{ mL/min}$. Os analitos foram eluídos usando um gradiente de 40 % de B por 5min, com aumento linear para 100 % de B até 25 min, mantendo-se 100 % de B por mais 10 min, seguido de um decréscimo linear para 40 % de B em 5 min, mantendo-se 40% de B por mais 6 min. A sonda DHE foi analisada por absorbância em 245 nm e os produtos de oxidação por fluorescência ($E_x = 480 \text{ nm}$ e $E_m = 580 \text{ nm}$). Para quantificação utilizou-se curva-padrão de DHE, 2-OH- E^+ e E^+ , a concentração dos padrões foi quantificada através da absorvidade molar de cada composto (etídio $\epsilon_{480} = 5,74 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, DHE $\epsilon_{265} = 1,80 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e $\epsilon_{345} = 9,75 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). O padrão de 2-OH- E^+ foi preparado conforme descrito na literatura (Zhao et al., 2003). De modo breve, DHE ($50 \mu\text{M}$) foi oxidado pelo sistema xantina/xantina oxidase ($1 \text{ mM}/100 \mu\text{g/mL}$) em PBS ($7,78 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, $2,20 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$, pH 7,4) contendo DTPA ($100 \mu\text{M}$) a 37°C durante 30 minutos no escuro. Aliquotas dessa reação foram injetadas em um sistema CLAE nas condições descritas

anteriormente. O 2-OH-E⁺ foi coletado e liofilizado. O resíduo róseo obtido foi ressuspenso em DMSO e a concentração determinada em um espectrofotômetro (UV-2550; Shimadzu) (2-OH-E⁺ $\epsilon_{475} = 9,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (Zielonka et al., 2005). Todos os procedimentos descritos acima foram realizados sob mínima exposição à luz.

3.16 Consumo de oxigênio

O consumo de O₂ por células dHL-60 foi avaliado por polarografia, utilizando-se eletrodo de Clark (Oroboros Oxygraph-2k; Innsbruck, Austria). Suspensões de dHL-60 ($1 \times 10^6/\text{mL}$) em PBS/glicose foram acondicionadas em câmaras fechadas a 37°C sob agitação contínua (300 rpm). Após 5 minutos, foram adicionados à câmara, 50 μL de diferentes soluções-estoque de urato para obtenção das concentrações finais (urato 50-500 μM). Para cada concentração de urato realizou-se um respectivo grupo controle, através da adição de 50 μL de soluções-estoque de NaOH (5-50 μM). As células foram incubadas por 5 minutos e então ativadas com PMA (100 ng/mL), monitorando-se a concentração de O₂ por mais 30 minutos em um volume final de 2 mL.

3.17 Análise estatística

Os dados foram expressos como a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) de dois a quatro experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por teste *t* Student, análise de variância (ANOVA) de uma via ou duas vias com testes *post-hoc* de Bonferroni ou Dunnet, conforme apropriado, utilizando-se o Software GraphPad Prim versão 5.0 ou OriginPro 8.5. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Síntese e caracterização química do hidroperóxido de urato

4.1.1 Produção do hidroperóxido de urato a partir de reações de fotooxidação do Tipo I

Com o intuito de obter o hidroperóxido de urato isolado realizou-se a síntese química através da reação de fotooxidação do tipo I utilizando a riboflavina como fotossensibilizador (Clausen et al., 2010; Cardoso et al., 2012). Após 10 minutos de irradiação UVA (365 nm) da riboflavina (40 μ M) na presença de urato (100-600 μ M) em tampão fosfato (10 mM; pH = 6,8) houve formação do hidroperóxido de urato com um rendimento de aproximadamente 50 % a partir da concentração inicial de urato incubada. Porém, com a manutenção da irradiação por períodos mais prolongados ocorreu uma diminuição na concentração de hidroperóxido (Figura 4.1 A). A riboflavina pode ser excitada com os comprimentos de onda de 221-227, 265-270, 365-370 nm do espectro ultravioleta e na região do visível em 445 nm (Kurtin, Song, 1968). Com a finalidade de garantir o melhor rendimento na produção do hidroperóxido, o processo de fotossensibilização foi executado em luz UVA e em luz visível. A partir desses resultados observou-se que a irradiação visível acelerava a decomposição do hidroperóxido formado, resultando em menor rendimento final deste produto, conforme ilustrado abaixo (Figura 4.1 B). A fim de avaliar se o hidroperóxido formado era dependente da reação entre os intermediários radicalares: radical de urato e superóxido, alguns controles foram planejados. Assim, a adição da enzima superóxido dismutase à reação diminuiu significativamente a concentração de hidroperóxido formado após 10 minutos de irradiação com luz UVA. Na ausência de qualquer um

dos componentes, urato ou riboflavina, ou na ausência de irradiação não houve formação do hidroperóxido de urato (Figura 4.1 C).

Figura 4.1 Formação do hidroperóxido de urato a partir de reação de fotossensibilização do Tipo I. (A) Perfil temporal da concentração de hidroperóxido sintetizado após irradiação UVA (365 nm) na presença de urato (0-600 μM). (B) Concentração de hidroperóxido sintetizado após 10 min de irradiação com luz Visível (Vis) (500 nm) ou UVA (365 nm). (C) Concentração de hidroperóxido sintetizado após 10 min de irradiação UVA (365 nm) sob diferentes condições. A análise da concentração do hidroperóxido formado foi realizada pelo método de FOX modificado depois de adicionar catalase (10 U/mL) às amostras e comparada a curva padrão do peróxido de hidrogênio. Os gráficos representam a média $\pm$ E. P. M. de dois ou três experimentos independentes. (A) ANOVA de duas vias com *post-hoc* de Bonferroni; (B) Teste *t* de Student; (C) ANOVA de uma via com *post-hoc* de Dunnet (* $p < 0,001$). SOD: superóxido dismutase.

4.1.2 Caracterização do hidroperóxido de urato e do álcool 5-hidroxiisourato por CLAE acoplada à Espectrometria de Massas em tandem (CLAE-MS/MS)

A reação de fotooxidação descrita acima foi injetada, em um volume de 30µL, em um CLAE acoplado a um espectrômetro de massas triplo-quadrupolo. O cromatograma com detecção no UV-Vis (302 nm) (Figura 4.2 A) apresentou quatro picos, nos tempos de retenção 9,30; 10,43; 11,07 e 12,86 minutos que correspondiam aos íons de m/z $[M-H]^-$ 199, 183, 167, 375, respectivos ao hidroperóxido de urato, 5-hidroxiisourato, urato e riboflavina (Figura 4.2 B). Além das massas, dados de espectroscopia UV confirmaram serem esses os produtos separados na coluna (Kahn, Tipton, 1998). Com o objetivo de melhor caracterizar o hidroperóxido formado, este íon foi submetido à fragmentação, gerando os íons-produto de m/z $[M-H]^-$ 156, 139, 111 ou 113 e 87. As fragmentações correspondentes a cada um destes produtos estão ilustradas na Figura 4.2 C. Para caracterizar o álcool 5-hidroxiisourato esse íon foi submetido à fragmentação, obtendo-se os íons-produto de m/z $[M-H]^-$ (140, 113, 96 e 69. As fragmentações correspondentes a estes produtos estão ilustradas na Figura 4.2 D.

Figura 4.2 Caracterização por CLAE-MS/MS do hidroperóxido sintetizado por fotooxidação. (A) Cromatograma UV-Vis (302 nm) da reação entre urato (400 μ M) e riboflavina (40 μ M) em tampão fosfato (pH = 6,8), após irradiação UVA (365 nm) por 10 min. Os tempos de retenção (min) 9,30; 10,43; 11,07 e 12,86 correspondem ao hidroperóxido de urato, 5-hidroxiisourato, urato e riboflavina, respectivamente.

(B) Espectro de massas de 70-250 m/z $[M-H]^-$ obtido em 9,3 min.

(C) Espectro de massas dos íons-produto obtidos pela fragmentação do íon de m/z $[M-H]^-$ 199 com TR de 9,3 min.

(D) Espectro de massas dos íons-produto obtidos pela fragmentação do íon de m/z $[M-H]^-$ 183 com TR de 10,43 min correspondente ao álcool 5-hidroxiisourato. TR: tempo de retenção.

4.1.3 Caracterização do espectro de absorção e determinação do coeficiente de absortividade molar

Através da análise do espectro de absorção (250-350 nm) do hidroperóxido de urato pode-se observar que esse composto apresenta um máximo de absorção em 308 nm (Figura 4.3 A). Portanto, para poder quantificar a concentração do hidroperóxido de urato através de espectrofotometria, determinou-se o seu coeficiente de absortividade molar (ϵ) nesse comprimento de onda. A síntese do hidroperóxido de urato foi realizada através da irradiação UVA como mencionado no item anterior. Em seguida, o hidroperóxido de urato foi separado dos demais reagentes por CLAE e o pico foi coletado. Diferentes diluições do hidroperóxido de urato 40, 20 e 10% (v/v) em tampão acetato de amônio (10 mM, pH = 6,8) foram analisadas por espectrofotometria (250-350 nm) (Figura 4.3 A). A concentração de hidroperóxido em cada diluição foi determinada pelo método modificado de FOX e correlacionada com as absorbâncias obtidas em 308 nm ($\lambda_{\text{máx}}$) (Figura 4.3 B). Com esses dados, determinou-se para o hidroperóxido de urato um coeficiente de absortividade molar em 308 nm de $6537 \pm 377 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Figura 4.3 Determinação do coeficiente de absortividade molar (ϵ) do hidroperóxido de urato. (A) Absorção (250-350 nm) do hidroperóxido de urato 40, 20 e 10% (v/v) em tampão acetato de amônio (10 mM, pH=6,8). (B) Correlação linear entre a absorbância (308 nm) e a concentração de hidroperóxido de urato 100, 70, 50 e 10 % (v/v) em tampão acetato de amônio (10 mM, pH = 6,8). O coeficiente de absortividade molar (308 nm) do hidroperóxido de urato foi de $6537 \pm 377 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Os dados correspondem a um ensaio representativo de 3 experimentos independentes.

4.1.4 Determinação do tempo de meia-vida do hidroperóxido de urato

Considerando que o hidroperóxido de urato apresenta uma cinética de decaimento de primeira ordem determinou-se a constante de velocidade $k = 2,80 \pm 0,18 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ e, por conseguinte tempo de meia vida de 41 min a 22°C através do ajuste da curva da concentração de hidroperóxido em função do tempo (Figura 4.4) utilizando a equação $y = y_0 + A^{k \cdot x}$.

Figura 4.4. Análise da velocidade de degradação do hidroperóxido de urato. Concentração de hidroperóxido de urato em função do tempo a 22°C. A linha vermelha representa o ajuste dos dados experimentais à equação exponencial. A análise da concentração do hidroperóxido formado foi realizada pelo método de FOX modificado depois de adicionar catalase (10 U/mL) às amostras. Os dados correspondem a um ensaio representativo de dois experimentos independentes.

4.2 Reatividade química do hidroperóxido de urato

4.2.1 Hidroperóxido de urato oxida seletivamente aminoácidos livres

O hidroperóxido de urato trata-se de um agente oxidante, apresentando um potencial de redução de 1 V (Dadamos et. al, dados não publicados). Desse modo, poderia reagir com diferentes biomoléculas susceptíveis à oxidação, tais como proteínas. Dentre os aminoácidos, alguns dos principais susceptíveis à oxidação são cisteína, metionina, histidina, lisina e triptofano (Stadtman, Levine, 2003). Ainda, a taurina, embora não esteja presente na estrutura de proteínas, é um aminoácido livre que pode sofrer oxidação e está abundantemente presente no citosol de células inflamatórias, especialmente em neutrófilos (Learn et al., 1990). Interessantemente, após dez minutos de incubação do hidroperóxido de urato (200 – 450 μ M), com os aminoácidos: taurina (5 mM), lisina ou triptofano (1 mM) não ocorreram alterações significativas na concentração desse composto quando comparada a do controle. No entanto, ele foi totalmente consumido ao ser exposto à metionina (1 mM) e aproximadamente 25% na presença de histidina (1mM) (Figura 4.5 A). A cinética para o consumo de hidroperóxido pelos aminoácidos foi monitorada ao longo de 60 min, porém não foram observadas alterações significativas na concentração de hidroperóxido na ausência ou presença dos aminoácidos taurina, lisina, triptofano e histidina (dados não demonstrados). Devido à meia-vida curta do hidroperóxido de urato em solução aquosa, os dados representados na figura 4.5 A correspondem ao tempo final de 10 minutos.

Corroborando com a hipótese de que o consumo de hidroperóxido de urato na presença de metionina ocorreu devido à oxidação de dois elétrons desse aminoácido, o espectro de absorção (220 – 400 nm) do hidroperóxido de urato (260 μ M) apresentou um deslocamento do pico

máximo de absorção de 308 nm para 304 nm após a reação (1 seg) com a metionina (300 μ M), indicando a formação do álcool 5-hidroxiisourato, produto da redução do hidropéroxido de urato (Figura 4.5 B).

Figura 4.5 Análise da reatividade do hidropéroxido de urato com aminoácidos livres. (A) Porcentagem da concentração de hidropéroxido de urato após 10 min de incubação (22 °C) com os aminoácidos histidina, lisina, triptofano e metionina, (1 mM) ou taurina (5 mM), na presença de catalase 50U/mL, em relação ao controle. A concentração de hidropéroxido foi determinada através do ensaio modificado de FOX. (B) Espectro de absorção (220-400 nm) do hidropéroxido de urato (260 μ M) antes e após a reação (1 seg) com metionina (300 μ M). (A) Os dados representam a média $\pm$ E. P. M. de dois ou três experimentos independentes. ND: não detectável. (B) Os dados correspondem a um ensaio representativo de dois experimentos independentes. HOOU: hidropéroxido de urato; U.A.: unidades arbitrárias.

4.2.2 Mecanismo de reatividade do hidropéroxido de urato com grupo tiol do peptídeo glutathiona

Sabendo que o hidropéroxido de urato ($\sim 5\mu$ M) foi totalmente consumido na presença de glutathiona reduzida (100 μ M) após 10 min (Meotti et al., 2011), a concentração de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) foi quantificada após incubar-se 500 μ M de GSH com 100 μ M de hidropéroxido de urato. Após dez minutos de incubação houve um consumo de 120 μ M de

GSH com formação de 57 μM GSSG, representando uma estequiometria 2:1, indicando que toda GSH consumida foi convertida em GSSG, ou seja, não houve formação de complexos estáveis (adutos) hidroperóxido-glutationa (Figura 4.6).

Figura 4.6 Quantificação da GSH e GSSG após reação da GSH com hidroperóxido de urato. GSH (500 μM) foi incubado com hidroperóxido de urato (100 μM), após 10 minutos de reação em temperatura ambiente. As amostras foram separadas por CLAE e GSH e GSSG foram quantificadas por detecção eletroquímica, utilizando-se um a curva padrão. Os dados são a média $\pm$ E. P. M. de cinco amostras independentes.

4.3 Interação do hidropéroxido de urato com a PDI

4.3.1 Hidropéroxido de urato oxida cisteínas da PDI

Em continuidade, investigou-se a interação do hidropéroxido de urato com a enzima PDI isolada. Interessantemente, a concentração total de hidropéroxido de urato ($3\ \mu\text{M}$) foi diminuída em 70 e 100% após 30 e 120 segundos da incubação com a PDI ($10\ \mu\text{M}$), respectivamente (Figura 4.7 A). A PDI apresenta seis resíduos de cisteína em sua estrutura, dos quais quatro estão presentes nos dois sítios catalíticos, compostos pelo motivo CGHC (Laurindo et al., 2012). Através da quantificação de tióis livres pelo ensaio espectrofotométrico com DTNB observou-se que a PDI ($23\ \mu\text{M}$), após a incubação com hidropéroxido de urato ($140\ \mu\text{M}$) por 30 minuto a 22°C , apresentou apenas $2,02 \pm 0,16\ \mu\text{mol SH}/\mu\text{mol proteína}$. Por outro lado, a PDI incubada com veículo apresentou $4,82 \pm 0,88\ \mu\text{mol SH}/\mu\text{mol proteína}$ (Figura 4.7 B). Em conjunto, esses dados sugerem uma ação oxidante do hidropéroxido de urato sobre a enzima PDI, possivelmente através da reação com os resíduos de cisteína presentes nos sítios catalíticos.

Figura 4.7 Hidropéroxido de urato oxida cisteínas presentes na PDI. (A) Concentração de hidropéroxido inicial ($\sim 3\ \mu\text{M}$) e após 30 e 120 segundos da adição de PDI ($10\ \mu\text{M}$). A análise da concentração do hidropéroxido foi realizada pelo método de FOX modificado. (B) Quantificação de tióis livres da PDI ($7\ \mu\text{M}$) incubada com

hidroperóxido de urato ou veículo por 30 min a 22°C . Os tióis foram quantificados após reação com o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzólico (DTNB) através de análise fotométrica em 412 nm. Os gráficos representam a média $\pm$ E. P. M. de dois ou três experimentos independentes. Teste *t* de Student (**p*<0,05) diferente do controle; ND: não detectado; HOOU: hidroperóxido de urato.

4.3.2 Hidroperóxido de urato oxida as cisteínas catalíticas da PDI

Visto que o hidroperóxido de urato é capaz de reagir com a PDI, os possíveis resíduos de aminoácidos modificados foram investigados por espectrometria de massas (MS/MS). A PDI (24 μ M) foi incubada com hidroperóxido de urato (121 μ M) ou veículo durante 30 min a 22°C. Em seguida os grupos SH livres foram alquilados com iodoacetamida e a digestão proteica realizada com tripsina. Visto que a alquilação de uma cisteína com iodoacetamida resulta em adição covalente de um grupo carbamidometil (57,07 Da), identificou-se na análise dos peptídeos da PDI incubada com veículo, os peptídeos de massa $[M+3H]^{3+}$ (*m/z*) 648,6382 e 681,6531, correspondentes aos sítios ativos **a** e **a'** com carbamidometilação, respectivamente. Através da análise dos fragmentos do peptídeo de *m/z* 648,6382, confirmou-se que esse apresentou dois grupos carbamidometil, um por resíduo de cisteína, visto que as séries y13-y7 e y5 apresentaram um acréscimo de 114,14 Da em relação aos valores de *m/z* teóricos dessas mesmas séries não alquiladas (Figura 4.8 A). O peptídeo de *m/z* 681,6531 também apresentou dois grupamentos carbamidometil, segundo a análise das séries y9-y5 e y2 (Figura 4.8 B). Por outro lado, esses peptídeos não foram identificados na análise dos fragmentos da PDI incubada com hidroperóxido de urato, sugerindo que os resíduos de cisteínas dos sítios catalíticos foram previamente oxidados pelo hidroperóxido de urato, prevenindo assim a alquilação pela iodoacetamida.

Figura 4.8 Modificações oxidativas nos resíduos de cisteína dos sítios catalíticos da PDI. A PDI (24 μ M) foi incubada com hidróperóxido de urato (121 μ M; 30 min, 22°C) ou veículo. Em seguida os grupos SH livres foram alquilados com iodoacetamida e a digestão proteica realizada com tripsina. Os espectros de massas apresentados correspondem aos fragmentos dos peptídeos da PDI exposta ao veículo, esses fragmentos não foram identificados na PDI incubada com hidróperóxido de urato. **(A)** Espectro de massas dos íons-produto obtidos pela fragmentação do íon 648,6382 m/z , correspondente ao sítio catalítico **a** com ambas as cisteínas carbamidometiladas. **(B)** Espectro de massas dos íons-produto obtidos pela fragmentação do íon de 681,6531 m/z correspondente ao sítio catalítico **a'** com ambas as cisteínas carbamidometiladas. Os asteriscos nas sequências indicam os resíduos de cisteínas modificados com iodoacetamida.

4.3.3 Cinética de reação do hidroperóxido de urato com a PDI

A velocidade da reação de oxidação da PDI pelo hidroperóxido de urato foi monitorada através da análise da variação da fluorescência intrínseca da proteína. O triptofano (W35) justaposto ao sítio ativo do domínio **a** da PDI atua como um marcador espectroscópico do estado redox desse sítio ativo, visto que sua fluorescência diminui após a oxidação (Karala et al., 2009). Quando a PDI reduzida ($4\ \mu\text{M}$; $\sim 5\ \mu\text{molSH}.\mu\text{mol proteína}^{-1}$) foi exposta a diferentes concentrações de hidroperóxido de urato observou-se uma diminuição da intensidade de fluorescência (Figura 4.9 A). As variações de fluorescência puderam ser ajustadas por uma equação que define um processo com duas etapas. Sendo assim, pode-se sugerir que a primeira etapa compreenderia a oxidação do sítio **a** da PDI pelo hidroperóxido de urato formando ácido sulfênico. Essa é uma reação do tipo $\text{S}_{\text{N}}2$. Já a segunda etapa do processo poderia corresponder ao ataque nucleofílico da cisteína adjacente ao ácido sulfênico para formação da ponte dissulfeto intramolecular no sítio ativo. Visto que o hidroperóxido de urato estava em excesso com relação a PDI, os dados puderam ser considerados como uma cinética de pseudo-primeira ordem, obtendo-se através dos ajustes as constantes de velocidade observadas (k_{obs}). Em acordo com o mecanismo proposto, as constantes de velocidade observadas (k_{obs}) da primeira etapa da reação apresentaram uma dependência linear com relação às concentrações de hidroperóxido de urato (Figura 4.9 B), apresentando uma constante de velocidade de segunda-ordem de $1,5 \pm 0,04 \times 10^3\ \text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$. A velocidade da segunda etapa foi independente da concentração de hidroperóxido de urato (Figura 4.9 B).

Figura 4.9 Cinética de oxidação da PDI pelo hidroperóxido de urato. A PDI reduzida (4 μM; ~5 μmolSH.μmol proteína⁻¹) foi exposta a diferentes concentrações de hidroperóxido de urato (pH= 6,8; 25 °C). A reação de oxidação foi monitorada ao longo do tempo (60 s) pela variação da intensidade da fluorescência intrínseca da proteína (Ex=280 nm, filtro de emissão= 340 nm). **(A)** Traços representativos da intensidade de fluorescência da PDI (4 μM) obtidos na ausência (0) ou presença de hidroperóxido de urato (40 e 100 μM). Inseto: resíduos do ajuste da curva à função exponencial para a reação da PDI com hidroperóxido de urato (100 μM). **(B)** Efeito do aumento das concentrações de hidroperóxido de urato sobre as constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem (k_{obs}) da primeira (○) e segunda (●) etapa da reação. A constante de velocidade de segunda-ordem ($1,5 \pm 0,04 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) para primeira etapa da reação foi obtida pelo coeficiente angular calculado através de regressão linear dos mínimos quadrados. Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de três ou quatro experimentos independentes. HOOU: hidroperóxido de urato; U.A.: unidades arbitrárias.

4.4 Ação pró-oxidante do urato

4.4.1 Efeito dual do urato sobre a concentração de superóxido produzida por neutrófilos (dHL-60) ativados

Para avaliar a concentração de superóxido produzida por neutrófilos ativados na presença de urato, as células HL-60 diferenciadas (dHL-60) ($6,6 \times 10^6/\text{mL}$) foram incubadas com urato (0-500 μM) em PBS/glicose contendo DTPA e DHE 50 μM e ativadas com PMA (100 ng/mL) (Figura 4.10). A produção de superóxido, quantificada pela produção de 2-OH-E⁺, foi similar entre todos os grupos basais, ou seja, os grupos não ativados com PMA. O urato (50-500 μM) não causou nenhuma alteração “per se” na produção de superóxido. Entretanto, na presença de PMA, o urato apresentou um efeito dual na produção de superóxido. De forma interessante, na menor concentração utilizada de urato, 50 μM , houve redução de aproximadamente 15% na formação de 2-OH-E⁺, enquanto em concentrações maiores: 100, 200 e 500 μM , ocorreu um aumento de 17, 44, 51 % na produção de 2-OH-E⁺ quando comparada ao grupo controle (urato 0 μM , PMA 100 ng/mL), respectivamente.

Figura 4.10 Produtos de oxidação do DHE na presença de urato. Células HL-60 diferenciadas em neutrófilos

($6,6 \times 10^6/\text{mL}$) foram incubadas com DHE ($50 \mu\text{M}$), urato ($0\text{-}500 \mu\text{M}$) e PMA (100 ng/mL). Após 30 min (37°C , PBS/glicose com $100 \mu\text{M}$ DTPA) os sobrenadantes foram coletados e a formação de 2-OH- E^+ e etídio avaliada por CLAE. PMA: acetato de miristato de forbol; U: urato. Os dados representam a média $\pm$ E.P.M. de quatro experimentos independentes. ANOVA de uma via com *post-hoc* de Bonferroni (* $p < 0,05$ quando comparado aos grupos não ativados com PMA).

4.4.2 Medida do consumo de oxigênio por neutrófilos (dHL-60) ativados na presença de urato

O consumo de oxigênio (O_2) por neutrófilos (dHL-60; $1 \times 10^6/\text{mL}$ em PBS/glicose) ativados com PMA (100 ng/mL) na presença de urato ($0\text{-}500 \mu\text{M}$) foi avaliado através de um eletrodo de Clark. Para cada concentração de urato avaliada realizou-se um respectivo controle (urato $0 \mu\text{M}$; PMA 100 ng/mL), devido a possíveis variações no consumo inicial de oxigênio que poderiam ocorrer entre os grupos. Os dados foram expressos individualmente para cada concentração de urato com seu respectivo controle como a concentração (μM) de oxigênio em função do tempo (Figura 4.11A). Na presença de urato, pode-se observar uma pequena diminuição da concentração total de oxigênio em 40 minutos quando comparada ao grupo controle (urato $0 \mu\text{M}$; PMA 100 ng/mL) (Figura 14B). Todavia, a variação do consumo de oxigênio entre as células tratadas apenas com PMA e tratadas com PMA mais urato foi muito pequena e não significativa estatisticamente.

B

Concentração de urato (μM)	Concentração de O_2 (μM)	
	PMA 100 ng/mL	PMA + urato
50	138 ± 22	131 ± 28
100	121 ± 23	115 ± 30
200	137 ± 12	128 ± 22
500	114 ± 23	108 ± 26

Figura 4.11 Consumo de O_2 por neutrófilos (dHL-60) ativados na presença de urato. A concentração de O_2 (μM) em suspensão de células HL-60 diferenciadas em neutrófilos ($1 \times 10^6/mL$ em PBS/glicose; $37^\circ C$) foi monitorada através de um eletrodo de Clark por um intervalo de 40 minutos. O consumo basal de O_2 foi avaliado por 5 minutos. Em seguida adicionou-se urato (50-500 μM final) ou nos grupos controles NaOH (5-50 μM final); após 5 minutos as células foram ativadas com PMA (100 ng/mL). **(A)** A concentração de O_2 em função do tempo é demonstrada para a concentração de urato (200 μM) com seu respectivo grupo controle (20 μM NaOH). As setas indicam o momento da adição de cada composto. U: urato; PMA: acetato de miristato de forbol. Os dados representam a média de três experimentos independentes. **(B)** Concentração final de O_2 após 40 minutos para cada concentração de urato utilizada (50-500 μM final) e seu respectivo grupo controle. Os dados representam a média de três experimentos independentes $\pm$ E.P.M.

5 DISCUSSÃO

Dados epidemiológicos tem demonstrado que hiperuricemia está correlacionada com a progressão de DCV na ausência de outras alterações metabólicas (Viazzi et al., 2005; Nakagawa et al., 2006; Alderman, 2007; So, Thorens, 2010). A aterosclerose é uma DCV caracterizada por um processo inflamatório crônico da parede arterial dos vasos sanguíneos (Weber, Noels, 2011). Nesse contexto, os neutrófilos apresentam um importante papel na fase inicial do desenvolvimento da doença (Zernecke et al., 2008; Rotzius et al., 2010; Weber, Noels, 2011). Os neutrófilos expressam grande quantidade das enzimas: NADPH oxidase, mieloperoxidase, e lipooxigenases, que contribuem para o estresse oxidativo, um dos principais fatores responsáveis pela disfunção endotelial, crescimento da lesão e instabilidade da placa de ateroma (Swirski, Nahrendorf, 2013).

Interessantemente, Meotti e colaboradores (2011) demonstraram que o ácido úrico na presença de mieloperoxidase purificada e de um sistema gerador de radical superóxido, situação que imita o “burst” oxidativo inflamatório, pode ser oxidado formando hidroperóxido de urato, devido à reação entre o radical de urato e o superóxido. Sendo assim, esse agente oxidante formado no leito vascular poderia modular proteínas redox sensíveis que participam da sinalização celular em processos inflamatórios, tais como a proteína dissulfeto isomerase (PDI).

Recentes trabalhos demonstraram que a atividade do complexo NADPH oxidase, presente em neutrófilos e células do músculo liso vascular, pode ser regulada pela PDI (Janiszewski et al., 2005; Paes et al., 2011). A oxidação da PDI aumenta a atividade intrínseca do complexo NADPH oxidase. Dessa maneira, o hidroperóxido de urato poderia oxidar a enzima PDI, com consequente modulação da NADPH oxidase e aumento da produção de superóxido por neutrófilos, elucidando

parcialmente os mecanismos moleculares envolvidos na progressão da aterosclerose em pacientes com hiperuricemia.

Para investigar a interação do hidroperóxido de urato com a PDI, realizou-se a síntese e caracterização química desse agente oxidante. O sistema de fotooxidação, utilizando urato, riboflavina e luz UVA, apresentou um rendimento de aproximadamente 50 % de hidroperóxido de urato após 10 minutos de irradiação. Porém, a manutenção da irradiação por períodos mais prolongados ocasionou uma diminuição na concentração de hidroperóxido. Com o intuito de obter o melhor rendimento, realizou-se também a síntese por irradiação com luz visível. No entanto, observou-se uma maior degradação do hidroperóxido de urato nesse sistema. Confirmando a participação do ânion radical superóxido na síntese do hidroperóxido, a adição da enzima superóxido dismutase à reação diminuiu significativamente a concentração de hidroperóxido formado após 10 minutos de irradiação com luz UVA. Além disso, demonstrou-se o envolvimento do radical de urato, visto que a ausência de qualquer um dos componentes, urato ou riboflavina, ou na ausência de irradiação não houve formação do hidroperóxido. Clausen e colaboradores (2010) sugerem que o hidroperóxido resistente à catalase formado através do sistema de fotooxidação supracitado trata-se do hidroperóxido de urato, porém investigaram essa hipótese utilizando apenas o método de FOX.

Sendo assim, analisamos a reação por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em tandem (CLAE-MS/MS) permitindo a caracterização do hidroperóxido de urato e possibilitaram o isolamento desse composto dos demais reagentes da síntese. Portanto, nossos resultados corroboram e ampliam e com os dados de Clausen e colaboradores (2010).

A determinação do padrão de fragmentação do hidroperóxido de urato também foi importante para investigarmos sua formação por células HL-60 diferenciadas em neutrófilos (dHL-60) na presença de urato. No entanto, a detecção direta do hidroperóxido de urato formado pelas células não foi possível pelo fato do composto reagir com biomoléculas e não acumular no sistema (dados não demonstrados).

Em continuidade à caracterização química do hidroperóxido de urato, determinou-se que o composto apresenta um coeficiente de absorvidade molar em 308 nm de $6537 \pm 377 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Esse dado viabilizou a quantificação rápida e direta da concentração molar do hidroperóxido de urato para os nossos ensaios. Essa ferramenta foi importante visto que o hidroperóxido possui tempo de meia-vida de aproximadamente 41 minutos à 22°C e não é estável após congelamento ou liofilização (dados não demonstrados).

Corroborando com nossa hipótese inicial, o hidroperóxido de urato é um composto com características oxidantes marcantes, apresentando um potencial de redução de 1 V (Dadamos et. al., dados não publicados; em colaboração com nosso grupo) e tem a habilidade de reagir de maneira eficiente com grupos tióis de peptídeos (Meotti et al., 2011). De fato, demonstramos que o hidroperóxido de urato foi capaz de reagir com aminoácidos que apresentavam átomo de enxofre em sua cadeia lateral, ou seja, com a metionina e com a cisteína presente na GSH, demonstrando sua seletividade para estes alvos. Além disso, a reação desse composto com os aminoácidos supracitados não gera adutos, hidroperóxido-aminoácido, visto que após reação com metionina observou-se a formação do produto reduzido do hidroperóxido, o álcool, 5-hidroxiisourato e com a glutatona identificou-se uma estequiometria 2:1, indicando que toda GSH consumida na presença de hidroperóxido de urato foi convertida em GSSG. É importante destacar que as modificações oxidativas nos resíduos de aminoácidos que contêm enxofre

(formação de sulfóxido de metionina, ácido sulfênico e pontes dissulfeto) são reversíveis, ao contrário das oxidações que ocorrem em outros resíduos (Stadtman e Levine, 2003).

A seletividade e a reversibilidade da oxidação são fatores importantes para a sinalização biológica (Janssen-Heininger et al., 2008). A oxidação em resíduos de cisteína pode modular a função de algumas proteínas ativando/inativando cascatas intracelulares, dentre as quais, vias de sinalização inflamatória (Winterbourn, Hampton, 2008; Bindoli, Rigobello, 2013). Esses dados deram suporte à hipótese de uma possível interação redox do hidroperóxido de urato com PDI, pois essa enzima apresenta seis resíduos de cisteína em sua estrutura, dos quais quatro estão presentes nos dois sítios catalíticos, compostos pelo motivo CGHC (Laurindo et al., 2012).

De fato, o hidroperóxido de urato foi totalmente consumido após incubação com a PDI reduzida ($\sim 5 \mu\text{molSH} \cdot \mu\text{mol proteína}^{-1}$), e essa passou a apresentar apenas $2,19 \mu\text{molSH} \cdot \mu\text{mol proteína}^{-1}$. A análise dos espectros de massas dos peptídeos que continham os sítios catalíticos da PDI, presentes nos domínios **a** e **a'**, comprovaram que os resíduos de cisteína catalíticos foram oxidados após exposição ao hidroperóxido de urato.

A oxidação do sítio catalítico **a** da PDI, induz mudanças conformacionais na proteína, diminuindo sua fluorescência intrínseca proveniente do triptofano (W52) justaposto a cisteína catalítica (Lappi et al., 2004). Quando a PDI reduzida foi exposta a diferentes concentrações de hidroperóxido de urato observou-se uma diminuição da intensidade de fluorescência. Essa característica espectroscópica foi utilizada para determinação da constante de velocidade da reação entre o hidroperóxido de urato e a PDI, pois não seria possível monitorar o consumo do hidroperóxido de urato através da absorção, visto o produto de sua redução, o álcool 5-hidroxiisourato apresenta um espectro de absorção semelhante. As variações de fluorescência puderam ser ajustadas por uma equação que define um processo com duas etapas. Sendo assim,

pode-se sugerir que a primeira etapa compreenderia a oxidação do sítio **a** da PDI pelo hidroperóxido de urato formando ácido sulfênico. Essa é uma reação do tipo S_N2, onde ocorre um ataque nucleofílico do ânion tiolato a um dos oxigênios do peróxido, passando por um estado de transição e posterior quebra da ligação do peróxido com a liberação do grupo abandonador, o álcool 5-hidroxiisourato. Considerando que o hidroperóxido de urato estava em excesso com relação a PDI, os dados obtidos são considerados como uma cinética de pseudo-primeira ordem. Já a segunda etapa do processo poderia corresponder ao ataque nucleofílico da cisteína adjacente ao ácido sulfênico para formação da ponte dissulfeto intramolecular no sítio ativo, visto que a velocidade dessa etapa foi independente da concentração de hidroperóxido de urato. Esta hipótese segue o modelo proposto para a oxidação da PDI pela glutathione dissulfeto (GSSG) (Lappi, Ruddock, 2011), embora, estudos mais específicos, aliados ao estudo cinético, precisam ser realizados para esclarecer este mecanismo de reação.

A primeira etapa da reação apresentou uma constante de velocidade de segunda-ordem de $1,5 \pm 0,04 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ demonstrando que no ambiente celular a PDI pode ser um alvo para oxidação pelo hidroperóxido de urato. Porém, visto que as peroxirredoxinas são enzimas especializadas na detoxificação de peróxidos (Ramming, Appenzeller-Herzog, 2013) essas poderiam apresentar valores de constantes de velocidade mais favoráveis para reação com o hidroperóxido de urato quando comparadas a PDI. Entretanto, no ambiente celular o alvo preferencial para oxidação é determinado por fatores adicionais a constante de velocidade, tais como difusão, compartimentalização e local onde o agente oxidante é formado (Winterbourn, Hampton, 2008; Finkel, 2011). Interessantemente, mesmo que o alvo inicial de oxidação possam ser as peroxirredoxinas, estudos recentes demonstraram que essas enzimas oxidadas podem

interagir com membros da família da PDI (Pace et al., 2013; Sato et al., 2013). Nosso grupo já está investigando a reatividade do hidróperóxido de urato com a peroxirredoxina 2.

Em conjunto, os resultados obtidos demonstraram que o hidróperóxido de urato é um forte oxidante capaz de reagir com os resíduos de cisteína catalíticas da PDI e a constante de velocidade da reação entre PDI e hidróperóxido de urato demonstra a viabilidade desta reação ocorrer no meio biológico.

Sabendo que a PDI é um alvo em potencial ao hidróperóxido de urato e que, este intermediário é formado através da oxidação do urato em ambiente inflamatório, investigou-se um possível efeito sinérgico do urato sobre a produção de superóxido em células dHL-60, como resposta à oxidação da PDI e ativação da Nox. Interessantemente, o urato apresentou um efeito dual sobre os níveis de superóxido. Na menor concentração de urato, 50 μM , houve uma redução na concentração de superóxido, o que poderia sugerir uma redução na produção de superóxido, ou, mais provavelmente, uma captação deste superóxido pelo radical de urato formado durante o “burst oxidativo”, com consequente síntese do hidróperóxido de urato. Por outro lado, concentrações maiores de urato (200 e 500 μM) ocasionaram um aumento progressivo na produção de superóxido. Embora as diferenças não tenham sido estatisticamente significativas, esses resultados sugerem que o urato está atuando sinergicamente com o PMA na produção de superóxido.

Paralelamente a estes resultados, observou-se um pequeno aumento no consumo de oxigênio que, embora pequeno, corrobora com o efeito sinérgico do urato sobre o “burst” oxidativo causado pelo PMA. Todavia, a variação do consumo de oxigênio entre as células tratadas apenas com PMA e tratadas com PMA mais urato é muito pequena e os resultados, portanto, inconclusivos. Isso pode ser decorrente de: 1) o PMA causa um aumento muito

significativo sobre o consumo de oxigênio, sobrepujando a evidência do efeito sinérgico do urato; 2) considerando a estequiometria destas reações do oxigênio temos que para cada duas moléculas de oxigênio consumidas na produção de superóxido, uma retornará ao sistema após a dismutação de dois superóxidos (Reação 4):

Então, mesmo que haja um maior aumento na produção de superóxido, é difícil verificar uma diferença significativa na concentração total de oxigênio. Uma alternativa a esta metodologia seria verificar os níveis de NADPH nos diferentes tratamentos.

É importante destacar que o ânion radical superóxido está envolvido na aterogênese, pois pode oxidar lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e sequestrar o óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$), promovendo ativação endotelial e proliferação de células do músculo liso vascular (VSMC) (Sirker et al., 2011). Sendo assim, a capacidade do urato em induzir uma maior produção de superóxido em neutrófilos constitui-se um importante fator pró-inflamatório.

Em conjunto com os demais resultados desse trabalho, pode-se sugerir que um dos mecanismos moleculares envolvidos nesse processo poderia ocorrer através da formação do hidroperóxido de urato durante o “burst oxidativo” dos neutrófilos que oxidaria a enzima PDI induzindo um consequente aumento da atividade da Nox.

6 CONCLUSÃO

Visto que em microambientes pró-inflamatórios como a placa de ateroma há grande presença de MPO, nesses locais o ácido úrico poderia ser oxidado formando hidroperóxido de urato. Postulamos assim que esse agente oxidante poderia oxidar a enzima PDI, com consequente modulação da NADPH oxidase e aumento da produção de superóxido por neutrófilos. Esse poderia ser um dos mecanismos moleculares envolvidos na progressão da aterosclerose em pacientes com hiperuricemia.

Nosso trabalho padronizou a síntese química do hidroperóxido de urato através de fotooxidação do tipo I e determinou os espectros de fragmentação desse composto e de seu produto de redução o álcool 5-hidroxiisourato, que pode ser utilizado para investigarmos a formação do hidroperóxido *in vivo*. Ainda, determinamos a estabilidade do hidroperóxido de urato e seu coeficiente de absorvidade molar possibilitando a quantificação rápida através da absorbância. Esses dados foram fundamentais para podermos testar nossa hipótese e permitirão a investigação das demais ações oxidantes desse composto *in vitro* e *in vivo* em outras vias de sinalização.

Interessantemente, o hidroperóxido de urato foi reativo com a metionina e com o resíduo de cisteína presente na GSH, mas não com outros aminoácidos demonstrando sua seletividade de reação. Além disso, o hidroperóxido de urato não formou adutos com a glutatona. Esses dados foram importantes para demonstrar que o hidroperóxido poderia atuar como uma molécula sinalizadora e deram suporte a nossa hipótese inicial.

De fato encontramos que o hidroperóxido de urato é um forte oxidante capaz de reagir com os resíduos de cisteína catalíticas da PDI e a constante de velocidade da reação entre PDI e

hidroperóxido de urato demonstra a viabilidade desta reação ocorrer no meio biológico. Dessa forma, demonstramos pela primeira vez a reação rápida da PDI com um peróxido orgânico.

Por fim, células dHL-60 ativadas na presença de urato apresentaram uma maior concentração de superóxido, que em conjunto com os demais resultados desse trabalho, permite-nos sugerir que um dos mecanismos moleculares envolvidos nesse processo poderia ocorrer através da formação do hidroperóxido de urato durante o “burst oxidativo” dos neutrófilos que oxidaria a enzima PDI induzindo um consequente aumento da atividade da Nox.

Esses resultados corroboram com nossa hipótese e incentivam a investigação mais aprofundada dos efeitos do hidroperóxido de urato sobre a via PDI-Nox e outras vias de sinalização em células endoteliais, neutrófilos e macrófagos. Esses dados permitirão elucidar parte dos efeitos biológicos desse composto e talvez possam estabelecer o hidroperóxido de urato como uma molécula responsável por promover a produção de espécies reativas e inflamação, permitindo explicar, ao menos em parte, os mecanismos moleculares pelos quais o urato colabora para a progressão da aterosclerose em pacientes com hiperuricemia independente da formação de cristais.

REFERÊNCIAS

- Alderman MH. Podagra, Uric acid, and Cardiovascular disease. *Circulation*. 2007, 116 (8): 880-883.
- Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981, 78 (11): 6858-6862.
- Ando W, ed. *Organic Peroxides*. Chichester: Wiley, 1992.
- Augusto O, Miyamoto S. Oxygen Radicals and Related Species. In: Pantopoulos K, Schipper H. (Eds.). *Principles of Free Radical Biomedicine*. Nova Biomedical Press; 2011. cap. 1.
- Bach R. General and Theoretical Aspects of the Peroxide Group. In: Rappoport Z, editor. *The Chemistry of Peroxide*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 2006. vol. 2, cap. 1, 1-91.
- Baetta R, Corsini A. Role of polymorphonuclear neutrophils in atherosclerosis: current state and future perspectives. *Atherosclerosis*. 2010, 210 (1): 1-13.
- Bagnati M, Perugini C, Cau C, Bordone R, Albano E, Bellomo G. When and why a water-soluble antioxidant becomes pro-oxidant during copper-induced low-density lipoprotein oxidation: a study using uric acid. *Biochem J*. 1999, 340 (pt 1): 143-152.
- Baldwin W, Mcrae S, Marek G, Wymer D, Pannu V, Baylis C, et al. Hyperuricemia as a mediator of the proinflammatory endocrine imbalance in the adipose tissue in a murine model of the metabolic syndrome. *Diabetes*. 2011, 60 (4): 1258-1269.
- Becker BF. Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic Biol Med*. 1993, 14 (6): 615-631.
- Bedard K, Krause KH. The Nox family of ros-generating Nadph oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2007, 87 (1): 245-313.
- Billiet L, Doaty S, Katz JD, Velasquez MT. Review of hyperuricemia as new marker for metabolic syndrome. *ISRN Rheumatol*. 2014, 2014: 852954.
- Bindoli A, Rigobello MP. Principles in redox signaling: from chemistry to functional significance. *Antioxid Redox Signal*. 2013, 18 (13): 1557-1593.
- Bowman GL, Shannon J, Frei B, Kaye JA, Quinn JF. Uric acid as a cns antioxidant. *J Alzheimers Dis*. 2010, 19 (4): 1331-1336.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976, 72: 248-254.
- Brigelius-Flohe R, Flohe L. Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors. *Antioxid Redox Signal*. 2011, 15 (8): 2335-2381.
- Brigelius-Flohe R, Maiorino M. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta*. 2013, 1830 (5): 3289-3303.
- Cadet J, Di Mascio P. Peroxides in Biological Systems. In: Rappoport Z, editor. *The Chemistry of Peroxide*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 2006. vol. 2, cap. 11, 915-988.

- Cadet J, Ravanat JL, Martinez GR, Medeiros MH, Di Mascio P. Singlet oxygen oxidation of isolated and cellular DNA: product formation and mechanistic insights. *Photochem Photobiol.* 2006, 82 (5): 1219-1225.
- Cardoso DR, Libardi SH, Skibsted LH. Riboflavin as a photosensitizer. Effects on human health and food quality. *Food Funct.* 2012, 3 (5): 487-502.
- Choe E, Huang R, Min DB. Chemical reactions and stability of riboflavin in foods. *Journal of Food Science.* 2005, 70 (1): R28-R36.
- Choi HK, Mount DB, Reginato AM. Pathogenesis of gout. *Ann Intern Med.* 2005, 143 (7): 499-516.
- Chung HS, Wang SB, Venkatraman V, Murray CI, Van Eyk JE. Cysteine oxidative posttranslational modifications: emerging regulation in the cardiovascular system. *Circ Res.* 2013, 112 (2): 382-392.
- Cipriani S, Chen X, Schwarzschild MA. Urate: a novel biomarker of Parkinson's disease risk, Diagnosis and prognosis. *Biomark Med.* 2010, 4 (5): 701-712.
- Clausen MR, Huvaere K, Skibsted LH, Stagsted J. Characterization of peroxides formed by riboflavin and light exposure of milk. Detection of urate hydroperoxide as a novel oxidation product. *J Agric Food Chem.* 2010, 58 (1): 481-487.
- Corry DB, Eslami P, Yamamoto K, Nyby MD, Makino H, Tuck ML. Uric acid stimulates vascular smooth muscle cell proliferation and oxidative stress via the vascular renin-angiotensin system. *J Hypertens.* 2008, 26 (2): 269-275.
- Das AB, Nagy P, Abbott HF, Winterbourn CC, Kettle AJ. Reactions of superoxide with the myoglobin tyrosyl radical. *Free Radic Biol Med.* 2010, 48 (11): 1540-1547.
- Davies MJ. Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. *Photochem Photobiol Sci.* 2004, 3 (1): 17-25.
- Davies MJ. The oxidative environment and protein damage. *Biochim Biophys Acta.* 2005, 1703 (2): 93-109.
- Davies MJ. Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. *J Clin Biochem Nutr.* 2011, 48 (1): 8-19.
- de Oliveira EP, Burini RC. High plasma uric acid concentration: causes and consequences. *Diabetol Metab Syndr.* 2012, 4: 12.
- Doehner W, Landmesser U. Xanthine oxidase and uric acid in cardiovascular disease: clinical impact and therapeutic options. *Semin Nephrol.* 2011, 31 (5): 433-440.
- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002, 82 (1): 47-95.
- Elahi MM, Kong YX, Matata BM. Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2009, 2 (5): 259-269.
- Euser SM, Hofman A, Westendorp RG, Breteler MM. Serum uric acid and cognitive function and dementia. *Brain.* 2009, 132 (Pt 2): 377-382.
- Falk E. Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2006, 47 (8 Suppl): C7-12.
- Feig DI, Kang DH, Johnson RJ. Uric acid and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* 2008, 359 (17): 1811-1821.

- Filipe P, Haigle J, Freitas J, Fernandes A, Maziere JC, Maziere C, et al. Anti- and pro-oxidant effects of urate in copper-induced low-density lipoprotein oxidation. *Eur J Biochem*. 2002, 269 (22): 5474-5483.
- Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol*. 2011, 194 (1): 7-15.
- Flohe L, Toppo S, Cozza G, Ursini F. A comparison of thiol peroxidase mechanisms. *Antioxid Redox Signal*. 2011, 15 (3): 763-780.
- Fomenko DE, Xing W, Adair BM, Thomas DJ, Gladyshev VN. High-throughput identification of catalytic redox-active cysteine residues. *Science*. 2007, 315 (5810): 387-389.
- Forman HJ, Fukuto JM, Torres M. Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004, 287 (2): C246-256.
- George J, Struthers AD. Role of urate, xanthine oxidase and the effects of allopurinol in vascular oxidative stress. *Vasc Health Risk Manag*. 2009, 5 (1): 265-272.
- Girotti AW. Translocation as a means of disseminating lipid hydroperoxide-induced oxidative damage and effector action. *Free Radic Biol Med*. 2008, 44 (6): 956-968.
- Glantzounis GK, Tsimoyiannis EC, Kappas AM, Galaris DA. Uric acid and oxidative stress. *Curr Pharm Des*. 2005, 11 (32): 4145-4151.
- Greer A. Christopher Foote's discovery of the role of singlet oxygen [$^1\text{O}_2$ (1Δg)] in photosensitized oxidation reactions. *ACC Chem Res*. 2006, 39 (11): 797-804.
- Gruber CW, Cemazar M, Heras B, Martin JL, Craik DJ. Protein Disulfide Isomerase: the structure of oxidative folding. *Trends Biochem Sci*. 2006, 31 (8): 455-464.
- Guasti L, Dentali F, Castiglioni L, Maroni L, Marino F, Squizzato A, et al. Neutrophils and clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes and/or cardiac revascularisation. A Systematic review on more than 34,000 subjects. *Thromb Haemost*. 2011, 106 (4): 591-599.
- Gupta V, Carroll KS. Sulfenic acid chemistry, detection and cellular lifetime. *Biochim Biophys Acta*. 2014, 1840 (2): 847-875.
- Hahm E, Li J, Kim K, Huh S, Rogelj S, Cho J. Extracellular Protein Disulfide Isomerase regulates ligand-binding activity of Alpha β 2 Integrin and Neutrophil Recruitment During Vascular Inflammation. *Blood*. 2013, 121 (19): 3789-3800, S3781-3715.
- Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4. ed. New York: Oxford University Press; 2007.
- Hartung J, Svoboda I. The Structural Chemistry of Acyclic Organic Peroxides. In: Rappoport Z, editor. *The Chemistry of Peroxide*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 2006. 93-138.
- Hatahet F, Ruddock LW. Protein Disulfide Isomerase: A Critical Evaluation of Its Function in Disulfide Bond Formation. *Antioxid Redox Signal*. 2009, 11 (11): 2807-2850.
- Hayden MR, Tyagi SC. Uric Acid: A New Look at an Old Risk Marker for Cardiovascular Disease, Metabolic Syndrome, and Type 2 Diabetes Mellitus: The Urate Redox Shuttle. *Nutr Metab (Lond)*. 2004, 1 (1): 10.

- Hediger MA, Johnson RJ, Miyazaki H, Endou H. Molecular Physiology of Urate Transport. *Physiology* (Bethesda). 2005, 20: 125-133.
- Hellsten Y, Svensson M, Sjodin B, Smith S, Christensen A, Richter EA, et al. Allantoin Formation and Urate and Glutathione Exchange in Human Muscle During Submaximal Exercise. *Free Radic Biol Med*. 2001, 31 (11): 1313-1322.
- Hiatt RR, Irwin KC. Homolytic Decompositions of Hydroperoxides. V. Thermal Decompositions. *J Org Chem*. 1968, 33 (4): 1436-1441.
- Hooper DC, Scott GS, Zborek A, Mikheeva T, Kean RB, Koprowski H, et al. Uric Acid, a Peroxynitrite Scavenger, Inhibits CNS Inflammation, Blood-CNS Barrier Permeability Changes, and Tissue Damage in a Mouse Model of Multiple Sclerosis. *FASEB J*. 2000, 14 (5): 691-698.
- Hooper DC, Spitsin S, Kean RB, Champion JM, Dickson GM, Chaudhry I, et al. Uric Acid, a Natural Scavenger of Peroxynitrite, in Experimental Allergic Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998, 95 (2): 675-680.
- Iesce M, Cermola F, Temussi F. Photooxygenation of Heterocycles. *Curr Org Chem*. 2005, 9 (2): 109-139.
- Janiszewski M, Lopes LR, Carmo AO, Pedro MA, Brandes RP, Santos CX, et al. Regulation of NAD(P)H Oxidase by Associated Protein Disulfide Isomerase in Vascular Smooth Muscle Cells. *J Biol Chem*. 2005, 280 (49): 40813-40819.
- Janssen-Heininger YM, Mossman BT, Heintz NH, Forman HJ, Kalyanaraman B, Finkel T, et al. Redox-Based Regulation of Signal Transduction: Principles, Pitfalls, and Promises. *Free Radic Biol Med*. 2008, 45 (1): 1-17.
- Johnson RJ, Kang DH, Feig D, Kivlighn S, Kanellis J, Watanabe S, et al. Is There a Pathogenetic Role for Uric Acid in Hypertension and Cardiovascular and Renal Disease? *Hypertension*. 2003, 41 (6): 1183-1190.
- Kahn K, Serfozo P, Tipton PA. Identification of the True Product of the Urate Oxidase Reaction. *J Am Chem Soc*. 1997, 119 (23): 5435-5442.
- Kahn K, Tipton PA. Spectroscopic Characterization of Intermediates in the Urate Oxidase Reaction. *Biochemistry*. 1998, 37 (33): 11651-11659.
- Kanellis J, Kang DH. Uric Acid as a Mediator of Endothelial Dysfunction, Inflammation, and Vascular Disease. *Semin Nephrol*. 2005, 25 (1): 39-42.
- Kanellis J, Watanabe S, Li JH, Kang DH, Li P, Nakagawa T, et al. Uric Acid Stimulates Monocyte Chemoattractant Protein-1 Production in Vascular Smooth Muscle Cells Via Mitogen-Activated Protein Kinase and Cyclooxygenase-2. *Hypertension*. 2003, 41 (6): 1287-1293.
- Karala AR, Lappi AK, Saaranen MJ, Ruddock LW. Efficient Peroxide-Mediated Oxidative Refolding of a Protein at Physiological pH and Implications for Oxidative Folding in the Endoplasmic Reticulum. *Antioxid Redox Signal*. 2009, 11 (5): 963-970.
- Kaur H, Halliwell B. Action of Biologically-Relevant Oxidizing Species Upon Uric Acid. Identification of Uric Acid Oxidation Products. *Chem Biol Interact*. 1990, 73 (2-3): 235-247.
- Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: Friend and Foe. *J Leukoc Biol*. 2005, 77 (5): 598-625.

- Kleemann R, Zadelaar S, Kooistra T. Cytokines and Atherosclerosis: A Comprehensive Review of Studies in Mice. *Cardiovasc Res*. 2008, 79 (3): 360-376.
- Knapp CM, Constantinescu CS, Tan JH, McLean R, Cherryman GR, Gottlob I. Serum Uric Acid Levels in Optic Neuritis *Mult Scler*. 2004, 10 (3): 278-280.
- Kuhn H, Borchert A. Regulation of Enzymatic Lipid Peroxidation: The Interplay of Peroxidizing and Peroxide Reducing Enzymes. *Free Radic Biol Med*. 2002, 33 (2): 154-172.
- Kurtin WE, Song PS. Photochemistry of the Model Phototropic System Involving Flavins and Indoles. I. Fluorescence Polarization and MO Calculations of the Direction of the Electronic Transition Moments in Flavins. *Photochem Photobiol*. 1968, 7 (3): 263-273.
- Kutzing MK, Firestein BL. Altered Uric Acid Levels and Disease States. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008, 324 (1): 1-7.
- Lappi AK, Lensink MF, Alanen HI, Salo KE, Lobell M, Juffer AH, et al. A Conserved Arginine Plays a Role in the Catalytic Cycle of the Protein Disulphide Isomerases. *J Mol Biol*. 2004, 335 (1): 283-295.
- Lappi AK, Ruddock LW. Reexamination of the Role of Interplay between Glutathione and Protein Disulfide Isomerase. *J Mol Biol*. 2011, 409 (2): 238-249.
- Lassegue B, Griendling KK. NADPH Oxidases: Functions and Pathologies in the Vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010, 30 (4): 653-661.
- Laurindo FR, Fernandes DC, Amanso AM, Lopes LR, Santos CX. Novel Role of Protein Disulfide Isomerase in the Regulation of NADPH Oxidase Activity: Pathophysiological Implications in Vascular Diseases. *Antioxid Redox Signal*. 2008, 10 (6): 1101-1113.
- Laurindo FR, Pescatore LA, Fernandes DC. Protein Disulfide Isomerase in Redox Cell Signaling and Homeostasis. *Free Radic Biol Med*. 2012, 52 (9): 1954-1969.
- Learn DB, Fried VA, Thomas EL. Taurine and Hypotaurine Content of Human Leukocytes. *J Leukoc Biol*. 1990, 48 (2): 174-182.
- Leto TL, Morand S, Hurt D, Ueyama T. Targeting and Regulation of Reactive Oxygen Species Generation by Nox Family NADPH Oxidases. *Antioxid Redox Signal*. 2009, 11 (10): 2607-2619.
- Li H, Horke S, Forstermann U. Oxidative Stress in Vascular Disease and Its Pharmacological Prevention. *Trends Pharmacol Sci*. 2013, 34 (6): 313-319.
- Libby P. Inflammation in Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012, 32 (9): 2045-2051.
- Lo Conte M, Carroll K. The Chemistry of Thiol Oxidation and Detection. In: Jakob U, Reichmann D (Eds.). *Oxidative Stress and Redox Regulation*. Springer; 2013. cap. 1.
- Lowther WT, Haynes AC. Reduction of Cysteine Sulfinic Acid in Eukaryotic, Typical 2-Cys Peroxiredoxins by Sulfiredoxin. *Antioxid Redox Signal*. 2011, 15 (1): 99-109.
- Madamanchi NR, Runge MS. Redox Signaling in Cardiovascular Health and Disease. *Free Radic Biol Med*. 2013, 61C: 473-501.

- Mansur A, Favarato D. Mortality Due to Cardiovascular Diseases in Brazil and in the Metropolitan Region of São Paulo: A 2011 Update. *Arq Bras Cardiol.* 2012, 99 (2): 755-761.
- Maples KR, Mason RP. Free Radical Metabolite of Uric Acid. *J Biol Chem.* 1988, 263 (4): 1709-1712.
- Marian CM. Spin-Orbit Coupling and Intersystem Crossing in Molecules. *WIREs Comput Mol Sci* 2012, 2 (2): 187–203.
- Masuda T, Shinoara H, Kondo M. Reactions of Hydroxyl Radicals with Nucleic Acid Bases and the Related Compounds in Gamma-Irradiated Aqueous Solution. *J Radiat Res.* 1975, 16 (3): 153-161.
- Meotti FC, Jameson GN, Turner R, Harwood DT, Stockwell S, Rees MD, et al. Urate as a Physiological Substrate for Myeloperoxidase: Implications for Hyperuricemia and Inflammation. *J Biol Chem.* 2011, 286 (15): 12901-12911.
- Miyamoto S, Ronsein GE, Prado FM, Uemi M, Correa TC, Toma IN, et al. Biological Hydroperoxides and Singlet Molecular Oxygen Generation. *IUBMB Life.* 2007, 59 (4-5): 322-331.
- Muraoka S, Miura T. Inhibition by Uric Acid of Free Radicals That Damage Biological Molecules. *Pharmacol Toxicol.* 2003, 93 (6): 284-289.
- Nakagawa T, Kang DH, Feig D, Sanchez-Lozada LG, Srinivas TR, Sautin Y, et al. Unearthing Uric Acid: An Ancient Factor with Recently Found Significance in Renal and Cardiovascular Disease. *Kidney Int.* 2006, 69 (10): 1722-1725.
- Nauseef WM. Nox Enzymes in Immune Cells. *Semin Immunopathol.* 2008, 30 (3): 195-208.
- Niki E. Do Free Radicals Play Causal Role in Atherosclerosis? Low Density Lipoprotein Oxidation and Vitamin E Revisited. *J Clin Biochem Nutr.* 2011, 48 (1): 3-7.
- Nourooz-Zadeh J. Ferrous Ion Oxidation in Presence of Xylenol Orange for Detection of Lipid Hydroperoxides in Plasma. *Methods Enzymol.* 1999, 300: 58-62.
- Pace PE, Peskin AV, Han MH, Hampton MB, Winterbourn CC. Hyperoxidized Peroxiredoxin 2 Interacts with the Protein Disulfide- Isomerase Erp46. *Biochem J.* 2013, 453 (3): 475-485.
- Paes AM, Verissimo-Filho S, Guimaraes LL, Silva AC, Takiuti JT, Santos CX, et al. Protein Disulfide Isomerase Redox-Dependent Association with P47phox: Evidence for an Organizer Role in Leukocyte NADPH Oxidase Activation. *J Leukoc Biol.* 2011, 90(4):799-810.
- Peng F, Zhang B, Zhong X, Li J, Xu G, Hu X, et al. Serum Uric Acid Levels of Patients with Multiple Sclerosis and Other Neurological Diseases. *Mult Scler.* 2008, 14 (2): 188-196.
- Pihlajaniemi T, Helaakoski T, Tasanen K, Myllyla R, Huhtala ML, Koivu J, et al. Molecular Cloning of the Beta-Subunit of Human Prolyl 4-Hydroxylase. This Subunit and Protein Disulphide Isomerase Are Products of the Same Gene. *EMBO J.* 1987, 6 (3): 643-649.
- Podrez EA, Abu-Soud HM, Hazen SL. Myeloperoxidase-Generated Oxidants and Atherosclerosis. *Free Radic Biol Med.* 2000, 28 (12): 1717-1725.
- Prado FM, Oliveira MC, Miyamoto S, Martinez GR, Medeiros MH, Ronsein GE, et al. Thymine Hydroperoxide as a Potential Source of Singlet Molecular Oxygen in DNA. *Free Radic Biol Med.* 2009, 47 (4): 401-409.

- PubChem. Uric acid. Disponível em: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=1175>. Acesso em: março de 2014.
- Quijano C, Alvarez B, Gatti RM, Augusto O, Radi R. Pathways of Peroxynitrite Oxidation of Thiol Groups. *Biochem J*. 1997, 322 (Pt 1): 167-173.
- Quintero B, Miranda M. Mechanisms of Photosensitization Induced by Drugs: A General Survey. *Ars Pharmaceutica*. 2000, 41 (1): 27-46.
- Ramming T, Appenzeller-Herzog C. Destroy and Exploit: Catalyzed Removal of Hydroperoxides from the Endoplasmic Reticulum. *Int J Cell Biol*. 2013, 2013: 180906.
- Reddie KG, Carroll KS. Expanding the Functional Diversity of Proteins through Cysteine Oxidation. *Curr Opin Chem Biol*. 2008, 12 (6): 746-754.
- Rhee SG, Woo HA, Kil IS, Bae SH. Peroxiredoxin Functions as a Peroxidase and a Regulator and Sensor of Local Peroxides. *J Biol Chem*. 2012, 287 (7): 4403-4410.
- Roos G, Messens J. Protein Sulfenic Acid Formation: From Cellular Damage to Redox Regulation. *Free Radic Biol Med*. 2011, 51 (2): 314-326.
- Rotzius P, Thams S, Soehnlein O, Kenne E, Tseng CN, Bjorkstrom NK, et al. Distinct Infiltration of Neutrophils in Lesion Shoulders in ApoE^{-/-} Mice. *Am J Pathol*. 2010, 177 (1): 493-500.
- Santos CX, Anjos EI, Augusto O. Uric Acid Oxidation by Peroxynitrite: Multiple Reactions, Free Radical Formation, and Amplification of Lipid Oxidation. *Arch Biochem Biophys*. 1999, 372 (2): 285-294.
- Sato Y, Kojima R, Okumura M, Hagiwara M, Masui S, Maegawa K, et al. Synergistic Cooperation of Pdi Family Members in Peroxiredoxin 4-Driven Oxidative Protein Folding. *Sci Rep*. 2013, 3: 2456.
- Sautin YY, Johnson RJ. Uric Acid: The Oxidant-Antioxidant Paradox. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2008, 27 (6): 608-619.
- Sautin YY, Nakagawa T, Zharikov S, Johnson RJ. Adverse Effects of the Classic Antioxidant Uric Acid in Adipocytes: NADPH Oxidase-Mediated Oxidative/Nitrosative Stress. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007, 293 (2): C584-596.
- Schindhelm RK, van der Zwan LP, Teerlink T, Scheffer PG. Myeloperoxidase: A Useful Biomarker for Cardiovascular Disease Risk Stratification? *Clin Chem*. 2009, 55 (8): 1462-1470.
- Schoen FJ. Blood Vessels. In: Kumar V, Abbas A, Fausto N, (Eds.). *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. Elsevier Saunders; 2005. 511-527.
- Simic MG, Jovanovic SV. Antioxidation Mechanisms of Uric Acid. *J Am Chem Soc*. 1989, 111 (15): 5778-5782.
- Sirker A, Zhang M, Shah AM. NADPH Oxidases in Cardiovascular Disease: Insights from in Vivo Models and Clinical Studies. *Basic Res Cardiol*. 2011, 106 (5): 735-747.
- So A, Thorens B. Uric Acid Transport and Disease. *J Clin Invest*. 2010, 120 (6): 1791-1799.
- Soehnlein O. Multiple Roles for Neutrophils in Atherosclerosis. *Circ Res*. 2012, 110 (6): 875-888.

- Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory Cytokines in Vascular Dysfunction and Vascular Disease. *Biochem Pharmacol.* 2009, 78 (6): 539-552.
- Stadtman ER, Levine RL. Free Radical-Mediated Oxidation of Free Amino Acids and Amino Acid Residues in Proteins. *Amino Acids.* 2003, 25 (3-4): 207-218.
- Stocker R, Keaney JF, Jr. Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. *Physiol Rev.* 2004, 84 (4): 1381-1478.
- Swirski FK, Nahrendorf M. Leukocyte Behavior in Atherosclerosis, Myocardial Infarction, and Heart Failure. *Science.* 2013, 339 (6116): 161-166.
- Toncev G, Milicic B, Toncev S, Samardzic G. Serum Uric Acid Levels in Multiple Sclerosis Patients Correlate with Activity of Disease and Blood-Brain Barrier Dysfunction. *Eur J Neurol.* 2002, 9 (3): 221-226.
- Viazzi F, Parodi D, Leoncini G, Parodi A, Falqui V, Ratto E, et al. Serum Uric Acid and Target Organ Damage in Primary Hypertension. *Hypertension.* 2005, 45 (5): 991-996.
- Wang C, Li W, Ren J, Fang J, Ke H, Gong W, et al. Structural Insights into the Redox-Regulated Dynamic Conformations of Human Protein Disulfide Isomerase. *Antioxid Redox Signal.* 2013, 19 (1): 36-45.
- Wang C, Yu J, Huo L, Wang L, Feng W, Wang CC. Human Protein-Disulfide Isomerase Is a Redox-Regulated Chaperone Activated by Oxidation of Domain a'. *J Biol Chem.* 2012, 287 (2): 1139-1149.
- Weber C, Noels H. Atherosclerosis: Current Pathogenesis and Therapeutic Options *Nat Med.* 2011, 17 (11): 1410-1422.
- Weerapana E, Wang C, Simon GM, Richter F, Khare S, Dillon MB, et al. Quantitative Reactivity Profiling Predicts Functional Cysteines in Proteomes. *Nature.* 2010, 468 (7325): 790-795.
- Weisskopf MG, O'Reilly E, Chen H, Schwarzschild MA, Ascherio A. Plasma Urate and Risk of Parkinson's Disease. *Am J Epidemiol.* 2007, 166 (5): 561-567.
- Wetterau JR, Combs KA, Spinner SN, Joiner BJ. Protein Disulfide Isomerase Is a Component of the Microsomal Triglyceride Transfer Protein Complex. *J Biol Chem.* 1990, 265 (17): 9800-9807.
- WHO World Health Organization. The top 10 causes of death. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>. Acesso em: março de 2014.
- Wilkinson B, Gilbert HF. Protein Disulfide Isomerase. *Biochim Biophys Acta.* 2004, 1699 (1-2): 35-44.
- Winterbourn CC, Hampton MB. Thiol Chemistry and Specificity in Redox Signaling. *Free Radic Biol Med.* 2008, 45 (5): 549-561.
- Winterbourn CC, Parsons-Mair HN, Gebicki S, Gebicki JM, Davies MJ. Requirements for Superoxide-Dependent Tyrosine Hydroperoxide Formation in Peptides. *Biochem J.* 2004, 381 (Pt 1): 241-248.
- Wolff SP. Ferrous Ion Oxidation in Presence of Ferric Ion Indicator Xylenol Orange for Measurement of Hydroperoxides. In: Lester P, editor. *Methods in Enzymology.* Academic Press; 1994. p. 182-189.

- Woo HA, Jeong W, Chang TS, Park KJ, Park SJ, Yang JS, et al. Reduction of Cysteine Sulfinic Acid by Sulfiredoxin Is Specific to 2-Cys Peroxiredoxins. *J Biol Chem*. 2005, 280 (5): 3125-3128.
- Wood ZA, Schroder E, Robin Harris J, Poole LB. Structure, Mechanism and Regulation of Peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci*. 2003, 28 (1): 32-40.
- Xu S, Sankar S, Neamati N. Protein Disulfide Isomerase: A Promising Target for Cancer Therapy. *Drug Discov Today*. 2014, 19 (3): 222-240.
- Zernecke A, Bot I, Djalali-Talab Y, Shagdarsuren E, Bidzhekov K, Meiler S, et al. Protective Role of CXC Receptor 4/CXC Ligand 12 Unveils the Importance of Neutrophils in Atherosclerosis. *Circ Res*. 2008, 102 (2): 209-217.
- Zhao H, Kalivendi S, Zhang H, Joseph J, Nithipatikom K, Vasquez-Vivar J, et al. Superoxide Reacts with Hydroethidine but Forms a Fluorescent Product That Is Distinctly Different from Ethidium: Potential Implications in Intracellular Fluorescence Detection of Superoxide. *Free Radic Biol Med*. 2003, 34 (11): 1359-1368.
- Zielonka J, Zhao H, Xu Y, Kalyanaraman B. Mechanistic Similarities between Oxidation of Hydroethidine by Fremy's Salt and Superoxide: Stopped-Flow Optical and EPR Studies. *Free Radic Biol Med*. 2005, 39 (7): 853-863.

SÚMULA CURRICULAR

Dados Pessoais

Nome: Eliziane de Souza Patricio

Local e data de nascimento: Urubici, SC; 12 de outubro de 1990

Formação acadêmica

2012-Atual	Mestrado em Bioquímica - Conceito CAPES 7
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
2008-2011	Graduação em Farmácia
Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil
2005-2007	Ensino médio
Escola Adebai Ramos da Silva, Florianópolis, SC, Brasil
Instituto Estadual de Educação Elisa Ferrari Valls,
Uruguaiana, RS, Brasil

Artigos completos publicados em periódicos

Chemello C, Souza F, **PATRICIO ES**, Farias MR. Pharmaceutical care as a strategy to improve the safety and effectiveness of patients pharmacotherapy at a Pharmacy School: a practical proposal. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 50, n. 1, jan./mar., 2014.

Dutra RC, Leite DFP, Bento AF, Manjavachi MN., **PATRICIO ES**, Figueiredo CP, Pesquero JB, Calixto JB. The Role of Kinin Receptors in Preventing Neuroinflammation and Its Clinical Severity during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice.

Plos One, v.6, p.e27875, 2011.

Artigos em preparação

PATRICIO, E. S.; Prado, F. M; Di Mascio, P.; Meotti, F. C. Synthesis and characterization of urate hydroperoxide: detecting a harmful oxidant in inflammatory process.

PATRICIO, E. S.; Costa, R.; Bicca, M. A., Manjavachi, M. N.; Cunha, T. M.; Figueiredo, C. P.; J. B. Calixto. Mechanisms underlying the scratching behavior induced by the activation of proteinase activated receptor-4 (PAR-4) in mice.

Livros

PATRICIO, E. S., Souza, F., Chemello, C.; Farias, M. R.. Tradução para o espanhol Luque, B. S.. Revisão Benbrahim N. F. Cuidado del Paciente com Enfermedad de Parkinson - Guía de seguimiento farmacoterapéutico. e-book. WeSapiens 2014.

Resumos publicados em anais de congressos

PATRICIO, E. S. ; Prado, F. M. ; Di Mascio, P. ; Meotti, F. C. . Underlying The Prooxidant Effects of Urate Hydroperoxide on Redox Modulated Proteins: a Pivotal Role in Inflammation.. In: Antioxidant and Redox Process in Health Bilateral Meeting Brazil Japan, 2013, São Paulo, SP, Brasil. 2013, p. 34.

PATRICIO, E. S. ; Prado, F. M. ; Di Mascio, P. ; Meotti, F. C. . Underlying the prooxidant effects of urate hydroperoxide on redox modulated proteins: a pivotal role in inflammation.. In: 11º World Congress on Inflammation e XXXVIII Congress of the Brazilian Society of Immunology (SBI), Natal, RN, Brasil. 2013, p. 86.

PATRICIO, E. S. ; Prado, F. M. ; Di Mascio, P. ; Meotti, F. C. . Underlying The Prooxidant Effects of Urate Hydroperoxide on Redox Modulated Proteins: a Pivotal Role

in Inflammation.. In: VIII Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine-South American Group (SFRBM-SAG), Buenos Aires, Argentina. 2013, p. 93.

PATRICIO, E. S. ; Prado, F. M. ; Moretti, A. ; Laurindo, F. R. M. ; Meotti, F. C. . Underlying The Prooxidant Effects of Urate Hydroperoxide on Redox Modulated Proteins: a Pivotal Role in Inflammation.. In: XX Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine (SFRBM), San Antonio, Texas, EUA. 2013, v. 337. p. S145.

Dutra, R. C. ; Leite, D. F. P. ; Manjavachi, M. N. ; **PATRICIO, E. S.** ; Bento, A. F. ; Figueiredo, C. P. ; Pesquero, J. B. ; Calixto, João B. . Inhibition of kinin receptors attenuates the neuroinflammation and the clinical severity in multiple sclerosis experimental model: the dominant role of kinin B1 receptor. In: International Symposium on Cell Signaling, 2010, Florianópolis. International Symposium on Cell Signaling. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2010. v. 1. p. 47-47.

Dutra, R. C. ; Leite, D. F. P. ; Manjavachi, M. N. ; **PATRICIO, E. S.** ; Bento, A. F. ; Figueiredo, C. P. ; Pesquero, J. B. ; Calixto, João B. . KInin B1 receptor inhibition ameliorates the neuroinflammation and the clinical severity in experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. In: 14th International Congress of Immunology, 2010, Kobe. 14th International Congress of Immunology. Oxford: Oxford University Press. v. 22. p. i151-i151.

PATRICIO, E. S. ; Costa, R. ; Figueiredo, C. P. ; Motta, E. M. ; Calixto, J. B. . Mechanisms underlying the scratching behavior induced by the activation of proteinase activated receptor-4 (PAR-4) in mice. In: 42º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2010, Ribeirão Preto. 42º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. Ribeirão Preto: SBFTE, 2010. v. 1. p. 3-3.

PATRICIO, E. S. ; Costa, R. ; Figueiredo, C. P. ; Motta, E. M. ; Calixto, J. B. . Analysis of the scratching behaviour induced by the proteinase activated receptor-4 (PAR-4) agonist AYPGKF-NH2 in mice.. In: 41º Congresso Brasileiro de Farmacologia e

Terapêutica Experimental, 2009, Ribeirão Preto. Anais do 41º Congresso de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2009, 2009.

PATRICIO, E. S. ; Batista, S. C. ; Fonseca, B. S. ; Campos, J. C. C. ; Antunes Junior, N. M. . Temporizador Hidráulico. In: Feira Brasileira de Ciências e Engenharia FEBRACE 4, 2006, São Paulo, SP, Brasil. Resumos FEBRACE 2006. São Paulo: EPUSP, 2006. v. xxvi. p. 218.

Premiações

- Out/2013 *Travel Award* – VIII Meeting of the South American Group of the Society for Free Radical Biology and Medicine. Scientific Committee of the VIII Meeting of the South American Group of the Society for Free Radicals
- Set/2013 *The Best SBI Abstract Award* on the category of Posgraduate (master), 11th World Congress on Inflammation and XXXVIII Congress of Brazilian Society of Immunology. Natal, RN, Brasil.
- Dez/2011 *Mérito Estudantil* – Melhor Aluna do Curso de Farmácia Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.
- Out/2010 *Menção Honrosa* - Sociedade Brasileira de Farmacologia e Terapêutica Experimental, pelo painel apresentado no 42º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, Ribeirão Preto, SP, Brasil.
- Mar/2006 *Carta Prêmio* - Optical Society of America Student Chapter at Unicamp (OSA-SCU) pelo projeto apresentado durante a IV Feira Brasileira de Ciências e Engenharia (FEBRACE), São Paulo, SP, Brasil.

Apresentação oral em congressos

Underlying the pro-oxidant effects of the urate hydroperoxide on redox modulated proteins: pivotal role in inflammation. Antioxidants and Redox Process in Health- Bilateral Meeting Brazil-Japan, São Paulo, SP, 2013.

Underlying the scratching behavior induced by the activation of proteinase activated receptor-4 (PAR-4) in mice. II Simpósio Catarinense de Neurociências, Florianópolis, SC, 2011.

Supervisões

Elza Maria Calegari. Estágio Curricular em Laboratório de Pesquisa, Jan-Fev 2014.

Lucas Cendron. Estágio Curricular em Laboratório de Pesquisa, Jan-Fev 2014.

Organização de eventos

IV Encontro da Pós-Graduação IQ-USP, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Set 2013.

Mesas redondas

PATRICIO ES (mediadora), Tebeka IR, Leme AP, Bagnato, V. Oportunidades para o cientista além da academia. IV Encontro da Pós-Graduação IQ-USP, Set 2013.

Participação em congressos

Out/2013 Antioxidants and Redox Process in Health- Bilateral Meeting Brazil-Japan. São Paulo, SP, Brasil.

Out/2013 VII Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine South American Group. Buenos Aires, Argentina.

- Set/2013 11th World Congress on Inflammation and XXXVIII Congress of the Brazilian Society of Immunology. Natal, RN, Brasil.
- Set/2012 “II Congresso Institucional”. Instituto de Química - Depto de Bioquímica e Química Fundamental do Instituto de Química da USP. Guarujá, SP, Brasil.

Cursos/Atividades complementares

- Fev/2013- Representante Discente. Membro da Comissão Coordenadora do Fev/2014 Programa de Pós-Graduação em Bioquímica (CCP), IQ-USP.
- Jan/2013 Ministrante do VIII Curso de Verão em Bioquímica e Biologia Molecular
Carga horária: 80h. Depto. de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, SP, Brasil.
- Nov/2012 “WorkShop de Aterosclerose Biologia Vascular 2012”. Sociedade Brasileira de Cardiologia-Departamento de Aterosclerose. São Paulo, SP.
- Nov/2012 “Alunos na Ciência”. Depto de Bioquímica - Instituto de Química. São Paulo, SP.
Painel apresentado: “Synthesis and characterization of urate hydroperoxide: detecting a harmful oxidant in inflammatory process”.
- Ago/2012 “1st Symposium on angiogenesis, lymphogenesis and endothelial barriers”. Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein. São Paulo, SP.
- Jul/2012 Monitora do VII Curso de Inverno Temas Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular”. Depto. de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, SP, Brasil.

- Jun/2012 “1º Workshop em Capacitação para Pesquisadores da USP em Publicação Científica”. SibiUSP-Sistema Integrado de Bibliotecas Universidade de São Paulo. São Paulo, SP.
- Mar/2012 Curso Noções Básicas de Segurança em Laboratórios de Pesquisa em Química e Bioquímica – carga horária: 15h
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, SP, Brasil.
- Fev/2012 XXXII Escola de Verão em Química Profº Dr. José Tercio B. Ferreira,
Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, SP, Brasil.
- Ago/2011 I Curso de Inverno em Oncologia Molecular
Faculdade de Medicina da USP e Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.
- Jan/2011 III Escola de Verão em Fisio-Farmacologia
Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, São Paulo, SP, Brasil.
- Jan/2011 XVII Escola Química Farmacêutica e Medicinal
Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.