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

LARISSA ANASTACIO DA COSTA CARVALHO

**Efeito pró-oxidante do hidroperóxido de urato
sobre proteínas sensíveis às alterações redox:
implicações na resposta inflamatória**

Versão Corrigida da Tese

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
05/07/2017

LARISSA ANASTACIO DA COSTA CARVALHO

**Efeito pró-oxidante do hidropéroxido de urato sobre proteínas
sensíveis às alterações redox: implicações na resposta
inflamatória**

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Flávia Carla Meotti

São Paulo

2017

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

C331e Carvalho, Larissa Anastacio da Costa
Efeito pró-oxidante do hidroperóxido de urato sobre proteínas
sensíveis às alterações redox: implicações na resposta
inflamatória / Larissa Anastacio da Costa Carvalho. -- São Paulo,
2017.
150p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador: Meotti, Flávia Carla

1. Enzimas oxidantes e redutores 2. Peroxidase: bioquímica I.
Meotti, Flávia Carla, orientador.

574.19258 CDD

“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que fez tua rosa tão importante.”

Antoine de Saint-Exupéry

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Sonia e Luís pela educação, oportunidades, amor e dedicação que sempre tiveram por mim. Ao Alexandre por ser esta pessoa tão especial, pelo companheirismo, amor e incentivo sempre. A toda minha família, em especial minha avó Eugênia, meus tios Suely e Eduardo, minha irmã Vanessa e meus avós que de longe olham por mim, Orlando, Antonio e Ricardina por todo amor e apoio. A toda família do Alexandre pelo apoio e carinho.

À Profa. Dra. Flavia Carla Meotti pela orientação, confiança, oportunidade, aprendizados, discussões construtivas, dedicação pelo meu trabalho e por ter me oferecido um projeto que me encantou desde o primeiro experimento até o ponto final desta tese.

Aos nossos colaboradores, pois graças a este fantástico grupo o presente trabalho foi possível: Profa. Dra. Ohara Augusto, Prof. Dr. Luis Netto, Prof. Dr. José Toledo, Simone Alves, Prof. Dr. Anthony Kettle, Prof. Dr. Paolo Di Mascio, Dra. Fernanda Prado, Dra. Daniela Truzzi, Prof. Dr. Alexandre Bruni, Profa. Dra. Regina Baldini, Me. Gilberto Kaihami e Profa. Dra. Lucia Lopes.

A todos os amigos do laboratório, em especial aos queridos Phelipe, Thamiris, Layara, Marli, Luiz, Angie, Mario, Cheila, Tatiana, Marcus, Yony, Valdomiro, Peter, Faby e Eliziane pela ótima convivência, risadas e discussões.

A todos os amigos que fiz no laboratório do Prof. Luis Netto pela receptividade, auxílios e conversas, em especial ao Diogo, Thiago, Simone, Andressa, Maria Cristina, Renata, Carlos, Flávio, Eduardo, Anita, Fernando, Amanda e Júlia.

Aos alunos de iniciação científica com quem tive a oportunidade de trabalhar, aprender e ensinar: Thamiris, João, Sabrina e Felipe.

Aos professores que gentilmente permitiram o uso de seus equipamentos Prof. Dr. Mauricio Baptista e Prof. Dr. Reinaldo Bazito. Ao Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida e os amigos do laboratório pelo auxílio no experimento de LDH.

À Profa. Dra. Iolanda Cuccovia, Prof. Dr. Hernan Chaimovich e ao Prof. Dr. Roberto Salinas pelo uso dos equipamentos e harmoniosa convivência no laboratório.

À todos os professores que contribuíram para minha formação nas disciplinas durante o doutorado, em especial Profa. Dra. Ohara Augusto, Prof. Dr. Paolo Di Mascio, Profa. Dra. Marisa Medeiros, Prof. Dr. Etelvino Bechara, Profa. Dra. Lucia Lopes e Profa. Dra. Alessandra Pontillo.

Ao Prof. Dr. Walter Terra, Profa. Dra. Shirley Schreier e Prof. Dr. Carlos Hotta pela discussão no exame de qualificação.

Aos meus orientadores de iniciação científica e mestrado, Prof. Dr. João Henrique Lago e Profa. Dra. Maria Teresa Machini por todo aprendizado.

Aos funcionários do IQ-USP por todo trabalho, em especial aos funcionários da secretaria de pós-graduação e as queridas Doris, Sandra, Ivone e Cris pelo carinho e conversas.

Ao CEPID-Redoxoma pelas reuniões e seminários sempre construtivos.

À FAPESP pela oportunidade de bolsa e financiamento do Projeto 2013/02195-3.

RESUMO

Carvalho, L.A.C. **Efeito pró-oxidante do hidroperóxido de urato sobre proteínas sensíveis às alterações redox: implicações na resposta inflamatória**, 2017. 150 p. Tese – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O hidroperóxido de urato (HOOU) é o produto da oxidação do ácido úrico por peroxidases. Sua produção é favorecida durante a inflamação e hiperuricemia, uma vez que há grande quantidade de ácido úrico, peroxidases inflamatórias e superóxido. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do hidroperóxido de urato sobre proteínas sensíveis à modulação redox em um ambiente inflamatório asséptico e outro que imita infecção. Assim, nesta tese comparou-se a estrutura química do HOOU obtido fotoquimicamente daquele obtido através da catálise enzimática pela mieloperoxidase. A obtenção do HOOU por foto-oxidação permitiu o melhor isolamento do composto. Este oxidante foi capaz de reagir especificamente com os aminoácidos contendo enxofre (metionina e cisteína). Neste sentido, foi investigada sua reatividade com tiol-peroxidases detoxificadoras de peróxido, a peroxiredoxina 1 e 2 (Prx1 e Prx2). O HOOU apresentou cinética rápida de reação com a Prx1, $k = 4,9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e Prx2, $k = 2,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, o que as torna um provável alvo celular, além disso, foi capaz de oxidar a Prx2 de eritrócitos humanos, mostrando ser capaz de atravessar a membrana plasmática. Além das Prxs, a albumina do soro também desempenha papel importante na homeostase redox. O HOOU foi capaz de oxidar a albumina com constante de velocidade de $0,2 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Outra tiol-proteína com importante função na homeostase e sinalização redox é a tioredoxina (Trx). A Trx foi oxidada pelo HOOU com constante de reação de

$2,8 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e foi liberada juntamente com a Prx1 e Prx2 das células de macrófagos humanos (linhagem THP-1) quando estas células foram incubadas com H₂O₂. A liberação dessas proteínas é reconhecidamente um sinal de estresse celular. Assim o H₂O₂ pode estar envolvido na exacerbação do estresse oxidativo em ambiente inflamatório. Quando neutrófilos (linhagem HL-60) e macrófagos humanos (linhagem THP-1) foram incubados na presença de ácido úrico e *Pseudomonas aeruginosa* houve uma diminuição na produção de ácido hipocloroso (HOCl). Isto se deveu à competição entre ácido úrico e cloreto pela mieloperoxidase e resultou em menor atividade microbida pelas células, demonstrando que a formação do H₂O₂ não contribui e, ao contrário, prejudica a atividade microbida das células inflamatórias. Dessa forma, a oxidação do ácido úrico e formação do hidróperóxido de urato tanto altera a atividade microbida das células inflamatórias, quanto leva à oxidação de tioproteínas importantes para manutenção da homeostase redox. Assim, o H₂O₂ pode ser o responsável pelos efeitos pró-oxidantes e pró-inflamatórios do ácido úrico solúvel, e isso indica que o papel antioxidante do ácido úrico deve ser revisto em situações de inflamação.

Palavras-chave: hidróperóxido de urato, oxidação, modulação redox, peroxiredoxinas, tioredoxina, albumina, ácido úrico, inflamação.

ABSTRACT

Carvalho, L.A.C. **Pro-oxidant effect of urate hydroperoxide on redox-sensitive proteins: implications on inflammatory response**. 2017. 150 p.
PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Urate hydroperoxide (HOOU) is the product of the oxidation of uric acid by peroxidases. The formation of HOOU is favored during inflammation and in hyperuricemia, where there is plenty amount of uric acid, inflammatory peroxidases and superoxide. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the effect of urate hydroperoxide on redox sensitive proteins in an inflammatory environment and another that mimics infection. In this thesis the chemical structure of the HOOU produced by photo-oxidation was compared to that obtained by myeloperoxidase catalysis. The chemical production of HOOU allowed a better purification of the compound. This oxidant was able to specifically react with sulfur containing amino acids (methionine and cysteine). In this sense, its reactivity with peroxiredoxins (Prx1 and Prx2) was investigated. HOOU reacted fast with Prx1 $k = 4.9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ and Prx2 $k = 2.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. In addition, HOOU was able to oxidize Prx2 from intact erythrocytes at the same extend as does hydrogen peroxide. Albumin is an important thiol-containing protein to redox homeostasis in plasma. HOOU was able to oxidize albumin with a rate constant of $0.2 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Another protein with important function in redox homeostasis is thioredoxin (Trx). Trx was oxidized by HOOU with a rate constant of $2.8 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ and was released together with Prx1 and Prx2 from human macrophages cells (THP-1 cell line) that were incubated with HOOU. The release of these proteins is a signal of

cellular stress. Thus, HOOU may be involved in the exacerbation of oxidative stress in inflammatory environments. When neutrophil (HL-60 cell line) and macrophages (THP-1 cell line) were incubated with uric acid and *Pseudomonas aeruginosa* there was a decrease in hypochlorous acid (HOCl) production because of the competition between chloride and uric acid by myeloperoxidase. It decreased HOCl and impaired the microbicidal activity of the cells, showing that HOOU does not contribute in bacteria clearance. Therefore, the oxidation of uric acid to urate hydroperoxide impairs microbicidal activity and oxidizes thiol-proteins in inflammatory cells contributing to a pro-oxidant status. In this context, the antioxidant role of uric acid in inflammatory response should be reviewed.

Keywords: urate hydroperoxide, oxidation, redox modulation, thiol proteins peroxiredoxins, thioredoxin, albumin, uric acid, inflammation

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina do soro bovino
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
dHL-60	Células HL-60 diferenciadas em neutrófilos
dTHP-1	Células THP-1 diferenciadas em macrófagos
DTNB	5,5-ditiobis(ácido 2-nitrobenzóico)
DTPA	Ácido dietilenotriamina penta acético
DTT	Ditiotreitol
EPM	Erro padrão da média
FOX	Ferrous oxidation xylenol orange
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
HSA	Albumina do soro humano
HOOU	Hidroperóxido de urato
IL-1 β	Interleucina 1 β
MPO	Mieloperoxidase
PBS	Tampão fosfato salino
PMA	12-miristato-13-acetato de forbol
Prx	Peroxiredoxina
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
Trx	Tioredoxina

APRESENTAÇÃO

Esta tese está dividida em quatro capítulos tendo como foco os efeitos do ácido úrico e seu intermediário hidroperóxido de urato sobre proteínas sensíveis à modulação redox com papel central na sinalização por peróxidos: as peroxiredoxinas e a tioredoxina. Avalia também o efeito do ácido úrico e a formação do hidroperóxido de urato sobre a capacidade microbicida de células THP-1 diferenciadas em macrófagos (dTHP-1) e HL-60 diferenciadas em neutrófilos (dHL-60).

- O **Capítulo I** compara a estrutura química do hidroperóxido de urato obtido por catálise enzimática, conforme ocorre *in vivo*, e o hidroperóxido de urato obtido quimicamente, o qual será utilizado em nossos estudos. Neste mesmo capítulo estudou-se a reatividade do hidroperóxido de urato sobre os aminoácidos cisteína e metionina.

- O **Capítulo II** analisa a cinética e o mecanismo da oxidação das peroxiredoxinas 1 e 2 pelo hidroperóxido de urato.

- O **Capítulo III** demonstra a oxidação das peroxiredoxinas 1 e 2 pelo hidroperóxido de urato em células dTHP-1 e investiga a cinética de reação com as proteínas tioredoxina e albumina.

- O **Capítulo IV** estuda a capacidade microbicida de células dTHP-1 e dHL-60 sobre a *Pseudomonas aeruginosa* na presença de ácido úrico, um ambiente propício para formação do hidroperóxido de urato.

Com isso, demonstra-se os efeitos do ácido úrico e da formação do hidroperóxido de urato em um sistema inflamatório e um que imita infecção, por meio da cinética com proteínas sensíveis à modulação redox, liberação de

citocinas, proteínas e produção de ácido hipocloroso, como resume o esquema a seguir.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	17
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1. Síntese química e quantificação do hidropéroxido de urato (HOOU) ..	23
3.2. Síntese do hidroperóxido de urato por catálise enzimática em sistema com mieloperoxidase/ superóxido/ peróxido de hidrogênio	24
3.3. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS)	24
3.4. Análise dos produtos formados após incubação dos aminoácidos metionina e cisteína com hidroperóxido de urato	25
3.5. Quantificação por cromatografia a gás e remoção da acetonitrila remanescente do hidroperóxido de urato por sistema a vácuo	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1. Caracterização do hidroperóxido de urato por Espectrometria de Massas (LC-MS/MS)	28
4.2. Quantificação por cromatografia a gás e remoção da acetonitrila remanescente por sistema a vácuo	31
4.3. Análise dos produtos formados após incubação dos aminoácidos metionina e cisteína com hidroperóxido de urato	33
CAPÍTULO II	37
1. INTRODUÇÃO	37
2. OBJETIVOS.....	45
3. MATERIAIS E MÉTODOS	46
3.1. Síntese, purificação e quantificação do hidroperóxido de urato	46
3.2. Quantificação do hidroperóxido de urato pelo ensaio modificado da oxidação do alaranjado de xilenol (FOX)	46
3.3. Expressão e purificação de peroxirredoxinas.....	46
3.4. Redução dos tióis e quantificação.....	48
3.5. Oxidação do Prx1 e Prx2 pelo hidroperóxido de urato	49
3.6. Cinética da oxidação de wtPrx1, Prx1C83SC173S e Prx2 por hidroperóxido de urato e peróxido de hidrogênio.....	49
3.7. Cinética de competição	51
3.8. Simulação cinética	51

3.9. Recuperação dos tióis de Prx após oxidação por hidroperóxido de urato.....	52
3.10. Oxidação de Prx2 em eritrócitos humanos.....	53
3.11. SDS-PAGE e <i>Western Blot</i>	54
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1. Oxidação de Prxs pelo hidroperóxido de urato	56
4.2. Determinação das constantes de velocidade para a reação do hidroperóxido de urato com Prxs	57
4.3. Análise da hiperoxidação de Prx por hidroperóxido de urato	71
4.4. Oxidação de Prx2 a partir de glóbulos vermelhos humanos por hidroperóxido de urato e peróxido de hidrogênio.....	73
CAPÍTULO III.....	77
1. INTRODUÇÃO	77
1.1. Albumina do soro humano (HSA).....	77
1.2. Tio redoxina	81
2. OBJETIVOS.....	87
3. MATERIAIS E MÉTODOS	88
3.1. Síntese química e quantificação do hidropéroxido de urato (HOOU)..	88
3.2. Transformação, expressão e purificação da proteína recombinante Trx1 humana e obtenção da albumina	88
3.3. Redução dos tióis da albumina e tio redoxina.....	90
3.4. Quantificação de tióis livres pelo ensaio de DTNB.....	90
3.5. Análise da oxidação dos tióis livres da albumina e tio redoxina pelo hidroperóxido de urato	91
3.6. Determinação da constante de velocidade do hidroperóxido de urato com a BSA e a tio redoxina	91
3.7. Cultura de células humanas.....	91
3.8. Incubação de células dTHP-1 com hidroperóxido de urato.....	92
3.9. Dosagem de proteínas	92
3.10. SDS-PAGE e <i>Western Blot</i>	92
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	94
4.1. Análise da oxidação dos tióis livres da albumina pelo hidroperóxido de urato	94
4.2. Determinação da velocidade de reação do hidroperóxido de urato com albumina	95

4.3. Oxidação de cisteínas da Trx1 pelo hidroperóxido de urato	96
4.4. Cinética de reação da Trx1 com o hidroperóxido de urato.....	97
4.5. Avaliação do estado de oxidação da Trx1, Prx1 e Prx2 na presença de hidroperóxido de urato	99
4.6. Avaliação do estado de oxidação da Prx1 e Prx2 na presença de ácido úrico	103
CAPÍTULO IV.....	106
1. INTRODUÇÃO	106
2. OBJETIVOS.....	114
3. MATERIAIS E MÉTODOS	115
3.1. Cultura de células humanas.....	115
3.2. Cultura de células bacterianas	116
3.3. Ensaio de <i>clearance</i> bacteriano na presença de dHL-60 e dTHP-1 .	116
3.4. Ensaio de viabilidade por LDH	117
3.5. Detecção de espécies oxidantes totais com a sonda fluorescente dihidrorodamina 123 (DHR).....	117
3.6. Avaliação da formação do ácido hipocloroso	117
3.7. Liberação de IL-1 β e TNF- α por dHL-60 e dTHP-1	118
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	119
4.1. O ácido úrico inibe a capacidade microbicida e diminui a liberação de citocinas por células dHL-60 e dTHP-1	119
4.2. Viabilidade celular na presença de ácido úrico e <i>P. aeruginosa</i>	121
4.3. Produção de espécies oxidantes por células dHL-60 na presença de <i>P. aeruginosa</i> e ácido úrico.....	122
5. CONCLUSÕES	128
6. REFERÊNCIAS.....	130

CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO DO HIDROPERÓXIDO DE URATO OBTIDO VIA CATÁLISE ENZIMÁTICA E VIA FOTOQUÍMICA

1. INTRODUÇÃO

O ácido úrico é o principal antioxidante presente no plasma humano responsável por quelar metais de transição e reagir com espécies oxidantes (BECKER *et al.*, 1993). Ao reagir com oxidantes de dois elétrons, o produto final gerado é a alantoína. Por outro lado, a oxidação de um elétron do ácido úrico, como por peroxidases, gera o intermediário radical livre de urato (MEOTTI *et al.*, 2011). O urato é o principal doador de elétrons para peroxidases no plasma humano (SAUTIN *et al.*, 2008). Além disso, ele reage de forma rápida com a mieloperoxidase (MPO) e a lactoperoxidase (LPO) e tem sido considerado um substrato fisiológico para ambas as enzimas (MEOTTI *et al.*, 2011, SEIDEL *et al.*, 2014). O radical livre de urato gerado pela MPO e LPO combina-se com o superóxido com uma constante de velocidade de $8 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para formar o hidropéroxido de urato (HOOU) (SANTUS *et al.*, 2001). A reação rápida mostra que este é um provável intermediário na oxidação do urato em condições inflamatórias, em que a combinação urato, peroxidases e superóxido está aumentada.

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima abundante em neutrófilos e catalisa a oxidação do cloreto pelo peróxido de hidrogênio formando ácido hipocloroso, um potente agente bactericida. Este mecanismo de catálise é denominado atividade clorinante da enzima como mostra a **Figura 01** (KLEBANOFF, 2005). A MPO possui também atividade clássica de peroxidase. Neste caso, o Composto I formado pela reação entre MPO e peróxido de

hidrogênio é reduzido por um segundo substrato. A transferência de um elétron deste substrato gera o intermediário Composto II da enzima, o qual necessita de um segundo elétron para que a enzima retorne ao seu estado nativo (WINTERBOURN E KETTLE, 2013) (**Figura 01**). Um estudo prévio do nosso grupo revelou que o Composto I catalisa a oxidação do urato com uma constante de velocidade de $4,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. O Composto II oxida o urato com constante de velocidade de $1,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Apesar do cloreto reagir com constante de velocidade inferior, ele continua sendo considerado o principal substrato para a enzima devido sua alta concentração (150 mM).

Figura 01. Ciclo catalítico da MPO. MP³⁺ representa a mieloperoxidase férrica, RH um substrato do ciclo de peroxidação, dentre eles o ácido úrico. R• é o radical produzido após oxidação do substrato RH (retirado de MEOTTI *et al.*, 2011).

A lactoperoxidase (LPO) é uma enzima encontrada nos fluidos secretados da via respiratória, saliva, leite e lágrimas. Catalisa a oxidação de dois elétrons do tiocianato pelo peróxido de hidrogênio, gerando hipotiocianato, um potente agente oxidante com função bactericida. Assim como a MPO, os intermediários do ciclo catalítico da LPO também são o Composto I e Composto II. O Composto I da LPO oxida o urato com uma constante de velocidade de $1,1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (SEIDEL *et al.*, 2014). Esta constante de

velocidade é a maior entre os demais substratos da LPO e mais alta do que a da MPO (SEIDEL *et al.*, 2014 e MEOTTI *et al.*, 2011). O Composto II da LPO oxida o urato com constante de velocidade de $8,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Além de poder ser formado via MPO e LPO, o hidropéroxido de urato também pode ser obtido pela fotooxidação da riboflavina (PATRICIO *et al.*, 2015 e CLAUSEN *et al.*, 2010). Neste sistema, a riboflavina irradiada por luz ultravioleta A (UVA, 365 nm) é fotoexcitada e capaz de transferir um elétron do urato (gerando radical livre de urato) ao oxigênio tripleto (gerando radical superóxido). A combinação do radical livre de urato e superóxido forma hidropéroxido de urato, que através desta reação pode ser obtido a concentrações próximas a 1 mM, quando utilizado 1,5 mM de urato, como mostra a **Figura 02**.

Figura 02. Esquema da formação de hidropéroxido de urato pelos sistemas enzimático e fotoinduzido (retirado de PATRICIO *et al.*, 2015).

Por ser um oxidante bastante reativo, é esperado que o hidroperóxido de urato gerado em ambiente inflamatório seja capaz de reagir com biomoléculas, depletando agentes redutores. Neste sentido, proteínas que contêm cisteínas são particularmente sensíveis ao hidroperóxido de urato e outros oxidantes. O potencial de redução da cisteína é $E^\circ(\text{CysS}^\bullet/\text{CysSH}) = 0,92 \text{ V}$ e $E^\circ(\text{CysSSCys}/\text{CysSH}) = -0,24 \text{ V}$ para um e dois elétrons, respectivamente (SURDHAR E ARMSTRONG, 1986; KEIRE *et al.*, 1992).

A oxidação de cisteínas em proteínas desempenha papel fundamental na sinalização redox, modulando fatores de transcrição, dinâmica de canais de membrana, atividade de enzimas e regulando sinalizações dependentes de cálcio e de fosforilação (WINTERBOURN E HAMPTON, 2008). Entre os diferentes produtos de oxidação, pode-se encontrar ácido sulfênico (RSOH), ligação do tipo dissulfeto (RSSR), ácido sulfínico (RSO_2H) e sulfônico (RSO_3H) (TORCHINSKY, 1981; GILES E JOCOB, 2002; PAGET E BUTTNER, 2003). O ácido sulfênico é formado pela oxidação por dois elétrons por oxidantes como peróxido de hidrogênio, peroxinitrito ou peróxidos orgânicos. O ácido sulfênico exibe reatividade tanto de nucleófilo quanto de eletrófilo e, conseqüentemente, pode reagir tanto com um tiol (RSH) e formar uma ponte dissulfeto ou com aminas (RNH_2) e formar sulfonaminas (RSNHR) (ALLISON *et al.*, 1976 e RAFTERY *et al.*, 2001), quanto reagir com outro ácido sulfênico e formar um tiosulfinato (RS(O)SR) (KICE E CLEVELAND, 1973; TORCHINSKY, 1981; CLAIBORNE *et al.*, 1993). Uma proteína contendo ácido sulfênico pode reagir também com a glutathiona (GSH), levando a formação de proteínas glutathioniladas (SALZANO *et al.*, 2014; GALLOGLY E MIEYAL, 2007). Dada sua alta reatividade, o ácido sulfênico é considerado um intermediário

transiente na oxidação de tióis, embora na ausência de tióis proximais, sua forma estabilizada já tenha sido relatada em proteínas (CARBALLAL *et al.*, 2003; CARBALLAL *et al.*, 2007, TURELL *et al.*, 2008).

Tendo em vista o importante papel de aminoácidos que contém enxofre na estrutura e função de proteínas e na detoxificação de oxidantes, este capítulo da tese avalia a capacidade oxidante do hidroperóxido de urato sobre a metionina e a cisteína. Inicialmente, foi necessária a obtenção do hidroperóxido de uma forma pura, bem como caracterizar estruturalmente o composto obtido por fotoxidação, a fim de verificar se o composto obtido quimicamente apresentava exatamente as mesmas características estruturais daquele obtido por catálise enzimática.

2. OBJETIVOS

Este capítulo tem por objetivo a confirmação da identidade do hidroperóxido de urato obtido quimicamente para posteriores estudos deste composto e o estudo isolado da reatividade do hidroperóxido de urato frente aos aminoácidos cisteína e metionina.

Objetivos específicos:

- Caracterizar por espectrometria de massas o hidroperóxido de urato obtido quimicamente e via enzimática;
- Quantificar e remover a acetonitrila utilizada na separação do hidroperóxido de urato por HPLC para obter o produto sem interferentes;
- Analisar os produtos formados pela reação do hidroperóxido de urato com os aminoácidos cisteína e metionina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Síntese química e quantificação do hidropéroxido de urato (HOOU)

O hidropéroxido de urato foi sintetizado segundo o método descrito por CLAUSEN *et al.* (2010) com algumas modificações. Para isso, foram preparadas soluções de urato (20 mM) em NaOH (40 mM) e riboflavina (500 μ M) em tampão fosfato (20 mM; pH = 6). A concentração final de urato e riboflavina foram de 1,5 e 0,1 mM, respectivamente. A reação foi realizada em tampão fosfato em placa de 6 poços exposta à radiação UV-A (365 nm; irradiador com 6 lâmpadas para UV-A; 15 mW e 2,2 mW/cm², Novatecnica Campinas- Brasil) a 20°C sob agitação contínua. Todas as soluções foram agitadas com Chelex (Sigma-Aldrich) durante pelo menos 1 h para remover quaisquer vestígios de íons metálicos. Os produtos da síntese foram separados em um sistema de CLAE (Shimatzu) com duas bombas LC-6AD, injetor manual CTO-10A, detector de absorbância UV SPD-20A, controlador de sistema CBM-20A conectado a um computador e software LC Solution. Os compostos foram eluídos utilizando uma coluna preparativa TSK-Gel amida-80 (10 μ m; 21,5 mm $\times$ 30 cm) (Tosoh Bioscience; Tóquio, Japão) e fase móvel acetato de amônio, 10 mM, pH = 6,8 (solvente A) e acetonitrila (solvente B) em modo isocrático, 60% do solvente B com fluxo 4 mL/min durante 30 min. Imediatamente antes da injeção, diluiu-se a reação em 60% de acetonitrila e injetou-se 7 mL no sistema de CLAE. O HOOU foi coletado e o excesso de acetonitrila evaporado com argônio (Ar). Para garantir a remoção máxima do solvente orgânico, utilizou-se um sistema equipado com um kitasato ligado a uma bomba a vácuo. A acetonitrila remanescente foi quantificada por cromatografia gasosa e

mostrou um máximo de 0,07%. Para quantificação do HOOU, utilizou-se o valor de coeficiente de extinção molar previamente determinado em nosso laboratório ($\lambda_{308\text{nm}} = 6.537 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$; PATRÍCIO *et al.*, 2015) aplicado à Lei de Lambert-Beer ($A = \epsilon.l.c$) e os valores foram corrigidos pelo ensaio de oxidação ferrosa do laranja de xilenol (FOX) como descrito anteriormente (PATRICIO *et al.*, 2015).

3.2. Síntese do hidroperóxido de urato por catálise enzimática em sistema com mieloperoxidase/ superóxido/ peróxido de hidrogênio

A síntese do hidroperóxido de urato pela mieloperoxidase, superóxido e peróxido de hidrogênio foi realizada incubando-se o urato (200 μM) com a mieloperoxidase (200 nM) em presença de um sistema gerador de superóxido (0,01 mg/mL xantina oxidase/10mM acetaldeído) em tampão fosfato 50 mM pH 7,4. A produção de superóxido pela xantina oxidase/acetaldeído foi monitorada pelo ensaio de redução do citocromo *c*. O volume e concentração final da xantina oxidase foi sempre ajustado para produzir 6 $\mu\text{M}/\text{min}$ de superóxido. Após 20 minutos a reação foi parada adicionando-se 60% de acetonitrila à reação.

3.3. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS)

Para análise comparativa entre o hidroperóxido de urato sintetizado por fotooxidação e por catálise enzimática, o padrão de fragmentação do hidroperóxido de urato foi monitorado através de um espectrômetro de massa AmazonSpeed (Bruker Corporation) acoplado a um sistema de CLAE (Shimadzu) com duas bombas LC-20A, injetor automático SIL-10AC, detector de absorvância UV SPD-20A, controlador de sistema CMB-20A conectado a

um computador e software CLASS-VP, versão 5.03. O padrão de fragmentação sequencial *tandem* foi realizado pela infusão direta de 1 μ L do sistema de reação de fotooxidação ou da reação enzimática. A separação cromatográfica foi feita em uma coluna TSK-Gel amida-80 (4,6 $\times$ 150 mm, partícula 3 μ m; Tosoh Bioscience; Tóquio, Japão) com uma mistura isocrática de acetato de amônio, 10 mM, pH = 6,8 (40%, solvente A) e acetonitrila (60%, solvente B) e fluxo de 0,2 mL/min. As amostras foram analisadas em modo negativo, usando monitoramento múltiplo de reação *multiple reaction monitoring* (MRM; m/z 199 $\rightarrow$ m/z 156 and m/z 199 $\rightarrow$ m/z 112,8 para o hidroperóxido de urato). Os parâmetros de ESI-MS foram ajustados como segue: CUR, 20 psi; CAD, médio; IS, 4500V; temperatura, 450°C; GS1, 55 psi; GS2, 40 psi; e EP, 10V. Os primeiros 5 min do eluente foram descartados e o eluente de 6-15 min foi direcionado à fonte eletrospray. Os dados foram processados através do software Bruker Compass DataAnalysis.

3.4. Análise dos produtos formados após incubação dos aminoácidos metionina e cisteína com hidroperóxido de urato

Os produtos de oxidação da metionina (300 μ M) ou cisteína (300 μ M) formados por concentração equimolar de hidroperóxido de urato foram separados e identificados em um sistema de HPLC Shimadzu (Tokio, Japão) acoplado a espectrômetro de massas Quattro II (Micromass, Altricham, Reino Unido). Os produtos foram separados em coluna TSK-gel amida-80 (4,6 $\times$ 150mm, 3 μ m) (Tosoh Bioscience, Tóquio, Japão). A fase móvel foi 10 mM de acetato de amônio pH 6,8 (solvente A) e acetonitrila (solvente B). A separação dos produtos de oxidação da metionina foi feita em gradiente linear de 85-10% de solvente B por 20 min, mantido por 10 min e então retornando as condições

iniciais por 2 min e reequilibrando por 8 min nas condições iniciais no fluxo de 0,8 mL/min. A separação dos produtos de oxidação da cisteína foi feita em gradiente linear de 65-10% de solvente B por 15 min, mantida por 10 min e então retornando as condições iniciais por 1 min e reequilibrando por 9 min no fluxo de 0,6 mL/min. As análises por espectrometria de massas foram feitas em fonte de ionização por eletrospray (ESI) em modo positivo usando modo *full scan* (50-300 m/z). Para os produtos de oxidação da metionina, a fonte e a temperatura de desolvatação foram 150 e 300°C respectivamente. As voltagens para o eletrospray foram 2,5 kV, 15V para o cone de amostra e 5V para o cone extrator. A energia de colisão foi 10 eV. Para os produtos de oxidação de cisteína, fonte e temperatura de dessolvatação foram 150 e 250°C, respectivamente. As voltagens foram 4 kV para eletrospray, 15 V para o cone de amostra e 5 V para o cone extrator. A energia de colisão foi 10 eV.

3.5. Quantificação por cromatografia a gás e remoção da acetonitrila remanescente do hidroperóxido de urato por sistema a vácuo

Para completa remoção da acetonitrila remanescente foi criado um sistema composto por uma bomba a vácuo conectada a um kitassato tampado com uma rolha. Para sua quantificação, foi utilizado um cromatógrafo a gás (CG) da Shimadzu, modelo GC-17A, equipado com coluna polar Simplicity-Wax (Polietilenoglicol) de 30 cm × 0,25 mm × 0,25 µm (capilar), injetor split/splitless, detector de ionização de chama (FID), formada por ar/H₂ e N₂ como gás de arraste. A temperatura do injetor e do detector foi 210°C, vazão 1,4 mL/min, split de 1:200 com tempo de corrida de 3 min e *n*-butanol como padrão interno.

Foi realizada uma curva padrão com acetonitrila e sua quantificação foi realizada corrigindo-se o valor com o padrão interno.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização do hidroperóxido de urato por Espectrometria de Massas (LC-MS/MS)

Para utilização do hidroperóxido de urato obtido fotoquimicamente foi necessário confirmar se o produto final era exatamente o mesmo obtido biologicamente através de catálise enzimática. Para isso, utilizou-se cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS). O hidroperóxido de urato obtido a partir da reação de fotooxidação apresentou os íons produtos da fragmentação do composto com m/z 199 (m/z 199 $\rightarrow$ 181; 199 $\rightarrow$ 156; 199 $\rightarrow$ 139; 199 $\rightarrow$ 112,8; 199 $\rightarrow$ 87), semelhantes ao obtido pela síntese enzimática (m/z 199 $\rightarrow$ 181; 199 $\rightarrow$ 156; 199 $\rightarrow$ 139; 199 $\rightarrow$ 111 ou 113; 199 $\rightarrow$ 87). A fragmentação subsequente dos íons: m/z 181; 156 e 112,8 (MS3), todos oriundos do mesmo produto com m/z 199, é apresentada na **Figura 03**. Ambas as reações também foram injetadas em uma coluna de separação cromatográfica e os íons produtos da fragmentação do composto m/z 199 foram monitorados simultaneamente através de MRM (*multiple reaction monitoring*). A **Figura 04** mostra o monitoramento do íon m/z 199 $\rightarrow$ 156 e m/z 199 $\rightarrow$ 112,8.

Figura 03. Espectrometria de massas em sequência do hidroperóxido de urato. O hidroperóxido de urato foi obtido pela reação do urato com a mieloperoxidase na presença de superóxido e peróxido de hidrogênio (A-C) ou por irradiação UV do urato na presença de riboflavina e oxigênio (D-F). A reação total (5 μ L) foi diretamente injetada por infusão no espectrômetro de massas. Os picos representam o espectro de produtos (MS³) gerados por fragmentação dos íons m/z 181, 156 e 112,8, todos gerados a partir do íon m/z 199.

Figura 04. Análise por MRM (*multiple reaction monitoring*) do produto de oxidação do urato obtido por fotooxidação ou pela mieloperoxidase (MPO). São apresentados os picos do cromatograma do produto de transição de massa m/z 199 $\rightarrow$ 156 e m/z 199 $\rightarrow$ 112,8 para a reação enzimática (A e C) e fotoquímica (B e D). A mistura de reação (10 μ L) foi injetada em uma coluna TSK-Gel amida-80 e a análise de MRM foi feita utilizando fragmentação de massa em sequência. Os cromatogramas são representativos de três experimentos independentes.

A obtenção do hidróperóxido de urato por fotoquímica apresenta vantagens em relação à via enzimática, dentre elas a maior concentração de produto formado, o menor custo de reagentes e nenhuma interferência dos sistemas enzimáticos e seus subprodutos. Para a confirmação da identidade dos produtos das sínteses, a caracterização do padrão de fragmentação por espectrometria de massas, é uma ferramenta útil. A identificação de um produto com íon massa $[M-H]^-$ (m/z) 199 que tem exatamente o mesmo padrão de fragmentação a partir de fontes de obtenção diferentes, caracterizam que o composto produzido é exatamente o mesmo, e não um segundo produto com mesma massa. A injeção de ambas as reações em um espectrômetro de massas de captura iônica em sequência, tornou possível a análise dos íons produtos da reação e os íons produtos de fragmentações sequenciais, com

obtenção de massas MS3. Ao injetar o hidropéroxido de urato purificado e obtido a partir da reação de fotooxidação, os íons produtos da fragmentação do composto com m/z 199 foram muito semelhantes aos obtidos para a síntese enzimática, estes resultados sugerem que o produto da oxidação do urato pela MPO, o hidropéroxido de urato, tem exatamente a mesma estrutura química do hidropéroxido de urato sintetizado através da reação de fotooxidação.

Além dos dados obtidos através da infusão direta do hidropéroxido de urato, ambas as reações foram injetadas em uma coluna de separação cromatográfica e os íons produtos da fragmentação do composto m/z 199 foram monitorados simultaneamente através de MRM (*multiple reaction monitoring*). Esta técnica corrobora na identificação dos produtos formados nos dois diferentes modelos de oxidação do urato, pois, sendo o mesmo produto, com as mesmas características químicas, deverão reter na coluna cromatográfica com a mesma afinidade. Tanto o produto de oxidação obtido pela catálise enzimática pela MPO, quanto o obtido através de fotooxidação tiveram o mesmo tempo de retenção, assinalando que estes produtos têm, de fato, as mesmas características químicas.

4.2 Quantificação por cromatografia a gás e remoção da acetonitrila remanescente por sistema a vácuo

Apesar de apresentar vantagens em relação à síntese via enzimática, a obtenção através da fotoquímica requer uma etapa de separação em sistema cromatográfico e, por isso, a fase móvel acetonitrila (60%) deve ser removida para evitar interferência nos ensaios. A acetonitrila remanescente na amostra após secagem com gás inerte foi quantificada por cromatografia a gás, revelando cerca de 4-7% deste solvente na amostra. O cromatograma obtido

encontra-se na **Figura 05A**, o primeiro pico com tempo de retenção em 2,0 min é relativo à acetonitrila e o segundo pico em 2,5 min ao padrão interno, *n*-butanol. Após a secagem com gás inerte em gelo, seguida da utilização de um sistema a vácuo por 5 min a temperatura ambiente, foi feita nova quantificação, restando apenas cerca de 0,07%, sendo o pico em 2,0 min referente à acetonitrila e o pico em 2,5 min ao padrão interno **Figura 05B**. Neste sentido, a utilização do sistema a vácuo e sua quantificação posterior tornou possível a obtenção do hidroperóxido de urato sem grande contaminação com solvente orgânico.

FIGURA 05: CONTINUA NA PÁGINA SEGUINTE

Figura 05. Cromatograma representativo obtido por CG. (A) Amostra contendo hidroperóxido de urato após a secagem com gás inerte. (B) Amostra contendo hidroperóxido de urato após a secagem com gás inerte em gelo e posterior remoção da acetonitrila residual por sistema à vácuo por 5 min a temperatura ambiente. O experimento foi realizado em triplicata.

4.3 Análise dos produtos formados após incubação dos aminoácidos metionina e cisteína com hidroperóxido de urato

Uma vez obtido o hidroperóxido de urato sem maiores interferentes, optou-se por estudar os produtos de oxidação com os aminoácidos metionina e cisteína, dada suas relevâncias biológicas. Quando o hidroperóxido de urato foi incubado com a metionina, houve uma mudança no comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$ 308 $\rightarrow$ 304 nm), indicando a redução do hidroperóxido ao álcool correspondente, o hidroxiisourato (PATRICIO *et al.*, 2015). Os produtos de reação foram identificados por LC-MS/MS. O produto de oxidação eluiu em 12 min e a metionina restante que não foi oxidada em 9,8 min (**Figura 05A, painel de cima**). O produto com tempo de retenção de 12 min apresentou uma razão m/z $[M+H]^+$ de 166 Da, que corresponde ao aumento de 16 Da na

metionina devido a incorporação de um oxigênio na molécula, sendo o sulfóxido de metionina. O espectro MS/MS está representado na **Figura 06A**, painel de baixo. Foram gerados os fragmentos m/z $[M+H]^+$ 149, 102 e 74, de acordo com a **Tabela 01**.

A incubação de uma concentração equimolar da cisteína com o hidroperóxido de urato consumiu completamente a cisteína para gerar um produto oxidado que eluiu em 11,6 min (**Figura 06B**). O produto de oxidação apresentou m/z $[M+H]^+$ de 241 Da, que corresponde à cistina. O espectro de MS/MS desse produto gerou uma série de fragmentos apresentados na **Tabela 01** e **Figura 06B**, painel de baixo.

Tabela 01. Produtos de fragmentação do sulfóxido de metionina e cistina.

Estrutura	Tempo de retenção (min)	$[M+H]^+$ (m/z)	Íons produtos (m/z)
12	166	149 $[M+H- NH_3]^+$ 102 $[M+H- CH_4SO]^+$ 74 $[M+H- C_3H_8SO]^+$
11.6	241	195 $[M+H- H_2O+CO]^+$ 178 $[M+H- H_2O+CO+NH_3]^+$ 154 $[M+H- C_3H_5NO_2]^+$ 152 $[M+H- C_3H_5NO_2+2H]^+$ 122 $[M+H- C_3H_5NSO_2]^+$ 120 $[M+H- C_3H_5NSO_2+2H]^+$

Figura 06. Produtos de oxidação do hidropéroxido de urato com metionina e cisteína. Cromatograma total de íons (TIC) e padrão de fragmentação dos produtos de oxidação da metionina (A) e cisteína (B), gerados pela incubação de concentrações equimolares entre os aminoácidos e o hidropéroxido de urato (300 μ M).

Tendo em vista que os aminoácidos cisteína e metionina estão presentes em proteínas sensíveis a modulação redox e que são prontamente oxidados pelo H₂O₂, torna-se importante estudar os produtos formados a partir desta oxidação para uma previsão do efeito em proteínas.

Atualmente é bem aceito que metabólitos da redução incompleta do oxigênio participam ativamente de vias de sinalização. Neste sentido, resíduos de cisteína e metionina são alvos preferenciais para oxidação em proteínas devido ao seu caráter nucleofílico (muito mais acentuado na cisteína). A oxidação de metionina em proteínas pode levar a formação de sulfóxido de metionina ou dehidrometionina (PESKIN *et al.*, 2009); já a oxidação de cisteínas leva à formação de ácido sulfênico e, dependendo da concentração do oxidante no meio, pode levar à formação de ponte dissulfeto (baixos níveis de oxidante) ou à superoxidação, gerando ácido sulfínico, sulfônico ou tiosulfatos (altos níveis de oxidante) (KLOMSIRI *et al.*, 2011). Dessa forma, os dados obtidos para a oxidação da metionina ao sulfóxido de metionina são consistentes com a literatura (PESKIN *et al.*, 2009; O'HAIR *et al.*, 1999 e IGNASIAK *et al.*, 2011), bem como a formação do dímero cistina quando a cisteína é oxidada (STEILL *et al.*, 2011; LIOE *et al.*, 2007a e LIOE *et al.*, 2007b). De fato, já foi demonstrado que espécies reativas provenientes da mieloperoxidase são capazes de oxidar a metionina e tióis (PESKIN *et al.*, 2009), levando à alteração de proteínas.

CAPÍTULO II

O HIDROPERÓXIDO DE URATO OXIDA A PEROXIREDOXINA 1 E PEROXIREDOXINA 2 HUMANAS

1. INTRODUÇÃO

As peroxiredoxinas (Prxs) foram inicialmente descritas em leveduras em 1987 e chamadas TSA (*thiol specific antioxidant*). Atualmente é bem aceito que são proteínas ubíquas distribuídas em diversos organismos como bactérias, leveduras e mamíferos, sendo altamente conservadas (RHEE, 2016). A classificação, localização e sítio ativo das Prxs estão mostradas na **Tabela 02**. As Prxs 2-Cys típicas contêm duas cisteínas conservadas, a cisteína peroxidásica (C_P) e a de resolução (C_R). A C_P reage com o oxidante formando $C_P\text{-SOH}$ (ácido sulfênico) que em seguida reage com a C_R de outra subunidade gerando um homodímero unido por ponte dissulfeto. Curiosamente nas Prxs 2-Cys típicas existe uma separação exata de 121 resíduos de aminoácidos entre a C_P e a C_R (WOOD *et al.*, 2003).

As Prxs 2-Cys reduzem os peróxidos pelo mecanismo de reação nucleofílica bimolecular (S_N2) sem a geração de intermediários estáveis. Neste mecanismo, o tiolato (-S^-) da C_P ataca um átomo de oxigênio do peróxido, levando a clivagem heterolítica da ligação O-O. No caso do peróxido de hidrogênio esta clivagem leva a formação de água, no caso de hidroperóxidos orgânicos, leva a formação do álcool correspondente. O tiolato é então oxidado a ácido sulfênico (-SOH) que, no caso da Prxs 2-Cys típicas, se condensa com a C_R (-SH) de outra Prx formando um dissulfeto e liberando uma molécula de água (HALL *et al.*, 2010). Para ocorrer a ligação dissulfeto e formação do dímero, são necessárias alterações conformacionais na estrutura da enzima. Ela deve passar de seu estado totalmente enovelado, *Fully Folded* (FF) para o

seu estado localmente desenovelado, *Locally Unfolded* (LU) em que ocorre o desenovelamento de uma porção da α -hélice da C_P. Esta alteração permite que C_P se aproxime da C_R para que ocorra a condensação (WOOD *et al.*, 2003).

Tabela 02. Classificação, localização e sítio ativo das peroxiredoxinas de humanos (WOOD *et al.*, 2003; Bayer, 2015).

	Prx1	Prx2	Prx3	Prx4	Prx5	Prx6
Classe	2-Cys típica	2-Cys típica	2-Cys típica	2-Cys típica	2-Cys atípica	1-Cys
Localização celular	Citossol e núcleo	Citossol, núcleo e membrana	Mitocôndria	Retículo endoplasmático e extracelular	Peroxisomo, mitocôndria, núcleo e citossol	Citossol
Sítio ativo	Cys52 e Cys173	Cys51 e Cys172	Cys108 e Cys229	Cys124 e Cys245	Cys100 e Cys204	Cys47

A formação de ponte dissulfeto é o passo limitante nesta reação e pode ser superada por uma oxidação adicional no ácido sulfênico se a concentração de peróxido for suficiente para esta competição (WOOD *et al.*, 2003; HALL *et al.*, 2009; PESKIN *et al.*, 2013; KARPLUS *et al.*, 2015). A hiperoxidação da Prx na forma de ácido sulfínico ou sulfônico limita significativamente o *turnover* da enzima. A ligação dissulfeto no homodímero pode ser reduzida pelo sistema de tiorredoxina-tiorredoxina redutase (Trx-TrxR; Rhe, 2012) ou pela glutarredoxina (HANSCHMANN *et al.*, 2010). Em contraste, a forma hiperoxidada só pode ser reduzida pela sulfirredoxina (Srx), um processo mais lento que consome ATP (WOO *et al.*, 2005; JEONG *et al.*, 2006), como mostra a **Figura 07**.

Foi demonstrado que as Prxs são capazes de reagir com peróxidos de alquila e peroxinitrito com constantes de velocidade elevadas como 10^7 - 10^8 M⁻¹.s⁻¹ (FERRER-SUETA *et al.*, 2011). Além disso, baseado em modelos cinéticos, acredita-se que as Prxs sejam responsáveis por reagir com mais de 90% do peróxido de hidrogênio celular (ADIMORA *et al.*, 2010; COX *et al.*, 2010).

Figura 07. Ciclo catalítico das Prxs 2-Cys típicas. 1) O tiolato da Prx é oxidado ao ácido sulfênico, ocorre alteração conformacional na enzima e 2) formação de ponte dissulfeto com o tiol da C_R e liberação de uma molécula de água, 3) o dímero pode ser reduzido pelo sistema da Trx/TrxR, que retorna a enzima em sua forma inicial totalmente enovelada. 4) Alternativamente, em altas concentrações de oxidante, o ácido sulfênico formado no passo 1, pode reagir com o oxidante e ser hiperoxidado ao ácido sulfínico ou sulfônico e 5) reduzido pelo sistema da Srx (Retirado de HALL *et al.*, 2010).

As Prxs se destacam de outras enzimas que contém grupos tiólicos pela alta reatividade com o peróxido de hidrogênio. O sítio ativo destas enzimas está na porção N-terminal de uma α -hélice e contém a C_P , um resíduo de Thr (ou Ser) presente no motivo universal das Prxs **PXXXT/SXXC** e um resíduo de Arg altamente conservado que fica próximo espacialmente (KARPLUS E HALL, 2007; WOOD *et al.*, 2003). A Cys, a Thr e a Arg formam a chamada tríade catalítica, como mostra a **Figura 08** (FLOHÉ *et al.*, 2011; FOURQUET *et al.*, 2008; RHEE *et al.*, 2005). Foi demonstrado que a Thr e a Arg realizam interações polares que direcionam e aumentam a eletrofilicidade do peróxido, além de tornarem C_P desprotonada como mostra a **Figura 09** (FERRER-SUETA *et al.*, 2011). De fato, a maioria das enzimas contendo tiol estão protonadas (-SH) em pH fisiológico, atingindo um pKa próximo a 8,5, igual ao da Cys livre (FERRER-SUETA *et al.*, 2011; HALL *et al.*, 2010 e OGUSUCU *et*

al., 2007). No caso das Prxs, a C_P encontra-se desprotonada ($-S^-$), com pKa próximo a 5,4 e, por isso, mais suscetível à oxidação (KARPLUS e HALL 2007).

Figura 08. Interações no sítio ativo das Peroxiredoxinas. Representação do sítio ativo. As interações que estabilizam átomos chave do esqueleto e os quatro resíduos conservados, e com o substrato ROOH são indicadas. No estado de transição, forma-se uma ligação entre o átomo S da Cys peroxidásica (C_P) e o oxigênio O_A do substrato ROOH e uma ligação está quebrando entre os átomos O_A e O_B de ROOH. A geometria do sítio local ativo aparece bem configurada para estabilizar a maior distância entre os átomos O_A e O_B à medida que a ligação é quebrada (Retirado de HALL *et al.*, 2010).

Figura 09. Mecanismo de reação de Peroxiredoxinas com peróxidos. A) Encontro do peróxido com o sítio ativo da Prx, B) Mudança de ligações de hidrogênio do tiolato para o substrato aumentando a nucleofilicidade do tiolato e promovendo o ataque no oxigênio distal, C) Clivagem da ligação do peróxido e estabilização do grupo de partida pelo resíduo de arginina (Retirado de FERRER-SUETTA *et al.*, 2011).

Entre as Prxs 2-Cys típicas destacam-se as isoformas presentes no citossol e núcleo, as Prx1 e Prx2. Elas partilham 91% de similaridade e 78% de identidade nas suas sequências de aminoácidos (LEE *et al.*, 2007). Apesar das semelhanças, a Prx1 tem quatro resíduos de cisteína (Cys52, Cys71, Cys83 e Cys173) enquanto a Prx2 tem três (Cys51, Cys70 e Cys172) como mostra a **Figura 10**. Esta única diferença fornece funções exclusivas. Foi sugerido que a Prx1 poderia ser mais susceptível à hiperoxidação pelo peróxido de hidrogênio, o que lhe confere uma atividade de chaperona mais eficiente do que Prx2. A mutação da Cys83 resulta em mudança dramática na função Prx1, que se torna mais semelhante ao Prx2 (LEE *et al.*, 2007). Camundongos nocautes para Prx1 ou Prx2 também apresentam fenótipos diferentes. A deleção de Prx1 causou uma proliferação celular descontrolada e desenvolvimento de tumores (NEUMANN *et al.*, 2003). Já a remoção de Prx2 resultou em esplenomegalia, mostrando um papel essencial para Prx2 na manutenção da vida de eritrócitos (LEE *et al.*, 2003). Além disso, um estudo revelou que os níveis relativos de expressão de mRNA de Prx1 são significativamente mais elevados do que os níveis das outras cinco Prxs de mamífero em tecidos bovinos (LEYENS *et al.*, 2003). Ambas as Prxs podem ser encontradas no núcleo (ISHII *et al.*, 2012), mas apenas Prx2 é abundante nos eritrócitos e pode estar presente na membrana celular (MATTE *et al.*, 2014). Suas proteínas de interação também são diferentes. Até o momento foram descritas 18 proteínas de interação para a Prx1 e 12 proteínas de interação para a Prx2. Estas proteínas de ligação incluem receptores, quinases, fatores de transcrição, proteínas de membrana e sensíveis à modulação redox. Entre estes parceiros, apenas 3 são comuns a ambas: Trx1, histona desacetilase 6 e a isomerase PIN1 (BERTOLDI, 2016).

A interação das Prxs com diferentes proteínas as permite desempenhar papel importante no meio celular. Podem estar envolvidas nos processos inflamatórios de três maneiras, como: 1) citoprotetoras por neutralizar os oxidantes gerados na inflamação; 2) moduladoras da sinalização redox por reagir rapidamente com peróxidos e transmitir seus equivalentes oxidados a outras proteínas redox sensíveis; 3) atuar como PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Pattern*) e DAMPs (*Danger Associated Molecular Pattern*) para regular a inflamação através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) (KNOOPS *et al.*, 2016). Dessa forma, além de seu papel bem conhecido de antioxidante, as Prxs estão emergindo como proteínas sinalizadoras.

Figura 10. Alinhamento das sequências de aminoácidos das Prx1 e Prx2 humanas. De forma interessante, o aminoácido na posição 24 da Prx1 está faltando na Prx2. Além das Cys peroxidásica e de resolução, outra Cys70/71 também é compartilhada entre estas Prxs, mas uma quarta Cys83 é única para a Prx1. Estão marcados resíduos idênticos (*), fortes (:) ou fracos (.) Os resíduos de aminoácidos localizados na provável interface dímero-dímero estão sublinhados. (Retirado de LEE *et al.*, 2007).

Na tentativa de explicar um papel de sinalização, o modelo *Floodgate* propõe que a alta concentração de peróxido de hidrogênio seja capaz de hiperoxidar as Prxs de forma a inativá-las e permitir que o próprio peróxido de hidrogênio seja capaz de oxidar diretamente proteínas sinalizadoras. No entanto, a existência de uma enzima especializada em reduzir Prx hiperoxidada (BITEAU *et al.*, 2003), coloca em dúvida a relevância deste mecanismo. Atualmente este conceito está mudando e acredita-se em um papel mais direto desempenhado pelas Prxs do que apenas sua inativação.

Neste sentido, foi demonstrado que a Prx1 pode transferir seus equivalentes oxidantes para a ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*), resultando na ativação da apoptose (JARVIS *et al.*, 2012). Este modelo foi chamado de modelo do sinal de peroxidase ou troca de dissulfeto (JARVIS *et al.*, 2012). A Prx1 também foi capaz de regular a atividade da via da Akt (proteína quinase B; CAO *et al.*, 2009) e da MAPK p38 (*mitogen-activated protein kinase*; TURNER-IVEY *et al.*, 2013). Enquanto o modelo *Floodgate* previa que a deleção de qualquer Prx deveria aumentar a sinalização do H_2O_2 , já que teria o mesmo efeito de inativá-las por hiperoxidação, foi demonstrado que alterar a expressão de Prx1 e Prx2 teve efeitos diferentes. A ativação da ASK1 induzida pelo H_2O_2 foi inibida pela diminuição da expressão de Prx1 e aumento de expressão de Prx2 (JARVIS *et al.*, 2012). Além de este resultado estar em desacordo com o modelo *Floodgate*, ele também evidencia papéis distintos para a Prx1 e a Prx2 no citossol.

Recentemente, de acordo com o modelo do sinal de peroxidase, Sobotta e colaboradores mostraram que a Prx2 é capaz de formar uma ponte dissulfeto mista com a STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*), inibindo

o fator de transcrição (SOBOTTA *et al.*, 2015). Da mesma forma, a Prx4 é capaz de oxidar ativamente a PDI (proteína dissulfeto isomerase) via formação de um intermediário dissulfeto (ZITO *et al.*, 2010).

Além da sinalização intracelular, estas enzimas realizam também sinalização extracelular, uma vez que são liberadas das células em processos inflamatórios. Neste sentido, pacientes com aterosclerose apresentaram níveis elevados de Prx1 e Trx1 no plasma em comparação ao grupo controle (MADRIGAL-MATUTE *et al.*, 2015). Além disso, foi demonstrado que a Prx do *Plasmodium berghei* pode agir como PAMP por se ligar ao receptor *toll-like* de macrófagos e desencadear uma resposta pró-inflamatória (FURUTA *et al.*, 2008). Também foi descrito que a liberação de Prx via exossomal após exposição das células a LPS ou TNF- α pode agir como DAMP e desencadear resposta inflamatória (MULLEN *et al.*, 2015; RIDDELL *et al.*, 2010; SALZANO *et al.*, 2014; SHICHITA *et al.*, 2012). Assim, se um determinado evento celular promover a oxidação destas cisteínas, ele provavelmente será capaz de provocar a liberação das enzimas. De fato, a incubação com o oxidante menadiona provocou a liberação das mesmas, bem como o sinal inflamatório TNF- α (MULLEN *et al.*, 2015).

Tendo em vista a importância das Prxs para a homeostase e sinalização redox, investigou-se a cinética e o mecanismo de oxidação da Prx1 e Prx2 pelo hidróperóxido de urato. As constantes de reação obtidas indicam que estas proteínas podem ser alvos preferenciais do hidróperóxido de urato nas células. Além disso, a liberação das Prxs de células pode indicar um papel pró-inflamatório para o hidróperóxido de urato.

2. OBJETIVOS

Este capítulo tem como objetivo o estudo da cinética e mecanismo de oxidação da peroxiredoxina 1 e 2 humanas pelo hidroperóxido de urato e o efeito do mesmo na Prx2 de eritrócitos humanos.

Objetivos específicos:

- Determinação das constantes de reação do hidroperóxido de urato com as peroxiredoxinas 1 e 2;
- Estudo do mecanismo de oxidação das Prx1 e Prx2 pelo hidroperóxido de urato por simulação computacional e pela análise da formação de dissulfeto/hiperoxidação das peroxiredoxinas 1 e 2 pelo hidroperóxido de urato;
- Oxidação da Prx2 de eritrócitos humanos pelo hidroperóxido de urato;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Síntese, purificação e quantificação do hidroperóxido de urato

A síntese do hidroperóxido de urato foi realizada como descrito anteriormente no Capítulo I, item 3.1. A concentração de soluções estoque de H_2O_2 foi determinada espectrofotometricamente a 240 nm ($\epsilon_{240\text{nm}} = 43,6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

3.2. Quantificação do hidroperóxido de urato pelo ensaio modificado da oxidação do alaranjado de xilenol (FOX)

Tendo em vista que o hidroperóxido de urato isolado pode conter seu produto reduzido hidroxisourato e este absorve também em 308 nm, optou-se por utilizar o ensaio modificado da oxidação do alaranjado de xilenol, do inglês *ferrous oxidation xylenol orange* – FOX (WINTERBOURN *et al.*, 2004; WOLFF, 1994), que detecta apenas o hidroperóxido de urato e não o hidroxisourato. 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.

3.3. Expressão e purificação de peroxirredoxinas

Para a expressão da proteína recombinante, o plasmídeo pET17b (hPrx1) e pET28a (hPrx2) com resistência a ampicilina contendo o cDNA para a proteína humana foi colocado em uma cubeta de eletroporação juntamente com a bactéria eletrocompetente *Escherichia coli* BL21. A cubeta foi submetida

a um pulso de voltagem no eletroporador *Gene Pulser II Electroporation System* (Bio-Rad Laboratories), ajustado em 2,5 kV de voltagem e 25 μ F de capacitância. Após o pulso de voltagem, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio LB e deixadas sob agitação a 37°C por 1 h. Depois desse tempo, as células foram plaqueadas em meio ágar LB seletivo com ampicilina e incubadas *overnight* a 37°C, para o crescimento das bactérias transformadas com o vetor.

No dia seguinte, as bactérias transformadas que cresceram, foram inoculadas em 50 mL de meio LB/Ampicilina e crescidas *overnight* a 37°C. No dia seguinte, as células foram diluídas em 1 L de meio LB/Ampicilina para a $OD_{600nm} = 0,2$. Quando atingiram a $OD_{600nm} = 0,6$, o meio foi suplementado com IPTG 1mM e deixado por mais 3h sob agitação para a indução do gene clonado. Após este procedimento, as células foram recolhidas por centrifugação e ressuspensas em tampão de amostra (Tris-HCl 50 mM pH 8,8, NaCl 100 mM e imidazol 10 mM com adição de 0,1 mM de PMSF para inibir a degradação por proteases). As células foram então submetidas a ciclos de sonicação por 20 segundos (em um tempo total de 5 min) no aparelho *Branson Digital Sonifier 450* (Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, Connecticut, USA), seguidos de 40 segundos de descanso em gelo. Depois da lise, adicionou-se sulfato de estreptomicina 1% para precipitação do material genético. Após 20 min de agitação no gelo, as células foram centrifugadas (15000 rpm, 45 min, 4°C) e o sobrenadante foi recolhido e utilizado para a purificação da proteína de interesse.

A purificação da Prx1 selvagem (wt) e mutante C83SC173S foi realizada de acordo com o método descrito anteriormente (ENGELMAN *et al.*, 2013) com

pequenas modificações. As proteínas foram separadas em coluna MonoQ de troca aniônica (GE Healthcare) acoplada ao FPLC (AKTA, GE Healthcare, General Electric Co., Chalfont St. Giles, Reino Unido) com o coletor automático Frac-900. O gradiente de fase móvel variou de 0 a 500 mM de NaCl. Purificou-se a Prx2 contendo cauda de histidina utilizando uma coluna HisTrap HP cobalto (GE Healthcare) e uma bomba peristáltica P1 (GE Healthcare, General Electric Co., Chalfont St. Giles, Reino Unido). O tampão de amostra continha Tris-HCl 50 mM pH 8,8, NaCl 100 mM e imidazol 10 mM e o tampão de eluição 50 mM Tris-HCl pH 8,8, NaCl 100 mM e gradiente de imidazol 10-500 mM. As frações recolhidas foram analisadas por SDS-PAGE para avaliar o grau de pureza da proteína. As frações com maior grau de pureza foram reunidas e concentradas com um Amico Ultra 10 kDa (Millipore Corporate). Para a remoção da cauda de His, a protease Factor Xa (Promega) foi utilizada no tampão de reação recomendado (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4 e NaCl 0,1 M) a 4°C *overnight*. A concentração de proteína foi determinada pelo ensaio de Bradford (Bradford, 1976). Os plasmídeos da Prx1 foram obtidos com o Dr. Moran Behar e os da Prx2 com a Dra. Christine C. Winterbourn.

3.4. Redução dos tióis e quantificação

As proteínas foram tratadas com DTT (excesso de 3 vezes/ tiol) em tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM e ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA) 100 µM durante 2 h a 37°C. O excesso de DTT foi removido por centrifugação em filtro Amico Ultra 10 kDa (Merk Millipore, Darmstadt, Alemanha). As soluções de proteína foram armazenadas em atmosfera livre de oxigênio. Para quantificar os grupos tiol livres, incubaram-se 5 µM de proteína com 10 µL de DTNB 10 mM, 2 µL de SDS a

20% e tampão de glicina (100 mM, pH 8,5) até um volume final de 120 μ L durante 15 minutos. O produto amarelo, 2-nitro-5-tiobenzoato, foi monitorizado a 412 nm ($412 \text{ nm} = 14.150 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) (RIDDLES *et al.*, 1979). As proteínas foram utilizadas apenas quando a quantidade de tióis livres estava entre 3 - 4 tióis / proteína em wtPrx1; 1 - 2 tióis / proteína em C83SC173S Prx1 e 2 - 3 tióis / proteína em Prx2.

3.5. Oxidação do Prx1 e Prx2 pelo hidroperóxido de urato

Prx1 (2 μ M, $3,7 \mu\text{molSH} \times \mu\text{mol de proteína}^{-1}$) e Prx2 (2 μ M, $2,3 \mu\text{molSH} \times \mu\text{mol de proteína}^{-1}$) foram incubadas em tampão de fosfato de sódio 50 mM (pH 7,4) com concentrações crescentes de hidroperóxido de urato (2, 5, 10, 20, 50 e 100 μ M) à temperatura ambiente durante 5 min. Após 10 min, adicionou-se 30 mM N-etilmaleimida (NEM) para bloquear quaisquer tióis remanescentes. O monômero (22 kDa) de proteína e o dímero (44 kDa) foram separados por SDS-PAGE não redutor.

3.6. Cinética da oxidação de wtPrx1, Prx1C83SC173S e Prx2 por hidroperóxido de urato e peróxido de hidrogênio

A oxidação das enzimas 2-Cys Prx foi acompanhada por alterações intrínsecas de fluorescência (TRUJILLO *et al.*, 2007; TAIRUM *et al.*, 2016; WINTERBOURN e PESKIN, 2016 e PARSONAGE *et al.*, 2015). As proteínas pré-reduzidas (5 μ M wtPrx1 $\sim 3,5 \mu\text{molSH} \times \mu\text{mol proteína}^{-1}$; 5 μ M C83SC173S Prx1 $\sim 1,5 \mu\text{molSH} \times \mu\text{mol proteína}^{-1}$; 2 μ M Prx2 $\sim 2,5 \mu\text{molSH} \times \mu\text{mol proteína}^{-1}$) diluídas em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4 e 100 μ M de DTPA foram misturadas com concentrações crescentes de hidroperóxido de urato ou peróxido de hidrogênio em um fluorímetro de fluxo interrompido (*Stopped-flow*, Applied Photophysics SX18MV, Leatherhead, Reino Unido), utilizando-se

comprimento de onda de excitação $\lambda = 280$ nm e emissão acima de 320nm. As reações foram realizadas a 21°C em tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,4, contendo 100 μ M de DTPA). A solução tampão foi previamente tratada com 10 mg/mL de catalase para remover qualquer vestígio de peróxido de hidrogênio. Utilizou-se um excesso de hidroperóxido de urato (condição de pseudo-primeira ordem) para seguir as reações com hidroperóxido de urato.

As constantes de velocidade observadas (k_{obs}) para a diminuição e o aumento da fluorescência foram determinadas ajustando os dados a uma exponencial simples. Os tempos foram ajustados de 2 a 20 ms para Prx2 e de 2 a 200 ms para Prx1 no caso da queda rápida da fluorescência e de 5 a 25 s para Prx2 e de 0,05 a 0,6 s para Prx1 para o retorno da fluorescência.

Pelo fato do decaimento da fluorescência da Prx1C83SC173S ter sido seguido por um segundo decaimento mais lento, os k_{obs} para esta enzima foram melhor ajustados em uma exponencial simples com ajuste linear para o segundo decaimento.

Os valores de k_{obs} obtidos a partir do decaimento da fluorescência foram plotados contra a concentração de hidroperóxido de urato e a constante de velocidade de segunda ordem foi calculada a partir da inclinação deste ajuste linear. O gráfico da concentração de hidroperóxido de urato *versus* os k_{obs} do aumento da intensidade de fluorescência foi melhor ajustado usando uma equação hiperbólica.

Para a reação entre Prx1 e peróxido de hidrogênio, foram utilizadas concentrações sub-estequiométricas de peróxido de hidrogênio para calcular as velocidades iniciais. O decaimento da fluorescência da proteína foi monitorado ao longo do tempo. Assumindo que a fluorescência inicial (V) corresponde à

quantidade total de proteína reduzida (PrxSH), dividiu-se a fluorescência (V) pela concentração de proteína (5 μM). Para ajustar a concentração de proteína em função do tempo, menos de 10% do consumo de proteína foi tomado, permitindo um cálculo de velocidade inicial adequado. As velocidades iniciais foram graficadas contra as concentrações de peróxido de hidrogênio para obter a constante de velocidade da segunda ordem.

3.7. Cinética de competição

A cinética de competição foi realizada para confirmar a constante de velocidade para a reação de Prx1 com peróxido de hidrogênio (OGUSUCU *et al.*, 2007 e TOLEDO *et al.*, 2011). Resumidamente, incubou-se uma concentração sub-estequiométrica de peróxido de hidrogênio (4 μM) com a peroxidase de raiz forte (horseradish, HRP, 8 μM) na ausência ou presença de Prx1 (2, 4, 6, 8 e 12 μM) em tampão fosfato 50 mM pH 7,4, com 100 μM de DTPA, a 22°C. O composto I foi monitorado a 398 nm e o k_{Prx1} foi determinado conforme a Eq. 1. A fração de inibição (F) foi calculada para cada concentração de Prx1 e a k_{HRP} utilizada foi descrita anteriormente $1,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (TOLEDO *et al.*, 2011). O $(F / 1-F) k_{\text{HRP}} [\text{HRP}]$ foi plotado contra a concentração de Prx1 e a constante de velocidade de segunda ordem foi calculada a partir da inclinação.

$$\left(\frac{F}{1-F}\right) k_{\text{HRP}} [\text{HRP}] = k_{\text{Prx1}} [\text{Prx1}] \text{ Eq. 1}$$

3.8. Simulação cinética

As simulações cinéticas foram realizadas com o software Gepasi 3.30 (<http://www.gepasi.org>) (MENDES, 1997). Os dados de fluorescência para as reações de Prx2 (2 μM) com hidroperóxido de urato (10, 15, 20 e 33 μM); Prx1 (5 μM) com hidroperóxido de urato (37,5; 50; 60 e 70 μM) e Prx1 (5 μM) com

peróxido de hidrogênio (2,5 μM) foram inseridos no GEPASI e modelados utilizando uma função que descreve dois modelos cinéticos distintos de três ($A + B \leftrightarrow C \rightarrow D \rightarrow E$) ou dois passos ($A + B \rightarrow C \rightarrow D$). As constantes de velocidade de reação foram permitidas flutuar. A adequação dos dados foi determinada por χ^2 .

A conversão de fluorescência para concentração foi feita pela soma (F) da contribuição individual de fluorescência de todas as espécies envolvidas na reação (PrxSH, PrxSHOOU, PrxSOH e PrxSSPrx). Para este propósito, foi utilizada a seguinte equação: $F = a \times A + c \times C + d \times D + e \times E$ para o modelo 1 e $F = a \times A + d \times D + e \times E$ para o modelo 2, em que A, C, D e E são as concentrações de PrxSH, PrxSHOOU, PrxSOH e PrxSSPrx; e *a*, *c*, *d* e *e* são as respectivas constantes de proporcionalidade. As constantes de proporcionalidade *a* e *e* foram determinadas pela relação entre a concentração das espécies A e E e a fluorescência inicial e final, respectivamente, assumindo que apenas a espécie reduzida PrxSH e o dímero PrxSSPrx estavam presentes. As constantes de proporcionalidade *c* e *d* foram determinadas pelo ajuste dos dados no GEPASI, permitindo que esses valores pudessem variar de acordo com as constantes de velocidade.

3.9. Recuperação dos tióis de Prx após oxidação por hidroperóxido de urato

Prx1 (2 μM , $\sim 3,5 \mu\text{molSH} \times \mu\text{mol proteína}^{-1}$) e Prx2 (2 μM , $\sim 2,3 \mu\text{molSH} \times \mu\text{mol proteína}^{-1}$) foram incubadas em tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,4) com hidroperóxido de urato 220 μM à temperatura ambiente durante 10 min. Em seguida, incubou-se um excesso de 3 vezes de DTT / tiol durante 2 h a 37°C. O excesso de DTT foi removido por um filtro Amico Ultra 10 kDa (Merk

Millipore, Darmstadt, Alemanha). Os tióis livres foram quantificados pelo ensaio DTNB como descrito anteriormente.

Para verificar se poderia haver hiperoxidação, foram incubadas Prx1 (5 μM , 3,2 $\mu\text{molSH} \times \text{proteína}^{-1}$) e Prx2 (5 μM , 2,0 $\mu\text{molSH} \times \text{proteína}^{-1}$) com 0,2 ou 2 mM de peróxido de hidrogênio ou 0,025-0,8 mM de hidroperóxido de urato em 50 mM de fosfato de sódio (pH 7,4) durante 5 min a temperatura ambiente. As amostras foram analisadas por gel de poliacrilamida 12% com SDS, não redutor. As proteínas foram transferidas para uma membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF) (BioRad) e incubadas com um anticorpo para Prx-SO_{2/3} (ab16951, 1: 2000, Abcam, Cambrigde, Reino Unido). Foi utilizado um anticorpo secundário conjugado a HRP (PI2000, Vector Laboratories, Califórnia, EUA) para detectar a quimioluminescência. As bandas foram visualizadas por exposição a filmes fotográficos (GE Healthcare). A densitometria relativa foi avaliada utilizando o software ImageJ.

3.10. Oxidação de Prx2 em eritrócitos humanos

O sangue de voluntários saudáveis foi retirado em tubos a vácuo contendo EDTA. Após a remoção do plasma, os eritrócitos foram lavados 3 vezes com tampão fosfato salino (PBS, fosfato 10 mM em NaCl 137 mM e KCl 2,7 mM, pH 7,4). O número de eritrócitos foi determinado utilizando uma câmara de Neubauer. Os eritrócitos (1×10^7) foram incubados com 200 μM de peróxido de hidrogênio ou hidroperóxido de urato em 100 μL de PBS contendo 5 mM de glicose a 37°C durante 10 min em microtubos. A capacidade hemolítica do peróxido de hidrogênio e do hidroperóxido de urato foi avaliada pela intensidade de absorbância na absorção máxima de hemoglobina $\lambda = 405$

nm. Utilizou-se como controle positivo de hemólise a intensidade de absorbância de uma amostra contendo 0,1% de SDS.

3.11. SDS-PAGE e *Western Blot*

Para análise da proteína purificada e para realização de *Western blot*, foi preparado um gel de poliacrilamida 12% e aplicado 2-10 µg de proteína purificada ou 100 µg de extrato celular. A corrida foi realizada a 200V por 1h. No caso do gel, o mesmo foi corado *overnight* sob agitação com Comassie Blue (BioRad) e depois descorado até a visualização de bandas nítidas.

Para o *Western Blot*, o sobrenadante em tampão fosfato salino com glicose (PBS, fosfato 10 mM em NaCl 137 mM e KCl 2,7 mM, 5 mM glicose, pH 7,4) contendo 30 mM de NEM (N-etilmaleimida) foi recolhido e concentrado por *Speed Vac*. As células foram tratadas com tampão de lise RIPA gelado (Tris 10 mM pH7,5, NaCl 150 mM, NP40 1%, SDS 0,1%, deoxicolato de sódio 1%, EDTA 5 mM, EGTA 5mM, NaF 25 mM e Na₂VO₄ 1 mM) contendo 30 mM de N-etilmaleimida (NEM) e mistura de inibidores de proteases na concentração sugerida pelo fornecedor (Roche). As proteínas foram quantificadas e separadas por SDS-PAGE (gel 12%) e então transferidas para uma membrana de PVDF e incubadas sob agitação por 2 h com solução de bloqueio (BioRad). Após este tempo, a membrana foi lavada com tampão fosfato contendo 0,1% de tween-20 e incubada *overnight* com o anticorpo primário (anti-Prx2, 1:2000, Abcam). No dia seguinte, a membrana foi novamente lavada e incubada durante 1 h com o anticorpo secundário (anti-mouse, 1:1000, Sigma Aldrich, MO, EUA). Em seguida a membrana foi lavada e procedeu-se a revelação das bandas por exposição a filmes fotográficos (GE Healthcare). Para realização do controle da quantidade de proteína aplicada no gel, utilizou-se a α -tubulina

(1:10000, Sigma). A densitometria relativa foi avaliada utilizando o software ImageJ.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Oxidação de Prxs pelo hidroperóxido de urato

O hidroperóxido de urato é um oxidante gerado pela oxidação de um elétron do ácido úrico seguido da adição de superóxido (MEOTTI *et al.*, 2011; SEIDEL *et al.*, 2014; PATRÍCIO *et al.*, 2015). Peroxidasas inflamatórias oxidam rapidamente o ácido úrico na presença de peróxido de hidrogênio (MEOTTI *et al.*, 2011 e SEIDEL *et al.*, 2014). Portanto, é possível esperar uma quantidade substancial de hidroperóxido de urato em ambientes inflamatórios, principalmente no tecido vascular, onde se acumula urato. O hidroperóxido de urato pode ser reduzido pela glutatona e metionina (PATRÍCIO *et al.*, 2015). No entanto, ele pode reagir muito mais rápido com tióis catalíticos em proteínas. Inicialmente, verificou-se a oxidação da Prx1 e Prx2 pelo hidroperóxido de urato através da conversão das enzimas em dímeros unidos por ligação dissulfeto. As enzimas foram incubadas com diferentes concentrações de hidroperóxido de urato e a conversão de monômeros (22 kDa) em dímeros (44 kDa) foi avaliada por SDS-PAGE não redutor. Uma concentração equimolar de hidroperóxido de urato e Prx foi suficiente para converter quase todos os monômeros em dímeros (**Figura 11**).

Figura 11. Oxidação da Prx1 e Prx2 pelo hidroperóxido de urato. Prx1 (2 μM , 3,2 $\mu\text{molSH} \times \mu\text{mol proteína}^{-1}$) e Prx2 (2 μM , 2,0 $\mu\text{molSH} \times \mu\text{mol proteína}^{-1}$) foram incubadas em tampão fosfato 50 mM (pH 7,4) com 0, 2, 5, 10, 20, 50 e

100 μM de hidropéroxido de urato por 5 min a temperatura ambiente. Após a incubação, foi adicionado 30 mM de N-etilmaleimida (NEM) para prevenir oxidação adicional. Os monômeros e dímeros da proteína foram separados em gel SDS-PAGE não redutor. Estes resultados são representativos de três experimentos independentes.

4.2. Determinação das constantes de velocidade para a reação do hidropéroxido de urato com Prxs

Em seguida, calculou-se as constantes de velocidade de reação de ambas Prx pelo hidropéroxido de urato. Para este fim utilizou-se as alterações de fluorescência intrínseca da proteína que ocorrem mediante a oxidação das mesmas (TRUJILLO *et al.*, 2007; WINTERBOURN E PESKIN 2016; PARSONAGE *et al.*, 2015). Conforme descrito anteriormente para a 2-Cys Prx típica (TAIRUM *et al.*; 2016; WINTERBOURNE e PESKIN 2016; PARSONAGE *et al.*; 2015), observou-se um perfil de alteração de fluorescência de duas fases, sendo uma diminuição rápida e um subsequente aumento mais lento da intensidade de fluorescência. O gráfico representativo da reação com a Prx2 está apresentado na **Figura 12A**. Inicialmente, o primeiro decaimento rápido foi ajustado por uma equação exponencial simples (**Figura 12B e 13A**). As constantes de velocidade observadas para a primeira fase rápida foram linearmente dependentes da concentração de hidropéroxido de urato e as constantes de velocidade de segunda ordem determinadas foram $k_1 = 2,26 \pm 0,13 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para Prx2 (**Figura 12C**) e $k_1 = 4,90 \pm 0,47 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para Prx1 (**Figura 13B**). O ajuste linear de k_{obs} versus a concentração de hidropéroxido de urato mostrou um intercepto claramente maior que zero para a Prx2, indicando que a primeira fase, para esta enzima, é reversível. Os valores do intercepto (k_{-1}) foram de $99,0 \pm 3,0 \text{ s}^{-1}$ para Prx2 (**Figura 12C**). O primeiro decaimento de fluorescência rápido para a Prx2 (**Figura 12B**) foi

seguido por um decaimento linear de fluorescência (inserto na **Figura 12B**). Para a Prx1, nenhuma diminuição linear lenta foi identificada e o ajuste linear do k_{obs} versus concentração de hidroperóxido de urato apresentou um intercepto perto de zero, $1,47 \pm 2,12 \text{ s}^{-1}$ (**Figura 13B**).

Ao contrário da primeira fase, as velocidades observadas (k_{obs}) da segunda fase se estabilizam com concentrações crescentes de hidroperóxido de urato (**Figura 12E, Figura 13D**). O gráfico de k_{obs} versus a concentração do substrato foi bem ajustado por uma equação hiperbólica de Michaelis-Menten. As constantes de velocidade calculadas (k_3) foram de $0,31 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$ para Prx2 (**Figura 12D e 12E**) e $14,9 \pm 1,01 \text{ s}^{-1}$ para Prx1 (**Figura 13C e 13D**).

De acordo com um modelo de três etapas relatado para a oxidação de AhpC pelo peróxido de hidrogênio (WOOD *et al.*, 2003), o primeiro decaimento rápido da fluorescência corresponderia à ligação da enzima ao substrato peróxido e à oxidação da cisteína peroxidásica. Assim, k_1 representa a formação do complexo enzima-substrato, enquanto a dissociação do complexo é representada por k_{-1} . O aumento lento da fluorescência representaria a formação de ligação dissulfeto. Para confirmar que o aumento de fluorescência foi devido à formação de dissulfeto também em Prxs humana, utilizou-se um duplo mutante de Prx1 em que a cisteína de resolução (C173) e a cisteína não catalítica (C83) foram substituídas por serina (C83SC173S Prx1). Como esperado, após oxidação por hidroperóxido de urato, a fluorescência intrínseca deste mutante apresentou um rápido declínio, mas não apresentou o aumento de fluorescência esperado para formação de dissulfeto (**Figura 13E**), indicando que o aumento na fluorescência observado em wtPrx1 é devido à formação de ligação dissulfeto.

O decaimento da fluorescência para Prx1C83SC173S apresentou uma característica semelhante à de wtPrx1 e as k_{obs} aumentaram linearmente com concentrações crescentes de hidroperóxido de urato (**Figura 13E**). No entanto, a constante de velocidade de segunda ordem (k_1) para esta reação foi uma ordem de grandeza menor ($4,50 \pm 0,18 \times 10^4 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$, **Figura 13F**) para C83SC173S Prx1 do que para a wtPrx1 e o k_{-1} foi $0,44 \pm 0,04 \text{ s}^{-1}$.

De acordo com os dados obtidos para a Prx1 C83SC173S, vale ressaltar que pequenas mudanças estruturais em Prxs causam alterações profundas na cinética. Descobriu-se que a mutação da cisteína de resolução em Prx1 diminuiu a constante de velocidade da reação com hidroperóxido de urato mais do que dez vezes. As Prxs nativas estão em equilíbrio entre as formas totalmente enovelada (FF) e localmente desenovelada (LU). A forma FF é a transição conformacional que reage primeiro com peróxido de hidrogênio. Um estudo prévio mostrou que a única mutação da cisteína de resolução favorece a conformação de LU e diminui o desempenho catalítico de Prx (PERKINS *et al.*, 2013).

De forma bastante relevante, não foram observadas alterações na fluorescência de Prx na ausência de oxidantes ou quando os tióis de Prxs foram alquilados com N-etil maleimida (NEM) (**Figura 14**). A cinética de reação do hidroperóxido de urato com Prx2 recombinante que apresentava cauda de His ou com aquela em que a cauda havia sido removida foi muito semelhante entre si: $2,26 \pm 0,13 \times 10^6 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ e $1,80 \pm 0,12 \times 10^6 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ para a primeira fase. O intercepto y (k_{-1}) foi $99,0 \pm 3,0$ e $43,0 \pm 1,2 \text{ s}^{-1}$ e $k_3 = 0,31 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$ e $0,38 \pm 0,03 \text{ s}^{-1}$, respectivamente (dados não apresentados).

A **B** **C** **D** **E**

Figura 12. Cinética de oxidação da Prx2 pelo hidroperóxido de urato. (A) Prx2 pré-reduzida ($2\ \mu\text{M}$, $2,0\ \mu\text{molSH} \times \mu\text{mol proteína}^{-1}$) foi incubada com $20\ \mu\text{M}$ de hidroperóxido de urato em tampão fosfato de sódio $50\ \text{mM}$ ($\text{pH}\ 7,4$, 22°C). As reações foram monitoradas ao longo do tempo pela variação da fluorescência intrínseca da proteína ($\lambda_{\text{ex}} = 280\ \text{nm}$, filtro de emissão $> 320\ \text{nm}$) em fluorímetro de fluxo interrompido. (B) A primeira fase rápida da reação de Prx2 ($2\ \mu\text{M}$) com $20\ \mu\text{M}$ de hidroperóxido de urato. As constantes de velocidade observadas (k_{obs}) foram calculadas por equação exponencial simples. (C) k_{obs} da primeira fase rápida da reação de Prx2 *versus* concentração de hidroperóxido de urato. A constante de velocidade da segunda ordem foi calculada a partir desta inclinação. (D) A fluorescência aumenta durante a fase lenta da reação de Prx2 ($2\ \mu\text{M}$) com $20\ \mu\text{M}$ de hidroperóxido de urato. As constantes de velocidade observadas (k_{obs}) foram calculadas pelo crescimento exponencial simples. (E) k_{obs} da fase lenta da reação de Prx2 *versus* concentração de hidroperóxido de urato. V: voltagem.

Figura 13. Cinética de oxidação da wtPrx1 e C83SC173S Prx1 pelo hidropéroxido de urato. (A) Primeira fase rápida da reação de Prx1 pré-reduzida (5 μ M, 3,5 μ molSH $\times$ μ mol de proteína⁻¹) incubado com 35 μ M de hidropéroxido de urato em tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,4; 22 °C). As reações foram monitoradas ao longo do tempo pela variação da fluorescência intrínseca da proteína (λ_{ex} = 280 nm, filtro de emissão > 320 nm) em fluorímetro de fluxo interrompido. As constantes de velocidade observadas (k_{obs}) foram calculadas por decaimento exponencial simples. (B) k_{obs} da primeira reação de fase rápida de Prx1 *versus* concentração de hidropéroxido de urato. A constante de velocidade de segunda ordem foi calculada a partir desta inclinação. (C) A fluorescência aumenta durante a fase lenta da reação de Prx1 (5 μ M) com 240 μ M de hidropéroxido de urato. As constantes de velocidade observadas (k_{obs}) foram calculadas pelo crescimento exponencial simples. (D) k_{obs} da fase lenta da reação de Prx1 *versus* hidropéroxido de urato. A curva não linear foi ajustada a uma equação hiperbólica. (E) Primeira fase rápida da reação de C83SC173S Prx1 pré-reduzida (5 μ M, 1,5 μ molSH $\times$ μ mol de proteína⁻¹) incubada com 65 μ M de hidropéroxido de urato em tampão de fosfato de sódio 50 mM (pH 7,4; 22 °C). As constantes de velocidade observadas (k_{obs}) foram calculadas por equação exponencial simples com ajuste linear para a segunda queda lenta. (F) k_{obs} da primeira fase rápida da reação de Prx1 *versus* concentração de hidropéroxido de urato. V: voltagem.

Figura 14. A oxidação do tiol é necessária para alteração de fluorescência na Prx. (A) Prx1 pré-reduzida (5 μ M), (B) Prx1 C83SC173S (5 μ M) e (C) Prx2 pré-reduzida em tampão fosfato de sódio (pH 7,4; 22°C) (D) Prx2 (2 μ M) foi alquilada com 10mM de NEM e então incubada com 30 μ M de hidroperóxido de urato. A variação na fluorescência intrínseca da proteína (Ex= 280 nm, emissão filtro > 320nm) foi monitorada em fluorímetro de fluxo interrompido. V: voltagem.

A constante de velocidade de segunda ordem para a reação de Prx2 com hidroperóxido de urato foi apenas uma a duas ordens de magnitude menor do que com peróxido de hidrogênio $0,2 - 1,3 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (COX *et al.*; 2009 e MANTA *et al.*; 2009), mostrando que Prx2 pode ser um alvo fisiológico para hidroperóxido de urato.

Não há constante de velocidade relatada para a reação de Prx1 humana e peróxido de hidrogênio, portanto, decidiu-se calculá-la. A reação de Prx1 com peróxido de hidrogênio foi mais rápida do que com o hidroperóxido de urato,

por isso utilizou-se concentrações sub-estequiométricas de substrato e empregou-se uma abordagem de velocidade inicial. Ao plotar as velocidades iniciais *versus* a concentração de peróxido de hidrogênio, a constante de velocidade da segunda ordem foi de $3,80 \pm 0,15 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (**Figura 15A**). O gráfico linear interceptou o eixo *y* em $4,42 \pm 1,85 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. O retorno da fluorescência após a mistura de Prx1 com peróxido de hidrogênio seguiu uma cinética de primeira ordem e foi independente da concentração de peróxido de hidrogênio. O k_{obs} desta etapa foi $9,0 \pm 0,2 \text{ s}^{-1}$ (**Figura 15B**), que é muito semelhante ao calculado quando o substrato era hidroperóxido de urato ($14,9 \pm 1,01 \text{ s}^{-1}$, **Figura 13D**). A natureza independente do peróxido nesta constante de velocidade é evidência adicional de que o retorno em fluorescência é devido a uma formação de ligação dissulfeto com a cisteína de resolução em vez de hiperoxidação.

Determinou-se também a constante de velocidade de segunda ordem para a reação de Prx1 e peróxido de hidrogênio usando o ensaio de competição HRP (Eq. 1). Com esta abordagem, a constante de velocidade de segunda ordem determinada foi $3,5 \pm 0,1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (**Figura 15C e 15D**), que é muito semelhante à obtida por fluorescência e à constante de velocidade de segunda ordem reportada para a reação de Prx2 com peróxido de hidrogênio (COX *et al.*, 2009 e MANTA *et al.*, 2009).

Figura 15. Cinética de oxidação da Prx1 pelo peróxido de hidrogênio. A Prx1 (5 μM, 3,5 μmolSH × μmol proteína⁻¹) pré-reduzida foi incubada com concentrações sub-estequiométrica de peróxido de hidrogênio (0,1 - 2,5 μM) em tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,4; 22°C). A reação foi monitorada ao longo do tempo pela variação da fluorescência intrínseca da proteína (λ_{ex} = 280 nm, filtro de emissão > 320 nm) em fluorímetro de fluxo interrompido. (A) As velocidades iniciais foram calculadas a partir da do decaimento linear de fluorescência com o máximo de 10% de enzimas oxidadas. Estas velocidades iniciais foram plotadas contra a concentração de peróxido de hidrogênio. (B) As constantes de velocidade observadas (*k*_{obs}) para o aumento da fluorescência na fase lenta da reação de Prx1 (5 μM) com peróxido de hidrogênio (2 - 30 μM) foram calculadas por uma equação exponencial simples e representadas graficamente em relação às concentrações de peróxido de hidrogênio. (C) Cinética de competição por HRP para a oxidação de Prx1 pelo peróxido de hidrogênio. A peroxidase HRP (8 μM) foi incubada com concentração sub-estequiométrica de peróxido de hidrogênio (4 μM) em tampão fosfato 50 mM (pH 7,4; 22°C) contendo 100 μM de DTPA. A inibição na formação do composto I foi dependente da concentração de Prx1 (Prx1 pré-reduzida aproximadamente 3,1 μmolSH × μmol proteína⁻¹). (D) Diagrama linear de (F/F₀)*k*_{HRP}[HRP] versus [Prx1] (inclinação = *k*_{Prx1} = 3,5 ± 0,10 × 10⁷ M⁻¹.s⁻¹). Cada barra representa a média ± erro padrão de três experimentos. V: voltagem.

Dessa forma, observou-se que a Prx1 é claramente mais eficiente em reduzir o peróxido de hidrogênio do que o volumoso hidroperóxido de urato. A constante de velocidade de reação foi duas ordens de magnitude maior para o peróxido de hidrogênio ($3,8 \pm 0,15 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) do que para o hidroperóxido de urato ($4,90 \pm 0,47 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Os resultados mostram que a constante de velocidade reação de segunda ordem do peróxido de hidrogênio é muito similar entre Prx1, Prx2 ($0,2 - 1,3 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (COX *et al.*, 2009; MANTA *et al.*, 2009), AhpC (PARSONAGE *et al.*, 2015) e Tsa1 (TAIRUM *et al.*, 2016).

Para caracterizar o mecanismo de reação da Prx com hidroperóxido de urato (HOOU), ajustou-se os dados experimentais em dois modelos, um de três etapas ($A + B \leftrightarrow C \rightarrow D \rightarrow E$) e um de duas etapas ($A + B \rightarrow C \rightarrow D$) (modelos 1 e 2) pelo software GEPASI. A diferença entre os modelos é que no modelo 1, assume-se que antes da oxidação do tiolato ao ácido sulfênico, há formação de um complexo Prx-HOOU, fornecendo uma constante k_1 . Após esta etapa, ambos os modelos convergem para a oxidação do tiolato ao ácido sulfênico e formação de ponte dissulfeto entre duas Prxs com a liberação de uma molécula de água.

Modelo 1:

Modelo 2:

Um melhor ajuste com os dados experimentais foi obtido com o modelo de três etapas (modelo 1) para Prx2 (**Figura 16A e 16B**). Este modelo permitiu

o cálculo da constante de reação da oxidação do tiol a ácido sulfênico (k_2) (**Tabela 03**).

Em contraste, ambos os modelos se ajustaram bem para a Prx1, usando tanto o hidroperóxido de urato (**Figura 16C e 16D**) quanto o peróxido de hidrogênio (**Figura 16E e 16F, Tabela 05**). Apesar de nenhuma diferença entre os dois modelos ter sido detectada para a Prx1, a constante de velocidade para a primeira reação rápida entre Prx1 e hidroperóxido de urato coincidiu melhor com os dados experimentais quando ajustado para o modelo 1 (**Tabela 04**).

De acordo com os valores obtidos para k_1 e k_{-1} , foram calculadas as constantes de dissociação K_d ($K_d = k_{-1}/k_1$). Para a Prx2 com o HOOU a constante de dissociação foi de $4,3 \times 10^{-5}$ M, para a Prx1 com o HOOU foi $3,0 \times 10^{-6}$ M e para a Prx1 com o H_2O_2 foi $1,2 \times 10^{-7}$ M.

Figura 16. Ajuste das variações de fluorescência de Prx durante a reação com hidroperóxido de urato ou peróxido de hidrogênio simulado como modelo 1 (A, C, E) ou modelo 2 (B, D, F).. Utilizou-se GEPASI (3.0) para realizar a simulação e o ajuste dos dados experimentais (linha preta) e simulados (linha vermelha). Os ajustes representam as reações entre 2 μM Prx2 e 33 μM de hidroperóxido de urato (A, B); Prx1 5 μM e 37,5 μM de hidroperóxido de urato (C, D); Prx1 5 μM e 2,5 μM de peróxido de hidrogênio (E, F).

Tabela 03. Resumo das constantes de velocidade experimentais e simuladas para Modelo 01 (três etapas) e Modelo 02 (duas etapas) para a reação de Prx2 (2 μM) com HOOH.

	Modelo	$k_1 (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	$k_{-1} (\text{s}^{-1})$	$k_2 (\text{s}^{-1})$	$k_3 (\text{s}^{-1})$	χ^2
Dados experimentais		$(2,26 \pm 0,13) \times 10^6$	$99,0 \pm 3,0$	$1,02 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,01$	-
10 μM	1	$(6,40 \pm 0,21) \times 10^6$	$469,3 \pm 448,6$	$0,36 \pm 0,79$	$0,39 \pm 0,01$	$0,38 \pm 0,02$
	2	$(8,50 \pm 0,40) \times 10^3$	-	-	$0,17 \pm 0,01$	$0,49 \pm 0,03$
15 μM	1	$(8,98 \pm 7,60) \times 10^5$	$277,4 \pm 243,8$	$1,46 \pm 0,08$	$0,43 \pm 0,01$	$0,40 \pm 0,01$
	2	$(8,74 \pm 0,16) \times 10^3$	-	-	$0,23 \pm 0,01$	$1,12 \pm 0,02$
20 μM	1	$(9,43 \pm 0,01) \times 10^5$	$102,0 \pm 8,9$	$2,87 \pm 410$	$0,41 \pm 0,03$	$0,22 \pm 0,02$
	2	$(1,14 \pm 0,18) \times 10^4$	-	-	$0,12 \pm 0,01$	$0,25 \pm 0,02$
33 μM	1	$(1,20 \pm 0,22) \times 10^6$	$101,0 \pm 7,8$	$0,64 \pm 0,12$	$0,39 \pm 0,07$	$1,22 \pm 0,16$
	2	$(2,80 \pm 0,02) \times 10^4$	-	-	$0,41 \pm 0,01$	$17,70 \pm 0,06$

Tabela 04. Resumo das constantes de velocidade experimentais e simuladas para Modelo 01 (três etapas) e Modelo 02 (duas etapas) para a reação de Prx1 (5 μM) com HOOU

	Modelo	$k_1 (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	$k_{-1} (\text{s}^{-1})$	$k_2 (\text{s}^{-1})$	$k_3 (\text{s}^{-1})$	χ^2
Dados experimentais		$(4,90 \pm 0,47) \times 10^5$	$1,47 \pm 2,12$	-	$14,9 \pm 1,01$	-
37.5 μM	1	$(2,12 \pm 1,26) \times 10^5$	$51,7 \pm 15,3$	$10,5 \pm 7,1$	$10,5 \pm 0,2$	$0,91 \pm 0,02$
	2	$(3,33 \pm 0,01) \times 10^4$	-	-	$9,35 \pm 0,05$	$0,70 \pm 0,02$
50 μM	1	$(1,77 \pm 0,79) \times 10^5$	$0,4 \pm 1,50$	$1,82 \pm 0,69$	$33,26 \pm 7,75$	$0,09 \pm 0,01$
	2	$(3,72 \pm 0,02) \times 10^4$	-	-	$10,68 \pm 0,14$	$0,40 \pm 0,02$
60 μM	1	$(2,00 \pm 0,94) \times 10^5$	$0,1 \pm 1,89$	$1,78 \pm 0,71$	$39,07 \pm 11,89$	$0,10 \pm 0,01$
	2	$(4,06 \pm 0,02) \times 10^4$	-	-	$11,93 \pm 0,16$	$0,49 \pm 0,17$
70 μM	1	$(1,00 \pm 0,18) \times 10^6$	$0,15 \pm 0,33$	$1,61 \pm 0,01$	$15,43 \pm 0,54$	$0,38 \pm 0,022$
	2	$(2,2 \pm 0,13) \times 10^4$	-	-	$13,48 \pm 0,2$	$0,37 \pm 0,02$

Tabela 05. Resumo das constantes de velocidade experimentais e simuladas para Modelo 01 (três etapas) e Modelo 02 (duas etapas) para a reação de Prx1 (5 μM) com H_2O_2

	Modelo	$k_1 (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	$k_{-1} (\text{s}^{-1})$	$k_2 (\text{s}^{-1})$	$k_3 (\text{s}^{-1})$	χ^2
Dados experimentais		$(3,80 \pm 0,15) \times 10^7$	$4,42 \pm 1,85^*$	-	$9,0 \pm 0,2$	-
2,5 μM	1	$(2,0 \pm 1,3) \times 10^8$	$43,8 \pm 18,0$	307 ± 27	$9,7 \pm 0,03$	$1,16 \pm 0,02$
	2	$(1,0 \pm 0,01) \times 10^8$	-	-	$9,22 \pm 0,02$	$1,27 \pm 0,02$

*Este valor foi obtido do intercepto da Figura 14B e se refere a constante de velocidade inicial ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) na ausência de peróxido de hidrogênio.

Uma diferença notável entre Prx2 e Prx1 foi a constante de velocidade para a formação da ligação dissulfeto (k_3). A formação da ligação dissulfeto foi aproximadamente 50 vezes mais lenta para Prx2 do que para Prx1. Como esperado, a constante de velocidade para a formação da ligação dissulfeto foi independente da natureza do peróxido. No caso da Prx1, a constante de velocidade foi 14,9 e 9 s⁻¹ para a reação com hidroperóxido de urato e peróxido de hidrogênio, respectivamente. Para Prx2, estas constantes de velocidade foram, respectivamente, 0,31 e 0,25 s⁻¹. Vale ressaltar que as constantes de velocidade para a formação da ligação dissulfeto foram idênticas para Prx2 com ou sem cauda de His (dados não apresentados). A ligação dissulfeto e a hiperoxidação são duas reações concorrentes que têm o ácido sulfênico como intermediário em comum. Portanto, a constante de velocidade mais lenta para a formação do dissulfeto está associada a uma maior susceptibilidade à hiperoxidação. De acordo com isso, mostrou-se que a Prx2 é mais suscetível à hiperoxidação que a Prx1, tanto pelo peróxido de hidrogênio quanto pelo hidroperóxido de urato (**Figura 16C**). De fato, já foi relatada uma maior sensibilidade da Prx2 à hiperoxidação tanto para a proteína recombinante quanto em células (SEO *et al.*, 2009 e COX *et al.*, 2009).

4.3. Análise da hiperoxidação de Prx por hidroperóxido de urato

Para confirmar que o retorno da fluorescência era devido à formação de ligação dissulfeto em vez de hiperoxidação, as enzimas Prx1 e Prx2 foram incubadas com excesso de hidroperóxido de urato durante 5 min. Em seguida, as misturas foram tratadas com excesso de DTT e a quantidade de grupos sulfidrila nas Prx foi determinada. Está bem estabelecido que a DTT é capaz de

reduzir a ligação dissulfeto, mas não o ácido sulfínico ($-\text{SO}_2\text{H}$) ou o ácido sulfônico ($-\text{SO}_3\text{H}$). Quase todos os tióis livres foram recuperados após incubação com DTT (**Figura 17A, 16B**), mostrando que o hidroperóxido de urato, nas concentrações utilizadas nos ensaios cinéticos, não provocou a hiperoxidação de Prxs. Realizou-se os mesmos procedimentos utilizando a Prx2 sem cauda de His e obteve-se resultados semelhantes (**Figura 17C**). Empregando um anticorpo específico anti-Prx- $\text{SO}_{2/3}$, a hiperoxidação foi encontrada apenas com altas concentrações de hidroperóxido de urato (**Figura 17D**). Portanto, a hiperoxidação pode não ser relevante no sistema biológico. O peróxido de hidrogênio foi utilizado como controlo positivo e, neste caso, Prx2 foi muito mais sensível do que Prx1 à hiperoxidação (**Figura 17D**).

FIGURA 17: CONTINUA NA PÁGINA SEGUINTE

D

Figura 17. Análise da hiperoxidação de Prxs por hidróperóxido de urato e peróxido de hidrogênio. (A) Prx1 ($5 \mu\text{M}$, $3,2 \mu\text{molSH} \times \mu\text{mol de proteína}^{-1}$), (B) Prx2 ($5 \mu\text{M}$, $2,0 \mu\text{molSH} \times \mu\text{mol de proteína}^{-1}$) e (C) Prx2 sem cauda de His ($5 \mu\text{M}$, $2,0 \mu\text{molSH} \times \mu\text{mol de proteína}^{-1}$) foram incubadas em tampão fosfato de sódio 50 mM pH $7,4$ com $220 \mu\text{M}$ de hidróperóxido de urato durante 5 min à temperatura ambiente. Adicionou-se DTT em excesso molar $3\times$ por tiol e incubou-se durante 2 h a 37°C . Os tióis foram quantificados por DTNB antes e após a redução. As análises estatísticas foram realizadas por meio de análises de VARIANCE (ANOVA); *** $p < 0,001$ seguido do teste de Bonferroni, quando comparado ao grupo controle. C: controle, H2O2: hidróperóxido de urato. Cada barra representa a média $\pm$ DP de três experiências independentes. (D) As enzimas foram incubadas com diferentes concentrações de peróxidos em tampão fosfato de sódio 50 mM (pH $7,4$) durante 5 min à temperatura ambiente. As amostras foram separadas em gel SDS-PAGE não redutor, transferidas para membrana de PVDF e incubadas com um anticorpo para Prx-SO_{2/3}. Estes resultados são representativos de três experimentos.

4.4. Oxidação de Prx2 a partir de glóbulos vermelhos humanos por hidróperóxido de urato e peróxido de hidrogênio

Incubação de hidróperóxido de urato e peróxido de hidrogênio com eritrócitos humanos oxidou significativamente os monômeros de Prx2 para seu homodímero (**Figura 18A, 18C e 18D**). Curiosamente, o homodímero Prx2 também estava presente nos sobrenadantes da amostra. A quantidade de homodímero Prx2 no sobrenadante foi claramente aumentada pela incubação dos eritrócitos com peróxido de hidrogênio e hidróperóxido de urato (**Figura**

18B e 18E). Tal aumento não foi devido a um rompimento na membrana plasmática, uma vez que não se detectou hemólise (**Figura 18F**).

Figura 18. Oxidação de Prx2 em eritrócitos pelo hidropéroxido de urato e peróxido de hidrogênio. Eritrócitos humanos (1×10^7) foram incubados em 10 mM PBS (pH7,4) com 5mM de glicose com: fase móvel (FM), 200 μ M de peróxido de hidrogênio ou 200 μ M de hidropéroxido de urato por 10 min a 37°C. Análise de Western blot da Prx2 de eritrócitos (A) lisado (100 μ g/poço) e (B) sobrenadante (10 μ g/poço) em SDS-PAGE não-redutor. Intensidade de

banda semi-quantitativa do monômero de Prx2 (C) e dímero (D) do lisado normalizado por α -tubulina. (E) Intensidade de banda do dímero de Prx2 no sobrenadante. (F) Absorbância do sobrenadante dos eritrócitos humanos (10^7) foi medida em 405 nm e comparada ao controle positivo (0,1% SDS). A porcentagem de hemólise nas amostras foi relativa ao controle positivo (100%). Cada barra representa a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. Análise estatística foi feita por análise de variância de uma via (ANOVA); *** $p < 0,001$ seguida de teste de Bonferroni, quando comparado ao grupo controle. C: controle, FM: fase móvel, HOOU: hidroperóxido de urato. Os resultados são representativos de três experimentos.

A Prx2 é a terceira proteína mais abundante em eritrócitos e é fundamental para manter a homeostase redox deste ambiente (LOW *et al.*, 2008). A Prx2 do eritrócito é altamente sensível ao aumento do peróxido de hidrogênio produzido por neutrófilos e tem sido proposto como marcador em tempo real de ativação sistêmica de neutrófilos (BAYER *et al.*, 2013). Neste estudo, descobriu-se que o hidroperóxido de urato oxida a Prx2 do eritrócito na mesma extensão que o peróxido de hidrogênio (**Figura 17**).

Uma vez que o ácido úrico é oxidado por neutrófilos no plasma (MEOTTI *et al.*, 2011), a oxidação da Prx2 do eritrócito também poderia indicar a presença de hidroperóxido de urato. Assim, o hidroperóxido de urato oxidou a Prx2, mostrando sua capacidade para atravessar membranas celulares. O efluxo de Prx 2-Cys intracelular já foi evidenciado em células de rim embrionário (HEK) e monocíticas e parece envolver mecanismos de sinalização redox (MULLEN *et al.*, 2015). Além disso, os macrófagos humanos e de ratos liberam Prx2 e Prx1 oxidados após estímulos inflamatórios (SALZANO *et al.*, 2014) e na aterosclerose (MADRIGAL-MATUTE *et al.*, 2015). Nossos resultados indicam que os eritrócitos também liberam Prx2 em insultos oxidativos.

Em resumo, este estudo mostra que Prx1 e Prx2 podem reduzir o hidroperóxido de urato fisiologicamente. As peroxiredoxinas estão emergindo como intermediários chave na sinalização redox, principalmente transferindo seus equivalentes oxidantes para outras proteínas sensíveis ao estado redox (SOBOTTA *et al.*, 2015 e JARVIS *et al.*, 2012), modulando a resposta e a função das células. Como o hidroperóxido de urato é formado em locais inflamatórios, a oxidação de Prxs por este oxidante pode ser um evento chave na progressão da inflamação.

Tendo em vista os dados obtidos, foi elaborado um esquema do mecanismo de oxidação da Prx2 pelo hidroperóxido de urato (**Figura 19**).

Figura 19. Mecanismo hipotético para a oxidação da Prx2 pelo hidroperóxido de urato. Cada monômero de Prx2 forma um complexo enzima-susbtato com uma molécula de HOOU. Após a formação do complexo, ocorre a oxidação da cisteína peroxidásica ao ácido sulfênico, com liberação do álcool correspondente ao HOOU. Em seguida, o ácido sulfênico da cisteína peroxidásica sofre um ataque nucleofílico da cisteína de resolução para formara ponte dissulfeto, formando um dímero cabeça-cauda. A ligação dissulfeto é reduzida principalmente pelo sistema da Trx/TrxR, completando o ciclo catalítico da enzima.

CAPÍTULO III

OXIDAÇÃO DA ALBUMINA E TIOREDOXINA PELO HIDROPERÓXIDO DE URATO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Albumina do soro humano (HSA)

Evolutivamente, para combater os processos oxidativos e evitar possíveis danos irreversíveis a biomoléculas, as células têm mantido a homeostase redox por meio de compostos com propriedades antioxidantes. A GSH é um tripeptídeo antioxidante composto pelos aminoácidos glutamato, glicina e cisteína. Dada sua elevada concentração em meio biológico (5-10 mM), é a principal responsável por manter o meio intracelular redutor (GSH/GSSG na razão de 100), por outro lado o meio do plasma extracelular é mais oxidante, com razões de moléculas reduzidas/oxidadas perto de 1-2 (CARBALLAL *et al.*, 2007; CARBALLAL *et al.*, 2003). Neste contexto, o tiol reduzido mais abundante no plasma é o da albumina (600 μM), compostos tiólicos de baixo peso molecular como cisteína (265 μM), cisteinilglicina (32 μM), homocisteína (12 μM) e glutathiona (7,5 μM) estão presentes no meio extracelular em uma concentração total de aproximadamente 300 μM e em sua maioria oxidados, apresentando razões de reduzido/oxidado perto de 0,01-0,1, com exceção da glutathiona, cuja razão é perto de 2 (MANSOOR *et al.*, 1992; ANDERSON *et al.*, 1993).

No contexto intracelular, a forma reduzida da GSH merece bastante atenção. Neste sentido, o hidroperóxido de urato foi capaz de reagir diretamente com a GSH com uma constante de velocidade de $13,7 \pm 0,8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, cerca de 16 vezes mais rápido do que o peróxido de hidrogênio ($0,87 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; WINTERBOURN *et al.*, 1999). Seu mecanismo de oxidação não envolve a

geração de aduto estável, mas a formação de dímero (GSSG) com uma estequiometria 2 GSH: 1 H₂O₂ (PATRICIO *et al.*, 2015).

Em termos do contexto extracelular, a albumina do soro humano (HSA), proteína mais abundante no plasma, recebe maior relevância. É uma proteína globular de 66 kDa que contém 585 aminoácidos e 17 pontes dissulfeto (**Figura 20**). Suas funções incluem a manutenção da pressão osmótica, transporte de hormônios, ácidos graxos e xenobióticos. Como função secundária e também devido a sua alta disponibilidade, foi proposto que ela pudesse atuar como antioxidante, neutralizando oxidantes derivados do oxigênio e nitrogênio gerados no compartimento vascular. De fato, a HSA é o principal alvo de espécies reativas geradas a partir da xantina oxidase como peróxido de hidrogênio, superóxido e radical hidroxila (RADI *et al.*, 1991a); reage também com peroxinitrito e hidroperóxidos lipídicos (RADI *et al.*, 1991b; ALVAREZ, *et al.*, 1999; HURST *et al.*, 1999). Assim, a responsável por esta capacidade antioxidante seria a Cys34, a única cisteína livre das 35 presentes na HSA, consequentemente, a HSA isolada contém cerca de 0,7 $\mu\text{mol SH/} \mu\text{mol HSA}$ (CARBALLAL *et al.*, 2003; CARBALLAL *et al.*, 2007), o que representa 80% da carga líquida de tióis livres no sangue (CARBALLAL *et al.*, 2003; CARBALLAL *et al.*, 2007; TURELL *et al.*, 2008).

Figura 20. Estrutura tridimensional da HSA e localização da cisteína 34. A) Estrutura do domínio da HSA. As localizações das pontes dissulfeto são mostradas em amarelo e a Cys34 em vermelho. A porção N-terminal está a direita e a C-terminal está a esquerda. B) Características estruturais dos grupos a 8 Å de distância Cys34, mostrando Asp38, Pro35, His39, Val77, e Tyr84. Os resíduos polares são mostrados em amarelo e os resíduos polares em azul. A Cys34 está em verde. Resíduos polares hidrofílicos com carga positiva ou negativa estão mostrados em vermelho e azul, respectivamente. (Retirado de CARBALLAL *et al.*; 2007).

A HSA é heterogênea em termos de conteúdo tiólico. Amostras de plasma contêm 70% da fração mercaptoalbumina que possui a Cys34 na forma de tiol, enquanto o restante é encontrado na forma de não-mercaptoalbumina que apresenta a Cys34 fazendo ponte dissulfeto mista com pequenas moléculas como cisteína e GSH (CARBALLAL *et al.*, 2003; CARBALLAL *et al.*, 2007). O balanço entre a forma reduzida e oxidada pode-se alterar em estados patológicos (KAWAI *et al.*, 2001; TOMIDA *et al.*, 2003), com exercício intenso (INAYAMA *et al.*, 1996; IMAI *et al.*, 2002) e durante o envelhecimento, atingindo níveis de 0,5 $\mu\text{mol SH}/\mu\text{mol HSA}$ em pessoas com mais de 60 anos (LETO *et al.*, 1970; ERA *et al.*, 1995). O tiol da HSA não é particularmente tão reativo quanto de outras proteínas, apresentando um pKa de 8,3-8,6, similar ao da cisteína (8,4) e GSH (8,8) (WILSON *et al.*, 1980, TORCHINSKY 1981). A

HSA reage com o peróxido de hidrogênio com uma constante de velocidade de $2,2 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$, similar à reação com a cisteína ($2,9 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$). Embora a oxidação da Cys34 ocorra em velocidades lentas, a HSA ainda assim é um neutralizador importante de espécies oxidantes por causa de sua alta concentração no plasma. A oxidação da HSA pelo peróxido de hidrogênio não leva a formação de dímero, principalmente por causa do impedimento estérico, dessa forma, é sugerido que sua oxidação leve a formação de ácido sulfênico estabilizado (RADI *et al.*, 1991; CARBALLAL *et al.*, 2003). As constantes de velocidade são importantes para se avaliar os possíveis destinos da HSA em forma de ácido sulfênico (HSA-SOH, **Tabela 06**). Uma vez que a HSA-SOH não pode ser reduzida pelo ascorbato, ácido úrico ou aminas livres é provável que reaja com outros tióis como cisteína, GSH, homocisteína e cisteinilglicina, o que está de acordo com os dissulfetos mistos encontrados entre a HSA e estas pequenas moléculas (CARBALLAL *et al.*, 2007).

Tabela 06. Reatividade de HSA-SOH em pH 7,4
(Retirado de TURELL *et al.*, 2008).

Molécula alvo	Constante de velocidade ($\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$)
Ascorbato	ND
Urato	ND
Alanina	ND
Histidina	ND
Lisina	ND
Arginina	ND
H_2O_2	$0,4 \pm 0,2$
Cisteína	$21,6 \pm 0,2$
Glutathione	$2,9 \pm 0,5$
Homocisteína	$9,3 \pm 0,9$
Cisteinilglicina	$55 \pm 3,0$
Tionitrobenzoato	105 ± 11

ND: não detectado.

Sendo assim, o hidroperóxido de urato é capaz de oxidar tanto o principal redutor intracelular (GSH), quanto tem potencialidade para oxidar o principal redutor extracelular (HSA). De fato, já foi demonstrado que o

hidroperóxido de urato pode reagir com duas importantes enzimas: a proteína dissulfeto isomerase (PDI) (PATRICIO, 2014) e a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (HAMZAH, 2015). A PDI é uma proteína presente no retículo endoplasmático que tem como função catalisar a formação e redução de pontes dissulfeto (atividade oxirredutase) e o rearranjo de dissulfetos incorretos (atividade isomerase) em proteínas e peptídeos, além de atuar como chaperona (KHAN E MUTUS, 2014). O hidroperóxido de urato reagiu com a PDI com uma constante de velocidade de $6 \pm 0,12 \times 10^3 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ (PATRICIO, 2014). A GAPDH catalisa a sexta reação da glicólise e é essencial para a função das células (SIROVER, 1999). Esta enzima também está envolvida em proliferação celular, sinalização redox, apoptose, transporte de membrana, dinâmica de citoesqueleto e replicação e reparo do DNA (SIROVER, 1999; MAZOLLA E SIROVER, 2002; ARUTYUNOVA *et al.*, 2003). A inativação desta enzima impede a produção de ATP e leva à morte celular (ISHII *et al.*, 1999; DANSHINA *et al.*, 2001). O sistema enzimático da lactoperoxidase em conjunto com a xantina oxidase na presença de urato produziu 5 μM de hidroperóxido de urato e causou 60% de perda de atividade da GAPDH (HAMZAH, 2015).

Tendo em vista a capacidade do hidroperóxido de urato oxidar proteínas contendo tióis, e tendo sido demonstrado no capítulo anterior a oxidação das peroxiredoxinas, hipotetizou-se que o hidroperóxido de urato pudesse oxidar também a albumina.

1.2. Tioredoxina

As tioredoxinas pertencem a uma família de proteínas com a sequência (WCGPC) altamente conservada em seu sítio ativo (**Figura 21**). Esta família é responsável pela redução de dissulfetos em proteínas. Ao reduzirem seus

alvos por um mecanismo que envolve a formação de uma ponte dissulfeto mista (**Figura 22A**), as tioredoxinas tornam-se oxidadas e são novamente reduzidas pela TrxR às custas de elétrons do NADPH (**Figura 22B**). Mamíferos possuem duas isoformas de Trxs de 12 kDa: Trx1 e Trx2. A Trx1 está localizada no citossol e núcleo, enquanto a Trx2 na mitocôndria (HOLMGREN e LU, 2010).

Figura 21. Sequência e estrutura da Trx1 humana (retirado e adaptado de WATSON *et al.*, 2003).

A

FIGURA 22: CONTINUA NA PÁGINA SEGUINTE

B

Figura 22. Sistema da tioredoxina. (A) Mecanismo da redução de dissulfeto pela Trx. Durante a redução do dissulfeto da proteína alvo, é formada uma ponte dissulfeto mista transitória entre a Trx e seu substrato. Após completar seu ciclo catalítico, o substrato reduzido é liberado e a Trx convertida em sua forma oxidada. (B) A forma oxidada da Trx pode ser regenerada ao estado reduzido pela TrxR que utiliza NADPH como doador de elétrons. Trx: tioredoxina, TrxR: tioredoxina redutase, red: reduzida, ox: oxidada (Retirado de MATSUO *et al.*, 2013).

As tioredoxinas são as principais dissulfeto redutases com função anti-apoptótica e pró-sobrevivência. Possuem função de ribonucleotídeo redutase (síntese e reparo do DNA) (HOLMGREN, 1985), de redução de peroxiredoxinas (defesa contra o estresse oxidativo) (LU e HOLMGREN, 2014), de inibição da atividade fosfatase da PTEN (*phosphatase and tensin homolog*, que ativa a Akt e inibe a ASK1, *apoptosis signaling kinase-1*) (MEUILLET *et al.*, 2004), de inibição direta da ASK1 (inibição de apoptose) (SAITOH *et al.*, 1998), de aumento de atividade do NF-κB (redução de ponte dissulfeto na subunidade p50, favorecendo ligação ao DNA; MATTHEWS *et al.*, 1992; TREVELIN *et al.*, 2016), de ativação de ERK e fatores de transcrição como HIF1α, p53, Ref-1, Nrf2 entre outros (SCHRODER *et al.*, 2007), de redução e ativação da AMPK (*5'-AMP-activated protein kinase*, responsável pela regulação do metabolismo e sobrevivência durante o estresse de energia; SHAO *et al.*, 2014), de redução

da sulfóxido de metionina redutase (responsável pela redução do sulfóxido de metionina em proteínas e do aminoácido livre; GRIMAUD *et al.*, 2001), de ativação da HDAC4 (histona desacetilase; AGO *et al.*, 2008). A Trx possui um inibidor endógeno, a TXNIP (proteína de interação a Trx; HWANG *et al.*, 2014). Desse modo, a Trx constitui uma proteína chave na sinalização redox (MATSUZAWA *et al.*, 2016), sendo expressa em maior quantidade em diversos tumores, com seu aumento associado à inibição de apoptose, promoção da proliferação e agressividade tumoral (LILLIG e HOLMGREN 2007).

A Trx1 humana possui 5 cisteínas, duas em seu sítio ativo **Cys32** e **Cys35**, e outras três **Cys62**, **Cys69** e **Cys73**, que apesar de não fazerem parte do sítio ativo, tem sido apontadas com funções regulatórias. As cisteínas e a tirosina 49 da Trx podem sofrer alterações pós-traducionais que podem afetar sua atividade e função. A Cys73 pode fazer uma ponte dissulfeto com outra Cys73 e formar um homodímero (WEICHSEL *et al.*, 2007), bem como sofrer nitrosilação (WU *et al.*, 2010), glutationilação (CASAGRANDE *et al.*, 2002) ou modificação por 4-hidroxi-2-nonenal (GO *et al.*, 2007). As cisteínas Cys62 e Cys69 podem fazer uma ponte dissulfeto intramolecular em condições de estresse oxidativo (WATSON *et al.*, 2003) que prejudica a atividade da Trx1 e acredita-se ter um profundo efeito em desfazer a interação entre Trx1 e sua proteína alvo (CHENG *et al.*, 2011; WATSON *et al.*, 2003 e WATSON *et al.*, 2004). Estas cisteínas também podem ser alvos de nitrosilação (HAENDELER *et al.*, 2002; WEICHSEL *et al.*, 2007). Foi demonstrado que quando ocorre a formação de duas pontes dissulfeto (Cys32-Cys35 e Cys63-Cys69) a Trx torna-se inativa tanto como dissulfetoredutase quanto como substrato para TrxR (DU *et al.*, 2013). Além destas alterações, a Trx humana pode ainda ser encontrada

em sua forma truncada (Trx80). Esta forma menor (10 kDa) tem sido reportada por ser secretada de células. Embora possua o sítio ativo intacto, a Trx80 não possui 16-24 aminoácidos da porção C-terminal (POWIS *et al.*, 2001). Além disso, a forma Trx80 exerce efeito pró-inflamatório e promove a aterosclerose (MAHMOOD *et al.*, 2013).

A reatividade da Trx com o peróxido de hidrogênio é baixa, a constante de velocidade para a Trx de *E. coli* com peróxido de hidrogênio é de $1,05 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (GOLDMAN *et al.*, 1995). Apesar da baixa reatividade direta, foi sugerido que a Prx catalisa a oxidação da Trx por peróxido de hidrogênio e modula sua interação com proteínas alvo (DU *et al.*, 2013). De fato, são propostos 3 modelos para sinalização do peróxido de hidrogênio que envolvem as Trxs e Prxs (NETTO e ANTUNES, 2016).

Como descrito no Capítulo II, os modelos *floodgate* e sinal de peroxidase (ou troca de dissulfeto) colocam as Prxs como sinalizadoras centrais, porém no terceiro modelo as Prxs dividem a cena com a Trx, pois acredita-se que a transdução do sinal pode ocorrer via Prx-Trx, nele a Trx oxidada por seu substrato Prx, seria incapaz de reduzir seus alvos e isso ativaria diferentes vias de sinalização (BERNDT *et al.*, 2007).

Neste sentido, é possível que as cisteínas não-catalíticas Cys62 e Cys69 da Trx1 também possam estar envolvidas no processo de sinalização, já que a Prx1 oxida as Cys32 e Cys35. A formação de um segundo dissulfeto na Trx1 a inativa como substrato para a TrxR e impede a Trx1 de reduzir seus alvos (WATSON, 2003 e DU *et al.*, 2013). Dessa forma, os diferentes estados de oxidação que a Trx pode assumir, desempenham papel importante em sua

função regulatória como descrito para sua interação com quinases, fosfatases e fatores de transcrição (LEE *et al.*, 2013 e MEYER *et al.*, 2009).

Tendo em vista a importância da Trx para a sinalização redox e do envolvimento da Prx neste processo, foi investigado se o hidroperóxido de urato formado neste ambiente poderia oxidar esta proteína. A oxidação desta proteína neste contexto pode indicar um papel do hidroperóxido de urato como agente potencializador do estresse oxidativo, contribuindo para o desbalanço da homeostase e possível sinalização redox.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste capítulo é o estudo da oxidação e cinética das proteínas albumina e tioredoxina com o hidroperóxido de urato e a oxidação de peroxiredoxinas em células THP-1 diferenciadas em macrófagos (dTHP-1) incubadas com hidroperóxido de urato para compreender os efeitos que a formação deste oxidante pode ocasionar no ambiente inflamatório.

Objetivos específicos:

- Quantificação de tióis livres da albumina e tioredoxina após exposição ao hidroperóxido de urato;
- Determinação das constantes de velocidade para a reação do hidroperóxido de urato com a albumina e a tioredoxina;
- Oxidação das peroxiredoxinas e tioredoxina em células THP-1 diferenciadas em macrófagos incubadas com hidroperóxido de urato.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Síntese química e quantificação do hidropéroxido de urato (HOOU)

A síntese do hidropéroxido de urato foi realizada como descrito anteriormente no Capítulo I, item 3.1. A concentração de soluções estoque de H_2O_2 foi determinada espectrofotometricamente a 240 nm ($\epsilon_{240\text{nm}} = 43,6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

3.2. Transformação, expressão e purificação da proteína recombinante Trx1 humana e obtenção da albumina

Para a expressão da proteína recombinante, o plasmídeo pET15b (hTrx1) com resistência a ampicilina contendo o cDNA para a proteína humana foi colocado em uma cubeta de eletroporação juntamente com a bactéria eletrocompetente *Escherichia coli* BL21. A cubeta foi submetida a um pulso de voltagem no eletroporador *Gene Pulser II Electroporation System* (Bio-Rad Laboratories), ajustado em 2,5 kV de voltagem e 25 μF de capacitância. Após o pulso de voltagem, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio LB e deixadas sob agitação a 37°C por 1 h. Depois desse tempo, as células foram plaqueadas em meio ágar LB seletivo com ampicilina e incubadas *overnight* a 37°C, para o crescimento das bactérias transformadas com o vetor.

No dia seguinte, as bactérias transformadas que cresceram, foram inoculadas em 50 mL de meio LB/Ampicilina e crescidas *overnight* a 37°C. No dia seguinte, as células foram diluídas em 1 L de meio LB/Ampicilina para a $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,2$. Quando atingiram a $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,6$, o meio foi suplementado com IPTG 1mM e deixado por mais 3h sob agitação para a indução do gene clonado. Após este procedimento, as células foram recolhidas por

centrifugação e ressuspensas em tampão de lise celular (tampão fosfato de sódio 20mM pH 7,4, NaCl 500mM e imidazol 20 mM para a Trx1 com adição de 0,1 mM de PMSF para inibir a degradação por proteases). As células foram então submetidas a ciclos de sonicação por 20 segundos (em um tempo total de 5 min) no aparelho *Branson Digital Sonifier 450* (Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, Connecticut, USA), seguidos de 40 segundos de descanso em gelo. Depois da lise, adicionou-se sulfato de estreptomicina 1% para precipitação do material genético. Após 20 min de agitação no gelo, as células foram centrifugadas (15000 rpm, 45 min, 4°C) e o sobrenadante foi recolhido e utilizado para a purificação da proteína de interesse.

A purificação da Trx1 humana foi feita utilizando-se uma coluna de afinidade a níquel *HisTrap HP* (GE Healthcare) de 1 mL e bomba peristáltica *P1* (GE Healthcare, General Electric Co., Chalfont St. Giles, Reino Unido). As amostras foram purificadas utilizando a tampão de ligação (tampão fosfato de sódio 20 mM pH7,4, NaCl 500 mM e imidazol 10 mM) e tampão de eluição (tampão fosfato de sódio 20mM pH7,4 NaCl 500mM e com gradiente de imidazol 50-500 mM). A coluna foi previamente preparada com solução de níquel 0,1M e equilibrada no tampão adequado e o fluxo mantido em 1 mL/min. A amostra proteica foi injetada e recolhidas frações de 1mL.

Para a reunião das frações obtidas nas purificações, foi realizado ensaio de Bradford e as frações contendo a proteína foram analisadas por SDS-PAGE para avaliação da purificação. Após tais procedimentos, as frações contendo maior pureza foram concentradas por centrifugação em unidade filtrante *Amicon Ultra 10 kDa* (Millipore Corporate) e sua concentração determinada por

ensaio de Bradford. Os plasmídeos da Trx1 foram obtidos com o Dr. Luis E. S. Netto.

A albumina do soro bovino (BSA) foi obtida comercialmente (96% de pureza, Sigma Aldrich, EUA).

3.3. Redução dos tióis da albumina e tioredoxina

Para a redução dos tióis da albumina e tioredoxina, as proteínas nas concentrações desejadas foram incubadas por 2h a 37°C com ditioneitol (DTT) com um excesso molar de 3x em relação às cisteínas (34 Cys para a albumina e 5 Cys para a tioredoxina). O excesso de DTT foi removido utilizando-se filtros Amicon® (Merck, Alemanha) de 10 kDa por centrifugação (5000 rpm, 30 min) e lavagem sequencial com tampão fosfato salino 50 mM pH 7,4 contendo 100 µM DTPA.

3.4. Quantificação de tióis livres pelo ensaio de DTNB

Após a redução dos tióis, os mesmos foram quantificados utilizando 5 µM para tioredoxina e 15 µM para albumina, incubadas 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; 0,2%) por 20 min a temperatura ambiente e medida a absorbância a 412 nm ($\epsilon = 1,41 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) em leitor de microplaca (Infinite M200; Tecan®; QUIJANO *et al.*, 1997). Este ensaio consiste na reação do dímero DTNB (levemente amarelo) com grupos sulfidrilas livres, para formar um dissulfeto misto entre o grupo tiol da proteína e o seu monômero TNB, liberando a outra molécula de TNB. Como o TNB apresenta coloração vivamente amarela, este pode ser quantificado a 412 nm com seu coeficiente de extinção molar.

3.5. Análise da oxidação dos tióis livres da albumina e tioredoxina pelo hidroperóxido de urato

A BSA reduzida previamente ($15\ \mu\text{M}$; $\sim 22\ \mu\text{SH}/\mu\text{mol}$ de proteína) ou não reduzida ($15\ \mu\text{M}$; $0,8\ \mu\text{SH}/\mu\text{mol}$ de proteína) e a tioredoxina reduzida ($12\ \mu\text{M}$; $\sim 3,2\ \mu\text{SH}/\mu\text{mol}$ de proteína) foram incubadas por 10 min a 37°C com concentrações crescentes de hidroperóxido de urato ($12\text{-}240\ \mu\text{M}$). Após a incubação, os tióis foram quantificados pelo ensaio do DTNB.

3.6. Determinação da constante de velocidade do hidroperóxido de urato com a BSA e a tioredoxina

A BSA não reduzida previamente ($10\ \mu\text{M}$; $0,8\ \mu\text{SH}/\mu\text{mol}$ de proteína) ou a tioredoxina reduzida previamente ($10\ \mu\text{M}$; $3,5\ \mu\text{SH}/\mu\text{mol}$ de proteína) foram incubadas com $100\ \mu\text{M}$ de HOOU e alíquotas foram retiradas e submetidas ao ensaio de FOX em intervalos de 10 segundos no início da reação, de 30 segundos no meio da reação e de 1 min ao final da análise. As constantes de velocidade observadas (k_{obs}) foram determinadas pelo ajuste das curvas experimentais de decaimento da concentração do hidroperóxido de urato.

Tendo em vista que o hidroperóxido de urato apresenta decaimento espontâneo neste tempo, foi realizada uma curva de decaimento exponencial que forneceu a constante de velocidade observada (k_{obs}). O valor de k_{obs} para o hidroperóxido de urato sozinho foi descontado do valor de k_{obs} para a reação com a proteína.

3.7. Cultura de células humanas

Células leucêmicas promielocíticas humanas (THP-1; BCRJ, RJ, Brasil) foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640, suplementado com SFB 20%, estreptomicina ($100\ \mu\text{g}/\text{mL}$) e penicilina ($100\ \text{U}/\text{mL}$), em atmosfera umidificada

a 37°C e 5% de CO₂. Para a diferenciação, as mesmas foram contadas em câmara de Neubauer utilizando-se azul de tripan para exclusão de células mortas. A quantidade desejada de THP-1 foi diferenciada em macrófagos (dTHP-1) em placas de 6 poços (2×10^6 células/poço) pela adição de PMA (5 ng/mL) no mesmo meio de cultura. As células foram mantidas neste meio por 48 h, nas mesmas condições de temperatura e atmosfera citadas. Para a realização dos experimentos, o meio de cultura foi retirado e adicionado o tampão desejado.

3.8. Incubação de células dTHP-1 com hidroperóxido de urato

As células previamente diferenciadas foram incubadas em tampão fosfato salino contendo glicose (10 mM fosfato, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl e 5 mM de glicose, pH 7,4) com fase móvel, hidroperóxido de urato (200 µM) e peróxido de hidrogênio (200 µM) por 10 min a 37°C. Após este tempo, as células aderidas foram coletadas com *cell scraper* e o sobrenadante foi recolhido.

3.9. Dosagem de proteínas

A concentração total de proteína para as proteínas purificadas, do lisado celular ou sobrenadante 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 10µg/mL.

3.10. SDS-PAGE e Western Blot

Para análise da proteína purificada e para realização de *Western blot*, foi preparado um gel de poliacrilamida 12% e aplicado 2-10 µg de proteína purificada ou 100 µg de extrato celular. A corrida foi realizada a 200V por 1h. No caso do gel, o mesmo foi corado *overnight* sob agitação com Comassie Blue (BioRad) e depois descorado até a visualização de bandas nítidas.

Para o *Western Blot*, o sobrenadante em tampão fosfato salino com glicose (PBS, fosfato 10 mM em NaCl 137 mM e KCl 2,7 mM, 5 mM glicose, pH 7,4) contendo 30 mM de NEM (N-etilmaleimida) foi recolhido e concentrado por *Speed Vac*. As células foram tratadas com tampão de lise RIPA gelado (Tris 10 mM pH7,5, NaCl 150 mM, NP40 1%, SDS 0,1%, deoxicolato de sódio 1%, EDTA 5 mM, EGTA 5mM, NaF 25 mM e Na₂VO₄ 1 mM) contendo 30 mM de N-etilmaleimida (NEM) e mistura de inibidores de proteases na concentração sugerida pelo fornecedor (Roche). As proteínas foram quantificadas e separadas por SDS-PAGE e então transferidas para uma membrana de PVDF e incubadas sob agitação por 2 h com solução de bloqueio (BioRad). Após este tempo, a membrana foi lavada com tampão fosfato contendo 0,1% de tween-20 e incubada overnight com o anticorpo primário (anti-Trx, 1:1000, Abcam; anti-Prx1, 1:1000, AbFrontier e anti-Prx2, 1:2000, Abcam). No dia seguinte, a membrana foi novamente lavada e incubada durante 1 h com o anticorpo secundário (anti-mouse, 1:1000, Sigma Aldrich, MO, EUA). Em seguida a membrana foi lavada e procedeu-se a revelação em fotodocumentador Uvitec Cambridge para análise das bandas obtidas. A semi-quantificação das bandas foi realizada pelo software ImageJ.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise da oxidação dos tióis livres da albumina pelo hidroperóxido de urato

Como o hidroperóxido de urato se mostrou reativo aos aminoácidos metionina e cisteína e ao principal antioxidante intracelular glutathiona (PATRICIO *et al.*; 2015), decidiu-se estudar sua reatividade ao principal agente redutor do plasma, a albumina. A albumina previamente reduzida foi oxidada pelo hidroperóxido de urato como mostra a **Figura 23A**. A albumina em sua forma nativa (0,8 μM SH/ μM de proteína) também sofreu oxidação (**Figura 23B**).

Figura 23. O hidroperóxido de urato oxida os tióis livres da albumina. (A) A BSA previamente reduzida (15 μM , ~ 18 SH/BSA) foi incubada com concentrações crescentes de HOOU (15, 100, 200 e 450 μM) por 10 min a 37°C e (B) a BSA não reduzida (15 μM , $\sim 0,8$ SH/BSA) foi incubada com 100 μM HOOU por 10 min a 37°C. Os tióis foram quantificados após reação com o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzólico (DTNB) através de análise espectrofotométrica $\lambda_{412\text{nm}} = 14.100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Os gráficos representam a média $\pm$ erro padrão de três experimentos independentes. HOOU: hidroperóxido de urato. O experimento foi realizado em triplicata.

4.2. Determinação da velocidade de reação do hidroperóxido de urato com albumina

Tendo em vista a oxidação ocasionada pelo hidroperóxido de urato na albumina, optou-se por calcular sua constante de reação (**Figura 24**). Como a albumina está presente naturalmente com apenas uma cisteína em forma de tiol, optou-se por utilizar esta forma. De acordo com o decaimento exponencial obtido para esta oxidação, descontou-se o decaimento espontâneo do hidroperóxido de urato sozinho pelo tempo e obteve-se uma constante de segunda ordem de $0,2 \times 10^2 \pm 3,7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Figura 24. Cinética de oxidação da albumina pelo hidroperóxido de urato. O ensaio foi realizado em acetato de amônio 10 mM, pH 7,4, a 25°C. A concentração de hidroperóxido de urato foi medida em diferentes tempos após adição da proteína (até 30 min) pelo ensaio de FOX. A BSA não reduzida previamente (10 μM, ~0.8 μmolSH/ μmol proteína) foi incubada com 100 μM de hidroperóxido de urato. O decaimento espontâneo do hidroperóxido de urato foi descontado. Os pontos representam o decaimento do HOOU na presença (preto) e ausência (vermelho) da BSA. O ajuste da curva utilizado foi de decaimento exponencial simples. O gráfico representa a média de três experimentos ($R^2 = 0,99$).

A albumina do soro de humanos (HSA) e a albumina do soro bovina (BSA) tem 76% de identidade em sua sequência de aminoácidos, o que lhes confere certa similaridade (MICHNIK *et al.*, 2006), devido a sua maior facilidade de obtenção e menor custo, optou-se por utilizar a BSA. A oxidação da albumina ao ácido sulfênico acarreta diminuição da atividade antioxidante desta proteína e pode ter efeitos deletérios na capacidade antioxidante total do plasma.

A HSA-SH reage com o peróxido de hidrogênio com uma constante de velocidade de $2,26 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Esta reação forma o ácido sulfênico, o qual pode ser novamente oxidado pelo peróxido de hidrogênio para formar o ácido sulfinico ($0,4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; TURELL *et al.*, 2008). Assim, a albumina reage com uma constante de velocidade cerca de 9 vezes mais rápida com o hidroperóxido de urato do que com o peróxido de hidrogênio. O mesmo ocorreu com a reação do hidroperóxido de urato com a glutathione em relação ao peróxido de hidrogênio (PATRÍCIO *et al.*, 2015; WINTERBOURN *et al.*, 1999). Os possíveis destinos da HSA-SOH (**Tabela 06**) mostram que a albumina reagirá com o tiol de outra biomolécula, acarretando em sua oxidação. Dessa forma, é provável que a presença do hidroperóxido de urato no sistema vascular contribua para um desbalanço redox ainda mais acentuado do que com apenas a presença de peróxido de hidrogênio.

4.3. Oxidação de cisteínas da Trx1 pelo hidroperóxido de urato

Devido à relevância da Trx para a sinalização celular redox e dado os resultados anteriormente obtidos que mostraram que o hidroperóxido de urato foi capaz de reagir com a glutathione e a albumina com constantes de velocidade maiores do que o peróxido de hidrogênio optou-se por estudar a reação do hidroperóxido de urato com a Trx1. Como mostra a **Figura 25**, o

hidroperóxido oxidou os tióis livres da Trx1 em uma estequiometria de 1 HOOU: 1 –SH.

Figura 25. O hidroperóxido de urato oxida os tióis livres da Trx1. A Trx1 previamente reduzida (12 μM; ~3,2 μSH/μmol de proteína) foi incubada com concentrações crescentes de HOOU ou veículo (fase móvel) por 10 min a 37°C. Os tióis foram quantificados após reação com o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) através de análise espectrofotométrica $\lambda_{412nm} = 14.100 M^{-1}.cm^{-1}$. Os gráficos representam a média $\pm$ erro padrão de três experimentos independentes. HOOU: hidroperóxido de urato. O experimento foi realizado em triplicata.

4.4. Cinética de reação da Trx1 com o hidroperóxido de urato

Foi realizado o estudo da cinética da reação da Trx1 com o hidroperóxido de urato, revelando uma constante de segunda ordem de $2,8 \pm 0,8 \times 10^2 M^{-1}s^{-1}$, como mostra a **Figura 26**.

Figura 26. Cinética de oxidação da Trx pelo hidroperóxido de urato. O ensaio foi realizado em acetato de amônio 10 mM, pH 7,4, a 25°C. A concentração de hidroperóxido de urato foi medida em diferentes tempos após adição da proteína (até 30 min) pelo ensaio de FOX. A Trx reduzida previamente (10 μ M, $\sim 3.5 \mu\text{molSH}/\mu\text{mol}$ proteína) foi incubada com 100 μ M de hidroperóxido de urato. O decaimento espontâneo do hidroperóxido de urato foi descontado. Os pontos representam o decaimento do HOOU na presença (preto) e ausência (vermelho) da Trx. O ajuste da curva utilizado foi de decaimento exponencial simples. O gráfico representa a média de quatro experimentos ($R^2 = 0,96$).

A Trx é uma proteína central na sinalização redox, em sua forma ativa é capaz de reduzir as pontes dissulfeto e interagir com proteínas alvo, contribuindo para a homeostase redox e regulação de eventos ligados à sobrevivência celular e inibição de apoptose. Desse modo, sua oxidação pode acarretar consequências adversas às células. Considerando que o hidroperóxido de urato tem sua síntese favorecida em um ambiente inflamatório, devido à geração de superóxido pela NADPH oxidase, à presença das peroxidases mieloperoxidase e lactoperoxidase e de urato, é possível que o hidroperóxido de urato contribua para a oxidação da Trx1 nas células. De

fato, foi demonstrado que o hidroperóxido de urato é capaz de oxidar as cisteínas da Trx1 com uma constante de velocidade maior do que o peróxido de hidrogênio (para Trx de *E. coli*; GOLDMAN *et al.*, 1995). Dependendo do grau de oxidação ocasionado, a Trx pode ser até mesmo inativada. De acordo com os dados obtidos, o hidroperóxido de urato foi capaz de oxidar os aproximadamente 3 tióis livres encontrados na proteína recombinante após redução por DTT. Isso sugere que o hidroperóxido pode oxidar também as Cys62 e Cys69, que ao formar um dissulfeto não são mais substratos para a TrxR (DU *et al.*, 2013), este evento acarreta inativação da enzima e pode trazer consequências severas à célula.

4.5. Avaliação do estado de oxidação da Trx1, Prx1 e Prx2 na presença de hidroperóxido de urato

Tendo em vista a importante via de sinalização redox desempenhada pela redução das Prx1 e Prx2 (peroxiredoxinas citossólicas) pela Trx1, avaliou-se o estado oxidativo da Trx e das Prxs em células de macrófagos (dTHP-1) incubadas com hidroperóxido de urato, como observado na **Figura 27**, o hidroperóxido é capaz de oxidar as Prx1 e Prx2 nas células em uma extensão semelhante ao peróxido de hidrogênio. O dímero da Prx2 (44kDa) se separa em duas bandas, as quais correspondem ao dímero com uma ou duas pontes dissulfeto apresentando, assim, diferentes graus de empacotamento (PESKIN *et al.*, 2013).

FIGURA 27: CONTINUA NA PÁGINA SEGUINTE

Figura 27. Oxidação da Prx1, Prx2 e Trx1 em células dTHP-1 pelo hidroperóxido de urato e peróxido de hidrogênio. As células (2×10^6) foram incubadas em 10 mM PBS (pH 7,4) com 5 mM de glicose com: fase móvel (FM), 200 μ M de peróxido de hidrogênio ou 200 μ M de hidroperóxido de urato por 10 min a 37°C. Análise de Western blot de (A) Prx1 e Prx2 do lisado de dTHP-1 (100 μ g/poço) e (B) Prx1, Prx2 e Trx1 do sobrenadante (10 μ g/poço) em SDS-PAGE não-redutor. Intensidade de banda semi-quantitativa do monômero (C) e dímero (D) de Prx1 no lisado; monômero (E) e dímero (F) de Prx2 no lisado; dímero de Prx1 no sobrenadante (G); dímero de Prx2 no sobrenadante (H) e Trx no sobrenadante (I). As bandas do lisado foram normalizadas por α -tubulina e as do sobrenadante foram expressas em porcentagem da área total. Cada barra representa a média $\pm$ erro padrão de três experimentos independentes. Análise estatística foi feita por análise de variância de uma via (ANOVA); seguida de teste de Newmann-Keuls, *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle. C: controle, FM: fase móvel, HOOU: hidroperóxido de urato. Os resultados são representativos de três experimentos.

Sendo a Trx1 substrato para a redução da Prx1 e Prx2, a sua oxidação leva à formação de ponte dissulfeto intramolecular (Cys32-Cys35) (DU *et al.*, 2013). Desse modo, a oxidação da Trx1 no ambiente celular poderia acontecer de duas formas: 1) diretamente pela reação desta proteína com o hidroperóxido

de urato e; 2) indiretamente ao reduzir a peroxiredoxina previamente oxidada pelo hidroperóxido de urato.

A incubação do hidroperóxido de urato por 10 min com as células ocasionou a liberação de Trx1 e de dímeros de Prx1 e Prx2. As Prxs e Trxs tornam-se superexpressas em resposta ao estresse oxidativo como um mecanismo para proteger as células do dano (KONDO *et al.*, 2004; MOWBRAY *et al.*, 2008). Neste sentido, o aumento de Trx1 no plasma ocorre em pacientes com condições clínicas crônicas de doenças associadas ao estresse oxidativo como angina instável (redução de fluxo sanguíneo para o músculo cardíaco) (MIYAMOTO *et al.*, 2003; HOKAMAKI *et al.*, 2005). Trx1 e Prx1 também foram associadas com outros marcadores de estresse oxidativo como a presença de mieloperoxidase e 8-oxi-guanidina em diferentes patologias (MARTINEZ-PINNA *et al.*, 2011; JIKIMOTO *et al.*, 2002). O aumento destas enzimas no plasma também já foi verificado em pacientes com aterosclerose e, de forma interessante foi demonstrado que Trx1 e Prx1 encontram-se colocalizadas com a subunidade p22phox da NADPH oxidase em placas de aterosclerose de carótidas humanas, sugerindo uma ligação entre a NADPH oxidase e os níveis de Trx1 e Prx1 (MADRIGAL-MATUTE *et al.*, 2015). Além disso, o estímulo de monócitos THP-1 e células CD14+ por PMA (12-miristato-13-acetato de forbol) também revelou a presença de Trx1 e Prx1 no sobrenadante, como este efeito foi revertido pelo uso de apocinina, inibidor da NADPH oxidase, acredita-se em um mecanismo baseado em eventos redox (MADRIGAL-MATUTE *et al.*, 2015). A forma truncada da Trx (Trx80) coexiste com a Trx1 não truncada e já foi visualizada em membranas de monócitos e no plasma (SAHAF *et al.*, 1997; PEKKARI *et al.*, 2000).

Já foi demonstrado que a liberação da Prx e da Trx ocorre por vesículas de exossomos (MADRIGAL-MATUTE *et al.*, 2015; MULLEN *et al.*; 2015). A Trx1 extracelular diminui a expressão de IL-1 β por monócitos e macrófagos em condições inflamatórias (BILLIET *et al.*, 2005), age como quimioatrativa para monócitos, neutrófilos e linfócitos (BERTINI *et al.*, 1999) e inibe a migração de neutrófilos para o sítio de inflamação (NAKAMURA *et al.*, 2000).

Dessa forma, foi sugerido que a Trx1 poderia ser um alvo terapêutico em doenças cardiovasculares (MAHMOOD *et al.*, 2013), assim a administração de Trx1 recombinante preveniu a miocardite induzida por miosina (LIU *et al.*, 2004) e a injeção de Trx1 diminuiu placas de aterosclerose em camundongos por promover a diferenciação de macrófagos em M2 (fenótipo anti-inflamatório) (EL HADRI *et al.*, 2012).

4.6. Avaliação do estado de oxidação da Prx1 e Prx2 na presença de ácido úrico

Uma vez que o ácido úrico tem sido descrito por ativar as células inflamatórias e contribuir para o *burst* oxidativo nestas células (BALDWIN *et al.*, 2011; SAUTIN *et al.*, 2007), torna-se importante a realização de experimentos controles na oxidação das Prxs utilizando-se o ácido úrico ao invés do hidróperóxido de urato. De acordo com a **Figura 28**, o ácido úrico (200 μ M) não causou oxidação das Prxs.

Figura 28. Oxidação da Prx1 e Prx2 em células dTHP-1 pelo ácido úrico.

As células (2×10^6) foram incubadas em 10 mM PBS (pH7,4) com 5 mM de glicose com: veículo (NaOH 0,4 mM) ou 200 μ M de ácido úrico por 10 min a 37°C. (A) Análise de Western blot de Prx1 e Prx2 do lisado celular (100 μ g/poço) em SDS-PAGE não-redutor. Intensidade da banda semi-quantitativa do monômero (B) e dímero (C) de Prx1 do lisado; monômero (D) e dímero (E) de Prx2 do lisado. As bandas do lisado foram normalizadas por α -tubulina. Cada barra representa a média $\pm$ erro padrão de três experimentos independentes. C: controle, V: veículo (NaOH), AU: ácido úrico.

Dessa forma, o ácido úrico por si não é capaz de alterar o estado de oxidação das Prx1 e Prx2, sendo necessário um ambiente propício para a formação do hidroperóxido de urato para ocorrer a oxidação. Neste sentido, a NADPH oxidase desempenha papel importante na geração de superóxido que irá se combinar com o radical urato formado pela MPO. De fato, foi demonstrado recentemente que a Trx1 e a Prx1 estão elevadas em pacientes com aterosclerose devido a ambas serem sensores do estresse oxidativo mediado pela NADPH oxidase (Nox) (MADRIGAL-MATUTE *et al.*, 2015). Neste ambiente o hidroperóxido de urato poderia potencializar o estresse oxidativo, sugerindo a Trx1 como um alvo possível nas células.

CAPÍTULO IV

O ÁCIDO ÚRICO INIBE A PRODUÇÃO DE ÁCIDO HIPOCLOROSO E A ATIVIDADE BACTERICIDA DE CÉLULAS HL-60 DIFERENCIADAS EM NEUTRÓFILOS

1. INTRODUÇÃO

O ácido úrico (7,9-di-hidro-1H-purina-2,6,8 (3H)-triona, **Figura 29**) é o produto final do metabolismo de purinas em seres humanos como mostra a **Figura 30** (BECKER *et al.*, 1993).

Figura 29. Estrutura do ácido úrico.

Figura 30. Representação esquemática do metabolismo de purinas. O ácido úrico é o produto final do metabolismo de purinas em humanos e alguns primatas, devido à ausência da enzima uricase. Na maioria dos mamíferos, o ácido úrico é convertido pela uricase em alantoína, um produto solúvel que é

eliminado pela urina. Na maioria dos peixes e anfíbios, a alantoína formada é degradada a ureia e glicoxalato, via ácido alantóico, pela alantoicase e alantoinase. Em alguns invertebrados marinhos e crustáceos, a ureia formada é hidrolisada a NH_3 e CO_2 pela urease. AMP: adenosina monofosfato, IMP: inosina monofosfato; GMP: guanosina monofosfato (Retirado de ÁLVAREZ-LARIO e MACARRÓN-VICENTE, 2011).

Devido à ausência da enzima uricase em seres humanos (SAUTIN *et al.*, 2007), o ácido úrico (ânion urato, pKa 5,4) acumula-se no plasma em concentrações que variam de 200 a 500 μM (AMES *et al.*, 1981), superiores às de ascorbato (40 a 80 μM , WITMER *et al.*, 2016). Em 1981, Ames e colaboradores propuseram que o ácido úrico atuava como um importante antioxidante do plasma (potencial de redução de um elétron = 0,59V, pH 7,0), o que poderia conferir proteção contra os agentes oxidantes e prevenir doenças relacionadas ao estresse oxidativo (AMES *et al.*, 1981). De fato, o ácido úrico é responsável por 60% da capacidade antioxidante do soro humano (HOWELL *et al.*, 1960). Porém, quase quarenta anos depois destas descobertas, o papel exato do ácido úrico ainda é assunto de debate já que, como outros antioxidantes, ele pode exibir também atividade pró-oxidante dependendo do microambiente.

Tendo em vista suas propriedades antioxidantes, foi amplamente aceito que seu acúmulo possuía uma vantagem evolutiva. O urato é capaz de quelar metais de transição, reagir com radical hidroxila, oxigênio singlete (AMES *et al.*, 1981) e ácido hipocloroso (BECKER *et al.*, 1991). Neste sentido, o urato preveniu a oxidação do ascorbato na presença de Fe^{2+} por agir como quelante (DAVIES *et al.*, 1986). Além disso, preveniu também a oxidação de tirosina e guanina, principais alvos do peroxinitrito (ONOO^-), um agente oxidante e nitrante gerado pela reação entre óxido nítrico e superóxido (WHITEMAN *et al.*,

lateral amiotrófica, doença de Parkinson e Alzheimer (KUTZING *et al.*, 2008; SCOTT E HOOPER, 2001).

Ainda neste contexto, o ácido úrico também foi relacionado a altos índices de inteligência, devido a sua estrutura semelhante aos estimuladores do cérebro, cafeína e teobromina. Foi sugerido que o ácido úrico, assim como outras purinas, poderia estimular o córtex cerebral, conferindo aos primatas mais evoluídos um nível de inteligência maior (SOFAER *et al.*, 1981). De fato, existe na literatura uma correlação significativa entre os níveis de ácido úrico e maior inteligência em crianças e jovens adultos (KASL *et al.*, 1970; CERVINI *et al.*, 1982; INOUE *et al.*, 1984), bem como uma correlação entre gota e maior inteligência (ÁLVAREZ-LARIO e MACARRÓN-VICENTE, 2010). Entretanto, tais dados são difíceis de separar de outros fatores como a alimentação e os hábitos associados à situação econômica, social e cultural (ÁLVAREZ-LARIO e MACARRÓN-VICENTE, 2010).

Outro fator que poderia ter sofrido influência positiva da repressão da enzima uricase, seria a manutenção da pressão sanguínea pelo urato. Observou-se que o aumento de ácido úrico no plasma, auxilia a manter a pressão estável em situações de baixa ingestão de sal. Isso está de acordo com a correlação encontrada entre altos níveis de ácido úrico e hipertensão (FEIG, 2014).

Por outro lado, apesar de possíveis fatores favoráveis ao aumento de ácido úrico no plasma, este evento evolutivo teve também algumas consequências negativas. Os níveis plasmáticos de ácido úrico acima de 420 μ M configuram hiperuricemia, uma condição que está associada à disfunção endotelial (KOHSLA *et al.*, 2005), diabetes (LYTVYN *et al.*, 2015), hipertensão (FEIG,

2014), inflamação (DUEWELL *et al.*, 2010), síndrome metabólica, diabetes, (HAYDEN *et al.*, 2004) e doença renal (OBERMAYR *et al.*, 2008). Algumas destas condições estão ligadas também ao estresse oxidativo (SAUTIN *et al.*, 2007). Neste sentido, o próprio urato tem sido relatado como causa do aumento do dano oxidativo (BOWRY e STOCKER, 1993; SANTOS *et al.*; 1999; FILIPE *et al.*; 2002).

Já foi demonstrado que o ácido úrico é capaz de inativar enzimas sensíveis ao estresse oxidativo. Na presença de radiação gama, uma concentração fisiológica de ácido úrico (240 μM) foi capaz de induzir a inativação do inibidor de protease A1AT (*alpha 1- antitrypsin*), uma proteína com características anti-inflamatórias (ARUOMA e HALLIWELL, 1989). Um mecanismo similar foi demonstrado para a enzima álcool desidrogenase de levedura (YALDH), uma concentração elevada de ácido úrico (1000 μM) junto com radiação resultou na oxidação da enzima (KITTRIDGE e WILSON, 1984). Foi hipotetizado para ambos os casos que a geração de radical urato seria o responsável pela inativação, sendo que a adição de ascorbato protegeu a enzima A1AT (ARUOMA e HALLIWELL, 1989).

O ácido úrico pode agir como antioxidante ou pró-oxidante na oxidação de LDL na presença de CuSO_4 . Se for adicionado durante a oxidação induzida por CuSO_4 , aumenta a resistência à oxidação, mas se for adicionado antes, a potencializa (BAGNATI *et al.*, 1999). Metais livres são raros no soro, mas existem evidências que estão presentes em placas ateroscleróticas (SMITH *et al.*, 1992). Em casos de hiperuricemia (500 μM), o urato dobrou a oxidação de LDL induzida por peroxinitrito, um resultado fisiologicamente relevante tanto

pelos níveis de urato, quanto pela ligação da oxidação da LDL com aterosclerose (SANTOS *et al.*, 1999).

Assim, o ácido úrico foi relacionado com doenças cardiovasculares, sendo encarado como um fator independente de risco ou como um efeito colateral da doença. De fato, a associação entre hiperuricemia e doença cardiovascular é geralmente fraca na população, porém o risco aumenta em pacientes com alta probabilidade de doença cardiovascular, como diabéticos, hipertensos e sobreviventes de infarto ou derrame (WEN *et al.*, 2010; KIVITY *et al.*, 2013; ZALAWADIYA *et al.*, 2015; ITO *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2015; KAWAI *et al.*, 2012; HAMAGUCHI *et al.*, 2011; LEVANTESI *et al.*, 2013).

Outra reação importante é a do ácido úrico com o óxido nítrico (NO), formando 6-aminouracil. Esta reação depleta este importante agente sinalizador e relaxante das artérias e pode ser um mecanismo pelo qual o ácido úrico esteja envolvido na inflamação, já que esta reação aconteceu quando o NO foi borbilhado em tampão, soro humano ou lisado celular de células endoteliais contendo urato (ZHARIKOV *et al.*, 2008; MAXWELL *et al.*, 2001; GERSCH *et al.*, 2008). Além da reação direta, o ácido úrico também pode afetar a síntese de NO pela diminuição de seu precursor L-arginina. O ácido úrico aumenta a afinidade da enzima arginase por seu substrato L-arginina, consumindo e diminuindo sua disponibilidade (ZHARIKOV *et al.*, 2008).

Dada sua solubilidade limitada no soro, o ácido úrico pode formar cristais e é bem estabelecido que o cristal de urato monossódico (MSU) ativa a via do inflamassoma NLRP3, atuando como um agente pró-inflamatório na doença gota (DUEWELL *et al.*, 2010), embora a hiperuricemia, mesmo sem deposição de cristal está fortemente associada com aumento do risco de mortalidade

(SAUTIN *et al.*, 2007). Recentemente, foi demonstrado que o próprio ácido úrico solúvel pode também ativar o inflamassoma NLRP3 (BRAGA *et al.*, 2017). Mesmo em concentrações fisiológicas, o ácido úrico solúvel pode induzir a expressão gênica de quimiocinas e fatores de crescimento, como a proteína quimioatrativa de monócitos 1 (MCP-1) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF, KANAELLIS *et al.*, 2003; WATANABE *et al.*, 2002). Outras citocinas também podem ter sua expressão aumentada pelo urato, como a ciclooxigenase-2, fosfolipase citossólica A2, interleucina 1 α e 1 β (KANG *et al.*, 2002; HAN *et al.*, 2007; KANELIS *et al.*, 2003; NETEA *et al.*, 1997; RONCAL *et al.*, 2007). Um estudo anterior revelou que o urato liberado de células em processo de morte, pode iniciar uma resposta inflamatória que leva ao recrutamento de neutrófilos (KONO *et al.*, 2010) e acredita-se que o ácido úrico atue como um sinal de perigo que regula a inflamação (SHI, 2010). Além disso, foi demonstrado que as armadilhas extracelulares de neutrófilos (*neutrophil extracellular traps*, NETs) também podem ser influenciadas pelo urato (ARAI *et al.*, 2014). Os efeitos fisiológicos do urato supostamente envolvem vias redox complexas. A expressão de MCP-1 induzida por urato em VCMC foi atenuada por antioxidantes, sugerindo um mecanismo redox dependente (KANELIS *et al.*; 2003). O paradoxo do ácido úrico é dado porque é ele um antioxidante fora da célula agindo como um *scavenger*, mas dentro da célula pode ser um agente pró-oxidante, formando radicais livres (MARTYN *et al.*, 2006) ou em combinação com peroxinitrito (SANTOS *et al.*, 1999).

Dada sua relevância, os efeitos do ácido úrico já foram estudados em diferentes tipos celulares. Em células do músculo liso vascular o ácido úrico ativa vias inflamatórias e estimula a proliferação. Em células do endotélio,

diminui a disponibilidade de NO e inibe a migração e proliferação celular (KANG *et al.*, 2005; YU *et al.*, 2010; SANCHEZ-LOZADA *et al.*, 2008). Em células do túbulo renal, induz a transição epitélio-mesenquimal (EMT) e apoptose (YU *et al.*, 2013). Em hepatócitos e adipócitos, ativa a NADPH oxidase (CHOI *et al.*, 2014 SAUTIN *et al.*, 2007). Em relação aos neutrófilos, o urato é substrato para a mieloperoxidase (MPO). A oxidação do urato pela MPO gera o radical urato, que se combina com superóxido para formar um potente agente oxidante, o hidropéroxido de urato (MEOTTI *et al.*, 2011). Considerando os níveis de urato em fluidos biológicos humanos, bem como a expressão de MPO em neutrófilos, espera-se uma quantidade significativa de hidropéroxido de urato durante o *burst* oxidativo. Além disso, o urato também é substrato da lactoperoxidase (LPO), enzima com função bactericida secretada pelas glândulas mamárias, salivares e de mucosas (SEIDEL *et al.*, 2014).

Neste contexto, a produção de hidropéroxido de urato pelos neutrófilos poderia aumentar a capacidade microbicida destas células. Assim, o hidropéroxido de urato gerado imitaria o papel do HOCl e outros oxidantes na eliminação de patógenos. Para testar tal hipótese, neste capítulo comparou-se a atividade microbicida de células HL-60 diferenciadas em neutrófilos (dHL-60) e THP-1 diferenciadas em macrófagos (dTHP-1) na presença ou ausência de ácido úrico, o precursor do hidropéroxido de urato sobre a *Pseudomonas aeruginosa* (PA14). A *P. aeruginosa* é uma bactéria gram-negativa frequentemente associada à resistência a antibióticos que pode infectar desde animais até plantas. Este patógeno oportunista é uma das principais causas de infecção hospitalar, bem como em pacientes com infecção pulmonar crônica na fibrose cística (BREIDENSTEIN *et al.*, 2011).

2. OBJETIVOS

Este capítulo tem como objetivo o estudo dos efeitos do ácido úrico e seu intermediário metabólico hidróperóxido de urato sobre a capacidade microbicida de células de neutrófilos (dHL-60) e macrófagos (dTHP-1) incubadas com *Pseudomonas aeruginosa*.

Objetivos específicos:

- Determinar a capacidade microbicida das células dHL-60 e dTHP-1 contra *Pseudomonas aeruginosa* na presença e ausência de ácido úrico;
- Avaliar o efeito do ácido úrico sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias interleucina 1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) pelas células dHL-60 e dTHP-1;
- Estudar uma possível citotoxicidade do ácido úrico e/ou seus intermediários metabólicos sobre as células dHL-60;
- Analisar a quantidade de espécies oxidantes totais produzidas na incubação das bactérias com dHL-60 na presença ou ausência de ácido úrico;
- Examinar o efeito do ácido úrico na produção de ácido hipocloroso durante a incubação das bactérias com dHL-60.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultura de células humanas

Células leucêmicas promielocíticas humanas (HL-60; BCRJ, RJ, Brasil) foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino (SFB 20%), estreptomicina (100 µg/mL) e penicilina (100 U/mL), em atmosfera umidificada a 37°C e 5% de CO₂. A concentração desejada de células HL-60 foi diferenciada em neutrófilos (dHL-60) pela adição de dimetilsulfóxido (DMSO 1,3%) no mesmo meio de cultura, agora suplementado com apenas 10% de SFB. As células foram mantidas neste meio por 5 dias, nas mesmas condições de temperatura e atmosfera citadas. Para a realização dos experimentos, as células foram lavadas duas vezes com solução salina estéril (NaCl 0,9%). Assim, centrifugou-se a suspensão celular por 10 min a 1400 rpm e o sobrenadante foi descartado. 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 meio de cultura RPMI 1640 suplementado com SFB 20% sem adição de antibióticos.

Células leucêmicas promielocíticas humanas (THP-1; BCRJ, RJ, Brasil) foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640, suplementado com SFB 20%, estreptomicina (100 µg/mL) e penicilina (100 U/mL), em atmosfera umidificada a 37°C e 5% de CO₂. A quantidade desejada de células THP-1 foi diferenciada em macrófagos (dTHP-1) em placas de 12 ou 24 poços pela adição de PMA (5 ng/mL) no mesmo meio de cultura. As células foram mantidas neste meio por 48 h, nas mesmas condições de temperatura e atmosfera citadas. Para a realização dos experimentos, o meio de cultura foi retirado e adicionado o conteúdo desejado. As células diferenciadas (dHL-60 ou dTHP-1) foram

contadas em câmara de Neubauer utilizando-se azul de tripan para exclusão de células mortas.

3.2. Cultura de células bacterianas

As células de *P. aeruginosa* PA14 (PA14) foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) por aproximadamente 18 h sob agitação de 200 rpm a 37°C. Após este período, foram diluídas para a densidade óptica de 0,1 ($D.O_{600nm}=0,1$) e novamente incubadas até a $D.O_{600nm}=0,4$ (aproximadamente 1 h) para o ensaio de atividade antibacteriana). Para os ensaios de secreção de IL-1 β e TNF- α e de *clearance* bacteriano na infecção *in vitro*, as células sofreram os mesmos procedimentos, sendo novamente incubadas até $D.O_{600nm}=2,0$ (aproximadamente 5 h).

3.3. Ensaio de *clearance* bacteriano na presença de dHL-60 e dTHP-1

Para avaliação da viabilidade celular bacteriana após a infecção, células de PA14 foram cultivadas como descrito anteriormente. As células diferenciadas em neutrófilos (dHL-60) ou em macrófagos (dTHP-1, 2×10^6 cél/poço) foram infectadas com PA14 (2×10^7 cél/poço), com multiplicidade de infecção (MOI) de 10 em meio RPMI sem antibiótico. Foram recolhidas alíquotas do sobrenadante nos tempos 1, 2 e 3h. As alíquotas foram devidamente diluídas e aplicadas (10 μ L) em placas contendo meio de cultura ágar LB. As placas foram incubadas a 37°C por 16-18h. A viabilidade celular bacteriana foi determinada pela contagem de unidades formadoras de colônia (UFC).

3.4. Ensaio de viabilidade por LDH

Para avaliar uma possível citotoxicidade do ácido úrico e/ou seus intermediários metabólicos sobre as células dHL-60 incubadas com *P. aeruginosa* 14, foi realizada a incubação nas mesmas condições descritas anteriormente. Após o período de infecção (3 h), a placa foi centrifugada 200 *g* por 5 min e o sobrenadante foi recolhido. A citotoxicidade foi verificada pela atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) liberada pelas dHL-60 no sobrenadante. Para tal, foi utilizado o kit Cytotox 96 Nonradioactive Cytotoxicity Assay (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante.

3.5. Detecção de espécies oxidantes totais com a sonda fluorescente dihidrorodamina 123 (DHR)

Para avaliar o estado oxidativo, células dHL-60 (1×10^6) e PA14 (1×10^7) foram incubadas na presença de 5 μM de DHR 123 e 200 e 500 μM de ácido úrico em 10 mM de tampão fosfato salino pH7,4 contendo glicose, Ca^{2+} e Mg^{2+} a 37°C com agitação suave. Após 1 h, as células foram lavadas e a intensidade de fluorescência foi medida em leitor de microplaca (Tecan, Switzerland), usando 500 nm para excitação e 536 nm para emissão.

3.6. Avaliação da formação do ácido hipocloroso

A formação de ácido hipocloroso (HOCl) foi medida a partir da oxidação da sonda R-19S como descrito anteriormente (YOON *et al.*, 2011). Para o ensaio de cinética, 1×10^6 células dHL-60 foram incubadas com PA14 com uma multiplicidade de infecção (MOI) de 10 na presença da sonda R19-S (10 μM) e ácido úrico (0,5 mM) a 37°C em uma placa de 96 poços apropriada para fluorescência. A leitura foi realizada utilizando 515 nm para excitação e 545 nm para emissão durante 4h.

Para a avaliação da formação de HOCl por imagens, as células dHL-60 (5×10^6) foram incubadas com *P. aeruginosa* 14 com uma MOI de 10 na presença de R19-S (10 μ M) e ácido úrico (0,5 mM) a 37 °C durante 1 hora. As células foram centrifugadas a 1400 rpm durante 10 minutos e lavadas em 10 mM de tampão fosfato salino pH7,4. Foram adicionados 200 μ L de paraformaldeído a 1,3% e incubados à temperatura ambiente durante 15 minutos. As células foram lavadas novamente em tampão fosfato salino e incubadas com 4', 6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) por 15 min. Após este período, as células foram lavadas com tampão fosfato salino e ressuspensas em meio de montagem Fluor Mount e espalhadas sobre uma lâmina de microscópio. As imagens foram adquiridas sob um microscópio confocal LSM 780-NLO (Carl Zeiss, Alemanha) e a intensidade de fluorescência de 5 campos diferentes foi quantificada com o software de imagem ImageJ.

3.7. Liberação de IL-1 β e TNF- α por dHL-60 e dTHP-1

Para a avaliação da liberação das citocinas Interleucina-1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), as células de PA14 foram cultivadas como descrito anteriormente. As células dHL-60 e dTHP-1 (2×10^6 células/poço) foram incubadas com PA14 (2×10^7 células/poço), com multiplicidade de infecção (MOI) de 10 em placas de 6 poços com concentrações crescentes de ácido úrico (0; 0,2; 0,5 e 2,0 mM) por 3 h a 37°C. Após este período, o sobrenadante foi recolhido, centrifugado a 3200 rpm por 5 min a 4°C e submetido à análise das citocinas. A quantificação de IL-1 β e TNF- α foi feita pelo ensaio de Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) de acordo com as recomendações do fabricante (R&D systems).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. O ácido úrico inibe a capacidade microbicida e diminui a liberação de citocinas por células dHL-60 e dTHP-1

A infecção bacteriana ativa o *burst* inflamatório e leva a produção de oxidantes pelas células do sistema imune inato e, consequentemente, um ambiente pró-oxidante para eliminar patógenos (MCKENNA *et al.*, 1988). Considerando o caráter oxidante do hidropéroxido de urato e sabendo que ele pode ser produzido durante o *burst* inflamatório, uma das hipóteses levantadas foi que o hidropéroxido de urato poderia ter atividade microbicida. Nesta situação, o hidropéroxido de urato gerado imitaria o papel do HOCl e outros oxidantes na eliminação de patógenos. Para testar essa hipótese, comparou-se a atividade microbicida de macrófagos e neutrófilos sobre a PA14 na presença ou ausência de ácido úrico, o precursor do hidropéroxido de urato. Foram testadas crescentes concentrações de urato (0-2 mM) e os resultados apresentados na **Figura 32** mostram que, ao contrário do inicialmente proposto, a presença de ácido úrico no sistema aumentou a viabilidade das bactérias.

A

FIGURA 32: CONTINUA NA PÁGINA SEGUINTE

B

Figura 32. O ácido úrico impediu a atividade bactericida de células dTHP-1 (A) e dHL-60 (B). Cada barra representa a média $\pm$ erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes. A análise estatística foi feita por variância (ANOVA) seguida de teste de Newman-Keuls; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo sem urato e ### $p < 0,001$ quando comparado ao grupo sem dHL-60 ou dTHP-1. Os experimentos foram feitos em triplicata. UFC: unidade formadora de colônia.

Além de inibir a atividade microbica, o ácido úrico também inibiu de forma drástica a liberação do fator de necrose tumoral α (TNF- α) e, em menor escala, a liberação da interleucina-1 β (IL-1 β) (**Figura 33**).

FIGURA 33: CONTINUA NA PÁGINA SEGUINTE

Figura 33. O ácido úrico prejudica a liberação de citocinas TNF- α e IL-1 β em dTHP-1 (A e B) e dHL-60 (C e D) induzida por *P. aeruginosa*. Cada barra representa a média $\pm$ erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes. Análise estatística feita por variância (ANOVA) seguida de teste de Newman-Keuls; *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo sem urato. Os experimentos foram feitos em triplicata.

Alguns antioxidantes endógenos ou exógenos já mostraram ter efeitos na liberação de citocinas. A melatonina pode reduzir significativamente a ativação de NF- κ B induzida por TNF- α (SASAKI *et al.*, 2002). A quercetina preveniu a produção de IL-1 β induzida por carregenina (VALÉRIO *et al.*; 2009). A N-acetilcisteína (NAC) e as vitaminas A, E e C, juntamente com o alopurinol, inibidor da xantina oxidase (produtora de H₂O₂ e O₂⁻), diminuíram os níveis de IL-1 β , TNF α e IL-6 em resposta ao exercício (VASSILAKOPOULOS *et al.*, 2003). Além disso, a NAC diminuiu também a liberação de TNF- α causada pela infecção por *P. aeruginosa* (KAIHAMI *et al.*, 2014).

4.2. Viabilidade celular na presença de ácido úrico e *P. aeruginosa*

Uma vez que o urato afetou a capacidade microbicida e a liberação de citocinas das dHL-60 e dTHP-1, hipotetizou-se que o ácido úrico e/ou seus intermediários metabólicos poderiam estar promovendo a morte destas células, então foi realizado como controle um ensaio de lactato desidrogenase para se

avaliar a viabilidade das células dHL-60. Em todas as concentrações testadas, o urato não interferiu na viabilidade das células, portanto, a redução na atividade microbicida e na liberação de citocinas não se deve à diminuição na viabilidade celular como mostra a **Figura 34**.

Figura 34. O ácido úrico não diminui a viabilidade celular. Lactato desidrogenase (LDH) liberada de células dHL-60 incubadas com concentrações crescentes de urato (0; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0 e 2,0 mM, à esquerda) e com *P. aeruginosa* 14 (à direita) por 3h a 37°C. A análise estatística foi feita por variância (ANOVA) seguida de teste de Newman-Keuls. Cada barra representa a média $\pm$ erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes. NS: não significativo.

4.3. Produção de espécies oxidantes por células dHL-60 na presença de *P. aeruginosa* e ácido úrico

O ácido hipocloroso é considerado o mais potente microbicida gerado pelos neutrófilos (KLEBANOFF, 1968; WINTERBOURN e KETTLE, 2013; KLEBANOFF *et al.*, 2013). Uma vez que o ácido úrico também é substrato para a enzima mieloperoxidase, um dos mecanismos que explicaria a redução da atividade microbicida seria que a competição entre o ácido úrico e o cloreto estaria levando a uma diminuição na síntese do ácido hipocloroso e, portanto, diminuindo a ação deste agente sobre as bactérias. Outro fator possível seria a

reação direta de neutralização do ácido hipocloroso pelo urato (BECKER *et al.*, 1991). Neste sentido, foi realizado um ensaio com a sonda fluorescente DHR para detecção de espécies reativas totais. Na presença de urato estas espécies foram diminuídas significativamente, como mostrado na **Figura 35**.

Figura 35. Ácido úrico atenua a produção de oxidantes gerados por dHL-60 na incubadas com *P. aeruginosa* 14. Células HL-60 (1×10^6) foram infectadas com a bactéria (MOI 10) e incubadas com DHR 5 μ M e ácido úrico 200 ou 500 μ M em 10 mM de tampão fosfato salino pH 7,4 suplementado com glicose a 37 °C com agitação suave, após 1 h, as células foram lavadas e a intensidade intracelular de fluorescência foi medida. Análise estatística foi feita por variância (ANOVA) seguida de teste de Newman-Keuls; ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ quando comparado ao controle sem urato e com *P. aeruginosa*. Cada barra representa média $\pm$ erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes.

Para confirmar que o efeito seria no ácido hipocloroso, utilizou-se uma sonda fluorescente que é permeável à membrana celular e que reage especificamente com o ácido hipocloroso, a R-19S (CHEN *et al.*, 2011). Foram avaliadas a produção nas células após 1h de infecção por microscopia confocal e a cinética de geração de ácido hipocloroso. De acordo com a **Figura 36A e 36B**, as células dHL-60 produzem o ácido hipocloroso no interior do fagossomo e a presença de ácido úrico diminuiu tanto em intensidade quanto em número,

os focos de fluorescência observados, mostrando um efeito inibitório do ácido úrico sob a produção de ácido hipocloroso nas células. A quantificação da fluorescência em diferentes campos da microscopia revelou uma diminuição significativa nos níveis de ácido hipocloroso. A fluorescência total oriunda da reação da sonda R19-S com o ácido hipocloroso também foi quantificada através de um leitor de placa. Conforme ilustrado na **Figura 36C**, tanto o ácido úrico quanto o inibidor da mieloperoxidase, o ácido 4-aminobenzóico hidrazida (ABAH), reduziram significativamente a produção de ácido hipocloroso. Foi realizado também um controle de ativação das células dHL-60 com PMA (**Figura 36D**).

A

FIGURA 36: CONTINUA NA PÁGINA SEGUINTE

Figura 36. Análise da produção de ácido hipocloroso por células dHL-60. (A) As células foram incubadas com 0,5 mM de ácido úrico e *P. aeruginosa* 14 por 1h a 37° C na presença de R19-S e analisadas por microscopia confocal. As imagens são representativas de três experimentos independentes. (B) Total da intensidade de fluorescência de cinco campos diferentes no microscópio. Cada barra representa a média $\pm$ erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes. Análise estatística feita por variância (ANOVA) seguida de teste de Newman-Keuls, $*p < 0,01$; $**p < 0,001$ comparado ao controle. (C) Cinética de produção de ácido hipocloroso na presença de *P. aeruginosa* e ácido úrico. ABAH 4-Aminobenzoic acid hydrazide. (D) Controle da sonda R19S utilizando PMA para ativação das células dHL-60.

A capacidade de um antioxidante interferir na ação e/ou produção de HOCl foi previamente demonstrada. A quercetina e a naringenina prejudicaram a atividade microbica dos neutrófilos atuando como neutralizador de HOCl (quercetina) e inibidor de MPO (naringenina) (NISHIMURA *et al.*, 2013). A billirrubina também atuou como neutralizador e atenua a atividade bactericida dos neutrófilos na infecção por *Escherichia coli* (ARAI *et al.*, 2001).

O ácido úrico atua como neutralizador de HOCl em uma reação de oxido-redução de 2 elétrons com constante de velocidade de $3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Nesta reação forma-se o 5-clorurato como produto principal e a alantoína como produto secundário (SQUADRITO *et al.*, 2010). Por outro lado, o urato atua como um substrato fisiológico para a MPO que compete com o cloreto para oxidação e, na presença de superóxido, espera-se que o hidroperóxido de urato seja formado (MEOTTI *et al.*, 2011). A constante de velocidade da reação do urato com o composto I da MPO ($k = 4,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (MEOTTI *et al.*, 2011) demonstra que este substrato pode competir com cloreto ($k = 2,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (FURTMULLER *et al.*, 1998). Em pacientes com hiperuricemia, a concentração de urato é mais elevada e, como a solubilidade máxima de urato no plasma foi determinada como sendo $940 \pm 345 \text{ } \mu\text{M}$ (DORNER *et al.*, 1981), é possível que HOCl permaneça como o principal espécie oxidante produto da MPO, mas o radical urato será produzido em quantidades substanciais.

Uma vez que as constantes de velocidade para as reações de ácido úrico com composto I da MPO e ácido úrico com HOCl apresentam a mesma ordem de grandeza ($10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), espera-se que o ácido úrico atue tanto como neutralizador de HOCl quanto como competidor com o cloreto pelo composto I da MPO, prejudicando de duas maneiras a produção de HOCl.

Reunidos, estes experimentos mostram que o ácido úrico diminui a capacidade microbida das células imunes e esta diminuição está relacionada à diminuição nos níveis de HOCl. Portanto, estes resultados colocam em dúvida a adoção de terapias antioxidantes, principalmente na presença de infecções bacterianas.

CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados apresentados, esta tese pôde contribuir com evidências experimentais sobre os efeitos do ácido úrico e do hidroperóxido de urato sobre células do sistema imune inato (dHL-60 e dTHP-1), eritrócitos e as proteínas peroxiredoxinas 1 e 2, albumina e tioredoxina.

O ácido úrico apesar de ser um importante antioxidante plasmático pode interferir na produção de ácido hipocloroso e prejudicar a morte de bactérias em uma infecção. Ao mesmo tempo em que age como um competidor pela MPO possibilita a formação do hidroperóxido de urato que é capaz de oxidar seletivamente aminoácidos contendo enxofre.

Neste sentido, o hidroperóxido de urato foi capaz de reagir com a albumina cerca de 9 vezes mais rápido do que o peróxido de hidrogênio ($0,2 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para o HOOU com a albumina bovina e $2,26 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para o H_2O_2) e com a tioredoxina cerca de 270 vezes mais rápido que o peróxido de hidrogênio ($2,8 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para o HOOU e $1,05 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para o H_2O_2 com Trx de *E. coli*). No caso das peroxiredoxinas 1 e 2, ele reage em significativa ordem de grandeza quando comparado ao peróxido de hidrogênio ($4,9 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e $2,26 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para o HOOU e $3,8 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e $2,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para o H_2O_2 , respectivamente). A incubação do hidroperóxido de urato com eritrócitos ou macrófagos humanos (dTHP-1) mostrou que este produto do ácido úrico é capaz de permeabilizar a membrana, oxidar as peroxiredoxinas e promover sua liberação, um sinal de estresse celular.

Tendo em vista a abundância da albumina no plasma, o papel sinalizador da tioredoxina e a alta reatividade das peroxiredoxinas no citoplasma, essas proteínas podem ser um alvo provável para a oxidação pelo

hidroperóxido de urato no ambiente inflamatório. Tal fato pode contribuir para o agravamento do estresse oxidativo, afetar a função celular e ser um evento chave nos efeitos pró-oxidantes e pró-inflamatórios do ácido úrico solúvel, provocado na verdade por seu produto de oxidação, o hidroperóxido de urato. A imagem abaixo resume os dados obtidos nesta tese.

6. REFERÊNCIAS

- ADIMORA, N.J.; JONES, D.P.; KEMP, M.L. A model of redox kinetics implicates the thiol proteome in cellular hydrogen peroxide responses. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 13, p. 731-743, 2010.
- AGO, T.; LIU, T.; ZHAI, P.; CHEN, W.; LI, H.; MOLKENTIN, J.D.; VATNER, S.F.; SADOSHIMA, J. A redox-dependent pathway for regulation of class II HDACs and cardiac hypertrophy. **Cell**, v. 133, p. 978-993, 2008.
- AGO, T.; SADOSHIMA, J. Thioredoxin and ventricular remodeling. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 41, p. 762-773, 2006.
- ALLISON, W.S. Formation and reactions of sulfenic acids in proteins. **Accounts of Chemical Research**, v.9, p. 293-299, 1976.
- ALVAREZ B.; FERRER-SUETA G.; FREEMAN B. A.; RADİ R. Kinetics of peroxynitrite reaction with amino acids and human serum albumin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 842-848, 1999.
- AMES, B.N.; CATHCART, R.; SCHWIERS, E.; HOCHSTEIN, P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, p. 6858-6862, 1981.
- ANDERSSON A.; ISAKSSON A.; BRATTSTROM L.; HULTBERG B. Homocysteine and other thiols determined in plasma by HPLC and thiol-specific postcolumn derivatization. **Clinical Chemistry**, v. 39, p. 1590-1597, 1993.
- ARAI, T.; YOSHIKAI, Y.; KAMIYA, J.; NAGINO, M.; UESAKA, K.; YUASA, N.; ODA, K.; SANO, T.; NIMURA, Y. Bilirubin impairs bactericidal activity of neutrophils through an antioxidant mechanism in vitro. **Journal of Surgical Research**, v. 96, p. 107-113, 2001.
- ARAI, Y.; NISHINAKA, Y.; ARAI, T.; MORITA, M.; MIZUGISHI, K.; ADACHI, S.; TAKAORI-KONDO, A.; WATANABE, T.; YAMASHITA, K. Uric acid induces NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 443, p. 556-561, 2014.
- ARUOMA, O. I.; HALLIWELL, B. Inactivation of α_1 -antiproteinase by hydroxyl radicals. The effect of uric acid. **FEBS Letters**, v. 244, p. 76-80, 1989.
- ARUTYUNOVA, E.I.; DANSHINA, P.V.; DOMNINA L.V.; PLETEN, A.P.; MURONETZ, V.I. Oxidation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase enhances its binding to nucleic acids. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 307, p. 547-52, 2003.
- 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. **Biochemical Journal**, v. 340, p. 143-52, 1999.

BALDWIN, W., MCRAE, S., MAREK, G., WYMER, D., PANNU, V., BAYLIS, C., JOHNSON, R. J., AND SAUTIN, Y. Y. Hyperuricemia as a mediator of the proinflammatory endocrine imbalance in the adipose tissue in a murine model of the metabolic syndrome. **Diabetes**, v.60, p. 1258-1269, 2011.

BAYER, S.B.; MAGHZAL, G.; STOCKER, R.; HAMPTON, M.B.; WINTERBOURN, C.C. Neutrophil-mediated oxidation of erythrocyte peroxiredoxin 2 as a potential marker of oxidative stress in inflammation. **The FASEB Journal**, v. 27, p. 3315-3322, 2013.

BAYER, SIMONE BIRGIT. Redox state of erythrocyte peroxiredoxin 2 during oxidative stress and its effect on membrane binding [tese]. Christchurch, Nova Zelândia: University of Otago, 2015. Disponível em: <https://ourarchive.otago.ac.nz/handle/10523/5786>.

BECKER, B.F. Towards the physiological function of uric acid. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 14, p. 615-631, 1993.

BECKER, B.F.; REINHOLZ, N.; LEIPERT, B.; RASCHKE, P.; PERMANETTER, B.; GERLACH, E. Role of uric acid as an endogenous radical scavenger and antioxidant. **Chest Journal**, v. 100, p. 176S-181S, 1991.

BERG A.H.; SCHERER P.E. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. **Circulation Research**, v. 96, p. 939-949, 2005.

BERNDT, C.; LILLIG, C.H.; HOLMGREN, A. Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems: implications for diseases in the cardiovascular system. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v. 292, p. H1227-H1236, 2007.

BERTINI, R.; HOWARD, O.M.; DONG, H.F.; OPPENHEIM, J.J.; BIZZARRI, C.; SERGI, R.; CASELLI, G.; PAGLIEI, S.; ROMINES, B.; WILSHIRE, J.A.; MENGGOZZI, M.; NAKAMURA, H.; YODOI, J.; PEKKARI, K.; GURUNATH, R.; HOLMGREN, A.; HERZENBERG, L.A.; HERZENBERG, L.A.; GHEZZI, P. Thioredoxin, a redox enzyme released in infection and inflammation, is a unique chemoattractant for neutrophils, monocytes, and T cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 189, p. 1783-1789, 1999.

BERTOLDI, M. Human peroxiredoxins 1 and 2 and their interacting protein partners: through structure toward functions of biological complexes. **Protein & Peptide Letters**, v. 23, p. 69-77, 2016.

BILLIET, L.; FURMAN, C.; LARIGAUDERIE, G.; COPIN, C.; BRAND, K.; FRUCHART, J.C.; ROUIS, M. Extracellular human thioredoxin-1 inhibits lipopolysaccharide-induced interleukin-1 β expression in human monocyte-derived macrophages. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 40310-40318, 2005.

BITEAU, B.; LABARRE, J.; TOLEDANO, M.B. ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin **Nature**, v. 425, p. 980-984, 2003.

BOWRY, V. W.; STOCKER, R. **Journal of American Chemical Society**, v. 115, p. 6029–6044, 1993.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAGA, T.T.; FORNI, M.F.; CORREA-COSTA, M.; RAMOS, R.N.; BARBUTO, J.A.; BRANCO, P.; CATOLDI, A.; HIYANE, M.I.; DAVANSO, M.R.; LATZ, E.; FRANKLIN, B.S.; KOWALTOWSKI, A.J.; CAMARA, N.O.S. Soluble uric acid activates the NLRP3 inflammasome. **Scientific Reports**, v. 7, p. 39884-39898, 2017.

BREIDENSTEIN, E.B.M.; FUENTE-NÚÑEZ, C.; HANCOCK, R.E.W. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. **Trends in Microbiology**, v. 19, p. 419-426.

CANELLAKIS, E. S., TUTTLE, A. L., AND COHEN, P. P. A comparative study of the end-products of uric acid oxidation by peroxidases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 213, p. 397–404, 1955.

CAO, J.; SCHUTLE, J.; KNIGHT, A.; LESLIE, N.R.; ZAGOZDZON, A.; BRONSON, R.; MANEVICH, Y.; BEESON, C.; NEUMANN, C.A. Prdx1 inhibits tumorigenesis via regulating PTEN/AKT activity. **The EMBO Journal**, v. 28, p. 1505-1517, 2009.

CARBALLAL, S.; ALVAREZ, B.; TURELL, L.; BOTTI, H.; FREEMAN, B.A.; RADI, R. Sulfenic acid in human serum albumin. **Amino acids**, v.32, p. 543-551, 2007.

CARBALLAL, S.; RADI, R.; KIRK, M.C.; BARNES, S.; FREEMAN, B.A.; ALVAREZ, B. Sulfenic acid formation in human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxynitrite. **Biochemistry**, v. 42, p. 9906–9914, 2003.

CASAGRANDE, S.; BONETTO, V.; FRATELLI, M.; GIANAZZA, E.; EBERINI, I.; MASSIGNAN, T.; SALMONA, M.; CHANG, G.; HOLMGREN, A.; GHEZZI, P. Glutathionylation of human thioredoxin: a possible crosstalk between the glutathione and thioredoxin systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 9745-9749, 2002.

CERVINI C.; ZAMPA A.M. Uric acid and intelligence. **Annals of the Rheumatic Disease**, v. 41, p. 435, 1982.

CHEN, J.; HUI, S.T.; COUTO, F.M.; MUNGRUE, I.N.; DAVIS, D.B.; ATTIE, A.D.; LUSIS, A.J.; DAVIS, R.A.; SHALEV, A. Thioredoxin-interacting protein deficiency induces Akt/Bcl-xL signaling and pancreatic beta-cell mass and protects against diabetes. **The FASEB Journal**, v. 22, p. 3581–3594, 2008.

CHEN, X.; LEE, K.A.; HA, E.M.; LEE, K.M.; SEO, Y.Y.; CHOI, H.K.; KIM, H.N.; KIM, M.J.; CHO, C.S.; LEE, S.Y.; LEE, W.J.; YOON, J. A specific and sensitive method for detection of hypochlorous acid for the imaging of microbe-induced HOCl production. **Chemical Communications**, v. 47, p. 4373-4375, 2011.

CHENG, Z.; ZHANG, J.; BALLOU, D.P.; WILLIAMS, C.H. Reactivity of thioredoxin as a protein thiol-disulfide oxidoreductase. **Chemical Reviews**, v. 111, p. 5768–5783, 2011.

CHOI Y.J.; SHIN H.S.; CHOI H.S.; PARK J.W.; JO I.; OH E.S. Uric acid induced fat accumulation via an induction of endoplasmic reticulum stress and SREBP-1c activation in hepatocyte. **Lab Investigation**, v. 10, p. 1114-1125, 2014.

CLAIBORNE, A.; MILLER, H.; PARSONAGE, D.; ROSS, R.P. Protein-sulfenic acid stabilization and function in enzyme catalysis and gene regulation. **Faseb Journal**, v. 7, p. 1483–1490, 1993.

CLAUSEN M.R., HUVAERE K, SKIBSTED L.H., STAGSTED J (2010). Characterization of peroxides formed by riboflavin and light exposure of milk. Detection of urate hydroperoxide as a novel oxidation product. **J. Agric. Food Chem.** 58: 481-487.

COX, A.G.; PESKIN, A.V.; PATON, L.N.; WINTERBOURN, C.C.; HAMPTON, M.B. Redox potential and peroxide reactivity of human peroxiredoxin 3. **Biochemistry**, v. 48, p. 6495-6501, 2009.

COX, A.G.; WINTERBOURN, C.C.; HAMPTON, M.B. Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signaling. **Biochemical Journal**, v. 425, p. 313-325, 2010.

COX, A.G.; PEARSON, A.G.; PULLAR, J.M.; JONSSON, T.J.; LOWTHER, W.T.; WINTERBOURN, C.C.; HAMPTON, M.B. Mitochondrial peroxiredoxin 3 is more resilient to hyperoxidation than cytoplasmic peroxiredoxins. **Biochemical Journal**, v. 421, p. 51-58, 2009.

DANSHINA, P.V.; SCHMALHAUSEN, E.V.; AVETISYAN, A.V.; MURONETZ, V.I. Mildly oxidized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a possible regulator of glycolysis. **IUBMB life**, v. 51, p. 309-14, 2001.

DOMAZOU, A.S., ZHU, H., KOPPENOL, W.H. Fast repair of protein radicals by urate. **Free Radical Biology and Medicine** v. 52, p. 1929-1936, 2012.

DORNER, R.W.; WEISS, T.D.; BALDASSARE, A.R.; MOORE, T.L.; ZUCKNER, J. Plasma and synovial fluid as solvent for monosodium urate. **Annals Rheumatic Disease**, v. 40, p. 70-74, 1981.

DU, Y.; ZHANG, H.; ZHANG, X.; LU, J.; HOLMGREN, A. Thioredoxin 1 is inactivated due to oxidation induced by peroxiredoxin under oxidative stress and reactivated by the glutaredoxin system. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, p. 32241-32247, 2013.

DUEWELL, P.; KONO, H.; RAYNER, K. J.; SIROIS, C. M.; VLADIMER, G.; BAUERNFEIND, F. G.; ABELA, G. S.; FRANCHI, L.; NUÑEZ, G.; SCHNURR, M.; ESPEVIK, T.; LIEN, E.; FITZGERALD, K. A.; ROCK, K. L.; MOORE, K. J.; WRIGHT, S. D.; HORNUNG, V. E. LATZ, E. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. **Nature**, v. 464, p. 1357-1361, 2010.

EL HADRI, K.; MAHMOOD, D.F.; COUCHIE, D.; JGUIRIM-SOUISSI, I.; GENZE, F.; DIDEROT, V.; SYROVETS, T.; LUNOV, O.; SIMMET, T.; ROUIS, M. Thioredoxin-1 promotes anti-inflammatory macrophages of the M2 phenotype and antagonizes atherosclerosis. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 32, p. 1445-1452, 2012.

ENGELMAN, R.; WEISMAN-SHOMER, P.; ZIV, T.; XU, J.; ARNER, E.S.; BENHAR, M. Multilevel regulation of 2-Cys peroxiredoxin reaction cycle by S-nitrosylation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, p. 11312-11324, 2013.

ERA, S.; KUWATA, K.; IMAI, H.; NAKAMURA K.; HAYASHI T.; SOGAMI, M. Age related change in redox state of human serum albumin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1247, p. 12–16, 1995.

FEIG, D.I. Serum uric acid and the risk of hypertension and chronic kidney disease. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 26, p. 176-185, 2014.

FERRER-SUETA, G.; MANTA, B.; BOTTI, H.; RADI, R.; TRUJILLO, M.; DENICOLA, A. Factors affecting protein thiol reactivity and specificity in peroxide reduction. **Chemical Research in Toxicology**, v. 24, p. 434-450, 2011.

FILIPPE, P.; HAIGLE, J.; FREITAS, J.; FERNANDES, A.; MAZIÈRE, J. C.; MAZIÈRE, C.; SANTUS, R.; AND MORLIÈRE, P. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 5474–5483, 2002.

FLOHÉ, L.; TOPPO, S.; COZZA, G.; URSINI, F. A comparison of thiol peroxidase mechanisms. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 15, p. 763-780, 2011.

FOURQUET, S.; HUANG, M-E, D'AUTREAU, B.; TOLEDANO, M.B. The dual functions of thiol-based peroxidases in H₂O₂ scavenging and signaling. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 10, p. 1565-1576, 2008.

FREI B.; ENGLAND L.; AMES B.N. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America**, v. 86, p. 6377-6381, 1989.

FREI B.; STOCKER R.; AMES B.N. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. **Proceedings of the National Academy of Science of United States of America**, v. 85, p. 9748-9752, 1988.

FURTMÜLLER, P.G.; BURNER, U.; OBINGER, C. Mechanism of nitrite-stimulated catalysis by lactoperoxidase. **Biochemistry**, v. 37, p. 17923-17930, 1998.

FURUTA, T.; IMAJO-OHMI, S.; FUKUDA, H.; KANO, S.; MIYAKE, K.; WATANABE, N. Mast cell-mediated immune responses through IgE antibody and Toll-like receptor 4 by malarial peroxiredoxin. **European Journal of Immunology**, v.38, p.1341-1350, 2008.

GALLOGLY, M.M.; MIEYAL, J.J. Mechanisms of reversible protein glutathionylation in redox signaling and oxidative stress. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 7, p.381-391, 2007.

GERSCH C.; PALII S.P.; KIM K.M.; ANGERHOFER A.; JOHNSON R.J.; HENDERSON G.N. Inactivation of nitric oxide by uric acid. **Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids**, v. 27, p. 967-978, 2008.

GILES, G.I.; JACOB, C. Reactive sulfur species: an emerging concept in oxidative stress. **Biological Chemistry**, v. 383, p. 375–388, 2002.

GO, Y.M.; HALVEY, P.J.; HANSEN, J.M.; REED, M.; POHL, J.; JONES, D.P. Reactive aldehyde modification of thioredoxin-1 activates early steps of inflammation and cell adhesion. **American Journal of Pathology**, v. 171, p. 1670-1681, 2007.

GOLDMAN, R.; STOYANOVSKY, D.A.; DAY, B.W.; KAGAN, V.E. Reduction of phenoxyl radicals by thioredoxin results in selective oxidation of its SH-groups to disulfides. An antioxidant function of thioredoxin. **Biochemistry**, v. 34, p. 4765-4772, 1995.

GRIMAUD, R.; EXTRATY, B.; MITCHELL, J.K.; LAFITTE, D.; BRIAND, C.; DERRICK, P.J.; BARRAS, F. Repair of oxidized proteins: identification of a new methionine sulfoxide reductase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 48915-48920, 2001.

HAENDELER, J.; HOFFMANN, J.; TISCHLER, V.; BERK, B.C.; ZEIHNER, A.M.; DIMMELER, S. Redox regulatory and anti-apoptotic functions of thioredoxin depend on S-nitrosylation at cysteine 69. **Nature Cell Biology**, v. 4, p. 743-749, 2002.

HALL, A.; PARSONAGE, D.; POOLE, L.B.; KARPLUS, P.A. Structural evidence that peroxiredoxin catalytic power is based on transition-state stabilization. **Journal of Molecular Biology**, v. 402, p. 194-209, 2010.

HALL, A., KARPLUS, P.A., POOLE, L.B. Typical 2-Cys peroxiredoxins – structures, mechanisms and functions. **The FEBS Journal**, v. 276, p. 2469-2477, 2009.

HAMAGUCHI S.; FURUMOTO T.; TSUCHIHASHI-MAKAYA M.; GOTO K.; GOTO D.; YOKOTA T. Hyperuricemia predicts adverse outcomes in patients with heart failure. **International Journal of Cardiology**, v. 151, p. 143-147, 2011.

HAN H.J.; LIM M.J.; LEE Y.J.; LEE J.H.; YANG I.S.; TAUB M. Uric acid inhibits renal proximal tubule cell proliferation via at least two signaling pathways involving PKC, MAPK, cPLA2, and NF-κB. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 292, p. F373-F381, 2007.

HANSCHMANN E.M., LÖNN M.E., SCHÜTTE L.D., FUNKE M., GODOY J.R., EITNER S., HUDEMANN C., LILLIG C.H. Both thioredoxin 2 and glutaredoxin 2 contribute to the reduction of the mitochondrial 2-Cys

peroxiredoxin Prx3. **Journal of Biological Chemistry**, v. 24, p. 40699-40705, 2010.

HAYDEN, M.R.; TYAGI, S.C. Uric acid: a new look at an old risk marker for cardiovascular disease, metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus: the urate redox shuttle. **Nutrition & metabolismo**, v. 1, p.1-15, 2004.

HOKAMAKI, J.; KAWANO, H.; SOEJIMA, H.; MIYAMOTO, S.; KAJIWARA, I.; KOJIMA, S.; SAKAMOTO, T.; SUGIYAMA, S.; YOSHIMURA, M.; NAKAMURA, H.; YODOI, J.; OGAWA, H. Plasma thioredoxin levels in patients with unstable angina. **International Journal of Cardiology**, v. 99, p. 225-231, 2005.

HOLMGREN, A. Thioredoxin. **Annual Reviews in Biochemistry**, v. 54, p.237-271, 1985.

HOLMGREN, A.; AND LU, J. Thioredoxin and thioredoxin reductase: current research with special reference to human disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 396, p. 120–124, 2010.

HOWELL R.R.; WYNGAARDEN J.B. On the mechanism of peroxidation of uric acids by hemoproteins. **Journal of Biological Chemistry**, v.235, p. 3544-3550, 1960.

HWANG, J.; SUH, H.W.; JEON, Y.H.; HWANG, E.; NGUYEN, L.T.; YEOM, J.; LEE, S.G.; LEE, C.; KIM, K.J.; KANG, B.S.; JEONG, J.O.; OH, T.K.; CHOI, I.; LEE, J.O.; KIM, M.H. The structural basis for the negative regulation of thioredoxin by thioredoxin-interacting protein. **Nature Communications**, v. 5, p. 1-13, 2014.

ICHIJO, H.; NISHIDA E.; IRIE, K.; DIJKE, P.; SAITOH, M; MORIGUCHI, T.; TAKAGI, M; MATSUMOTO, K.; MIYAZONO, Y.; GOTOH, Y. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. **Science**, v. 275, p. 90-94, 1997.

IGNASIAK, M.; SCUDERI, D.; DE OLIVEIRA, P.; PEDZINSKI, T.; RAYAH, Y.; LEVIN, C. H. Characterization by mass spectrometry and IRMPD spectroscopy of the sulfoxide group in oxidized methionine and related compounds. **Chemical Physics Letter**, v. 502, p. 29– 36, 2011.

IMAI, H.; HAYASHI, T.; NEGAWA, T.; NAKAMURA, K.; TOMIDA, M.; KODA, K.; TAJIMA, T.; KODA, Y.; SUDA, K.; ERA, S. Strenuous exercise-induced change in redox state of human serum albumin during intensive kendo training. **The Japanese Journal of Physiology**, v. 52, p. 135–140, 2002.

INAYAMA, T.; KUMAGAI, Y.; SAKANE, M.; SAITO, M.; MATSUDA, M. Plasma protein-bound sulfhydryl group oxidation in humans following a full marathon race. **Life Science**, v. 59, p. 573–578, 1996.

INOUE E, PARK KS, ASAKA A. Blood uric acid level and IQ: a study in twin families. **Acta Geneticae Medicae Gemellologiae**, v. 33, p.237–242, 1984.

ISHII, T.; SUNAMI, O.; NAKAJIMA, H.; NISHIO, H.; TAKEUCHI, T.; HATA, F. Critical role of sulfenic acid formation of thiols in the inactivation of

glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by nitric oxide. **Biochemical Pharmacology**, v. 58, p. 133-43, 1999.

ISHII, T.; WARABI, E.; YANAGAWA, T. Novel roles of peroxiredoxins in inflammation, cancer and innate immunity. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 50, p. 91-105, 2012.

ITO, H.; ABE, M.; MIFUNE, M.; OSHIKIRI, K.; ANTOKU, S.; TAKEUCHI, Y. Hyperuricemia is independently associated with coronary heart disease and renal dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus. **Plos One**, v. 11, p. e27817, 2011.

JARVIS, R.M.; HUGHES, S.M.; LEDGERWOOD, E.C. Peroxiredoxin 1 functions as a signal peroxidase to receive, transduce and transmit peroxide signal in mammalian cells. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 53, p. 1522-1530, 2012.

JEONG, W., PARK, S.J., CHANG, T.S., LEE, D.Y., W, S.G. Molecular mechanism of the reduction of cysteine sulfinic acid of peroxiredoxin to cysteine by mammalian sulfiredoxin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 14400-14407, 2006.

JIKIMOTO, T.; NISHIKUBO, Y.; KOSHIBA, M.; KANAGAWA, S.; MORINOBU, S.; MORINOBU, A.; SAURA, R.; MIZUNO, K.; KONDO, S.; TOYOKUNI, S.; NAKAMURA, H.; YODOI, J.; KUMAGAI, S. Thioredoxin as a biomarker for oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. **Molecular Immunology**, v. 38, p. 765-772, 2002.

KAIHAMI, G.H.; ALMEIDA, J.R.F.; SANTOS, S.S.; NETTO, L.E.S.; ALMEIDA, S.R.; BALDINI, R.L. Involvement of a 1-Cys peroxiredoxin in bacterial virulence. **Plos Pathogens**, v. 10, p. e1004442, 2014.

KANELIS, J.; WATANABE, S.; LI, J.H.; KANG, D.H.; LI, P. NAKAGAWA, T.; WAMSLEY, A.; SHEIKH-HAMAD, D.; LAN, H.Y.; FENG, L.; JOHNSON, R.J. Uric acid stimulates monocyte chemoattractant protein-1 production in vascular smooth muscle cells via mitogen-activated protein kinase and cyclooxygenase-2. **Hypertension**, v. 41, p. 1287-1293, 2003.

KANG, D.H.; PARK, S.K.; LEE, I.K. Uric acid-induced C-reactive protein expression: implication on cell proliferation and nitric oxide production of human vascular cells. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 6, p. 3553-3562, 2005.

KANG, D.H.; NAKAGAWA, T.; FENG, L.; WATANABE, S.; HAN, L.; MAZZALI M. A role for uric acid in the progression of renal disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 13, p. 2888-2897, 2002.

KASL, S.V.; BROOKS, G.W.; RODGERS, W.L. Serum uric acid and cholesterol in achievement behavior and motivation. I. The relationship to ability, grades, test performance and motivation. **JAMA**, v. 213, p. 1158-1164, 1970.

KARPLUS, P.A.; HALL, A. Structural survey of the peroxiredoxins. **Subcellular biochemistry**, v. 44, p. 41-60, 2007.

KARPLUS, P.A. A primer in peroxiredoxin biochemistry. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 80, p.183-190, 2015.

KAWAI T.; OHISHI M.; TAKEYA Y.; ONISHI M.; ITO N.; YAMAMOTO K.. Serum uric acid is an independent risk factor for cardiovascular disease and mortality in hypertensive patients. **Hypertension Research**, v. 35, p. 1087-1092, 2012.

KAWAI, K.; YOH, M.; HAYASHI, T.; IMAI, H.; NEGAWA, T.; TOMIDA, M.; SOGAMI, M.; ERA, S. Effect of diabetic retinopathy on redox state of aqueous humor and serum albumin in patients with senile cataract. **The Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine**, v. 26, p. 93–99, 2001.

KEIRE, D.; STRAUSS, E.; GUO, W.; NOSZAL, B.; RABENSTEIN, D. Kinetics and equilibria of thiol/disulfide interchange reactions of selected biological thiols and related molecules with oxidized glutathione. **Journal of Organic Chemistry**, v. 95, p. 123-127, 1992.

KHAN, H.A.; MUTUS, B. Protein disulfide isomerase a multifunctional protein with multiple physiological roles. **Frontiers in Chemistry**, v. 2, p. 1-9, 2014.

KHOSLA, U.M.; ZHARIKOV, S.; FINCH, J.L.; NAKAGAWA, T.; RONCAL, C.; MU, W.; KROTOVA, K.; BLOCK, E.R.; PRABHAKAR, S.; JOHNSON, R.J. Hyperuricemia induces endothelial dysfunction. **Kidney International**, v. 67, p. 1739-1742, 2005.

KICE, J.L.; CLEVELAND, J.P. Nucleophilic substitution reactions involving sulfenic acids and sulfenyl derivatives. Nucleophile- and acidcatalyzed oxygen-18 exchange of phenylbenzenethiolsulfinate. **Journal of American Chemical Society**, v. 95, p. 104–109, 1973.

KITTRIDGE, K. J., WILLSON, R. L. **FEBS Letters**, v. 170, p. 162–164, 1984.

KIVITY S.; KOPEL E.; MAOR E.; ABU-BACHAR F.; SEGEV S.; SIDI Y.. Association of serum uric acid and cardiovascular disease in healthy adults. **American Journal of Cardiology**, v. 111, p. 1146-1151, 2013.

KLEBANOFF, S.J. Myeloperoxidase: Friend and foe. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, p.598-625, 2005.

KLEBANOFF, S.J.; KETTLE, A.J.; ROSEN, H.; WINTERBOURN, C.C.; NAUSEEF, W.M. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 93, p. 185-198, 2013.

KLOMSIRI, C.; KARPLUS, A.; POOLE, L.B. Cysteine-nased redox switches in enzymes. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 14, p. 1065-1077, 2011.

KNOOPS, B.; ARGYROPOULOU; BECKER, S.; FERTÉ, L.; KUZNETSOVA. Multiple roles of peroxiredoxins in inflammation. **Molecular Cell**, v. 39, p. 60-64, 2016.

KOK, A.B. Ascorbate availability and neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. **Medical Hypotheses**, v. 48, p. 281-296, 1997.

KONIG, J.; LOTTE, K.; PLESSOW, R.; BROCKHINKE, A.; BAIER, M.; DIETZ, K.J. Reaction mechanism of plant 2-Cys peroxiredoxin. Role of the C terminus and the quaternary structure. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 24409-24420, 2003.

KONDO, N.; ISHII, Y.; KWON, Y.W.; TANITO, M.; HORITA, H.; NISHINAKA, Y.; NAKAMURA, H.; YODOI, J. Redox-sensing release of human thioredoxin from T lymphocytes with negative feedback loops. **The Journal of Immunology**, v. 172, p. 442-448, 2004.

KONO, H.; CHEN, C. J.; ONTIVEROS, F.; AND ROCK, K. L. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, p. 1939-1949, 2010.

KUTZING M.K.; FIRESTEIN B.L. Altered uric acid levels and disease states. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 324, p. 1-7, 2008.

KUZKAYA N.; WEISSMANN N.; HARRISON D.G.; DIKALOV S. Interactions of peroxynitrite with uric acid in the presence of ascorbate and thiols: Implications for uncoupling endothelial nitric oxide synthase. **Biochemical Pharmacology**, v. 70, p. 343-354, 2005.

LEE, S.; KIM, S.M.; DOTIMAS, J.; LI, L.; FEENER, E.P.; BALDUS, S.; MYERS, R.B.; CHUTKOW, W.A.; PATWARI, P.; YOSHIOKA, J.; LEE, R.T. Thioredoxin-interacting protein regulates protein disulfide isomerases and endoplasmic reticulum stress. **EMBO Molecular Medicine**, v. 6, p. 732-743, 2014.

LEE, S.; KIM, S.M.; LEE, R.T. Thioredoxin and thioredoxin targets proteins: from molecular mechanisms to functional significance. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 18, p. 1165-1207, 2013.

LEE, T.H., KIM, S.U., YU, S.L., KIM, S.H., PARK, D.S., MOON, H.B., DHO, S.H., KWON, K.S., KWON, H.J., HAN, Y.H., JEONG, S., KANG, S.W., SHIN, H.S., LEE, K. K., RHEE, S. G., YU, D. Y. Peroxiredoxin II is essential for sustaining life span of erythrocytes in mice. **Blood**, v. 101, p. 5033-5038, 2003.

LEE, W.; CHOI, K.S.; RIDDELL, J.; IP, C.; GHOSH, D.; PARK, J.H.; PARK, Y.M. Human peroxiredoxin 1 and 2 are not duplicate proteins: the unique presence of CYS83 in Prx1 underscores the structural and functional differences between Prx1 and Prx2. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 22011-22022, 2007.

LEYENS, G., DONNAY, I., KNOOPS, B. Cloning of bovine peroxiredoxins-gene expression in bovine tissues and amino acid sequence comparison with rat, mouse and primate peroxiredoxins. **Comparative Biochemistry Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 136, p. 943-955, 2003.

LETO, S.; YIENGST, M.J.; BARROWS, C.H. The effect of age and protein deprivation on the sulfhydryl content of serum albumin. **Journal of Gerontology**, v. 25, p. 4-8, 1970.

LEVANTESI G.; MARFISI R.M.; FRANZOSI M.G.; MAGGIONI A.P.; NICOLOSI G.L.; SCHWEIGER C. Uric acid: A cardiovascular risk factor in patients with

recent myocardial infarction. **International Journal of Cardiology**, v. 167, p. 262-269, 2013.

LILLIG, C.H.; HOLMGREN, A. Thioredoxin and related molecules--from biology to health and disease. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 9, p. 25-47, 2007.

LIOE, H.; O' HAIR, R. A. Comparison of collision induced dissociation and electron-ion induced dissociation of singly protonated aromatic amino acids, cystine and related simple peptides using a hybrid linear ion trap-FT-ICR mass spectrometer. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.389, p. 1429-1437, 2007a.

LIOE, H.; O' HAIR, R. A. A novel salt bridge mechanism highlights the need for nonmobile proton conditions to promote disulfide bond cleavage in protonated peptides under lowenergy collisional activation. **Journal of American Society for Mass Spectrometry**, v. 18, p. 1109- 1123, 2007b.

LIU, W.; NAKAMURA, H.; SHIOJI, K.; TANITO, M.; OKA, S.; AHSAN, M.K.; SON, A.; ISHII, Y.; KISHIMOTO, C.; YODOI, J. Thioredoxin-1 ameliorates myosin-induced autoimmune myocarditis by suppressing chemokine expressions and leukocyte chemotaxis in mice. **Circulation**, v. 110, p. 1276-1283, 2004.

LOW, F.M.; HAMPTON, M.B.; WINTERBOURN, C.C. Peroxiredoxin 2 and peroxide metabolism in the erythrocyte. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 10, p. 1621-1630, 2008.

LU, J.; HOLMGREN, A. The thioredoxin antioxidant system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 66, p. 75-87, 2014.

LYTVYN, Y.; PERKINS, B.A.; CHERNEY, D.Z.I. Uric acid as a biomarker and a therapeutic target in diabetes. **Canadian Journal of Diabetes**, v. 39, p. 239-246, 2015.

MADRIGAL-MATUTE, J.; FERNANDEZ-GARCIA, C.E.; BLANCO-COLIO, L.M.; BURILLO, E.; FORTUÑO, A.; MARTINEZ-PINNA, R.; LLAMAS-GRANDA, P.; BELOQUI, O.; EGIDO, J.; ZALBA, G.; MARTIN-VENTURA, J. L. Thioredoxin-1/ peroxiredoxin-1 as sensors of oxidative stress mediated by NADPH oxidase activity in atherosclerosis. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 86, p. 352-361, 2015.

MAHMOOD, D.F.; ABDERRAZAK, A.; COUCHIE, D.; LUNOV, O.; DIDEROT, V.; SYROVETS, T.; SLIMANE, M.N.; GOSSELET, T.; SIMMET, T.; ROUIS, M.; EL, H.K. Truncated thioredoxin (Trx-80) promotes pro-inflammatory macrophage of the M1 phenotype and enhances atherosclerosis. **Journal of Cellular Physiology**, v. 228, p. 1577-1583, 2013.

MAHMOOD, D.F.; ABDERRAZAK, A.; EL HADRI, K.; SIMMET, T.; ROUIS, M. The thioredoxin system as a therapeutic target in human health and disease. **Antioxidants and redox signaling**, v. 19, p. 1266-1303, 2013.

MANSOOR, M.A.; SVARDAL, A.M.; UELAND, P.M. Determination of the in vivo redox status of cysteine, cysteinylglycine, homocysteine, and glutathione in human plasma. **Analytical Biochemistry**, v. 200, p. 218–229, 1992.

MANTA, B.; HUGO, M.; ORTIZ, C.; FERRER-SUETA, G.; TRUJILLO, M.; DENICOLA, A. The peroxidase and peroxynitrite reductase activity of human erythrocyte peroxiredoxin 2. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 484, p. 146-154, 2009.

MATTE, A.; PANTALEO, A.; FERRU, E.; TURRINI, F.; BERTOLDI, M.; LUPO, F.; SICILIANO, A.; HO ZON, C.; DE FRANCESCHI, L. The novel role of peroxiredoxin-2 in red cell membrane protein homeostasis and senescence. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 76, p. 80-88, 2014.

MARTINEZ-PINNA, R.; RAMOS-MOZO, P.; MADRIGAL-MATUTE, J.; BLANCO-COLIO, L.M.; LOPEZ, J.A.; CALVO, E.; CAMAFEITA, E.; LINDHOLT, J.S.; MEILHAC, O.; DELBOSC, S.; MICHEL, J.B.; DE CENIGA, M.V.; EGIDO, J.; MARTIN-VENTURA, J.L. Identification of peroxiredoxin-1 as a novel biomarker of abdominal aortic aneurysm. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, p. 935-943, 2011.

MARTYN K.D.; FREDERICK L.M.; VON LOEHNEISEN K.; DINAUER M.C.; KNAUS U.G. Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. **Cell Signaling**, v. 18, p. 69–82, 2006.

MATSUO, Y.; YODOI, J. Extracellular thioredoxin: a therapeutic tool to combat inflammation. **Cytokine and Growth Factor Review**, v. 24, p. 345-353, 2013.

MATSUZAWA, A. Thioredoxin and redox signaling: roles of the thioredoxin system in control of cell fate. **Archives of Biochemistry and Biophysics** v. x, p. 1-5, 2016.

MATTHEWS, J.R.; WAKASUGI, N.; VIRELIZIER, J.L.; YODOI, J.; HAY, R.T. Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF- κ B by reduction of a disulphid bond involving cysteine 62. **Nucleic Acids Research**, v. 20, p. 3821-3830, 1992 .

MAXWELL A.J.; BRUINSMA K.A. Uric acid is closely linked to vascular nitric oxide activity: Evidence for mechanism of association with cardiovascular disease. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 38, p. 1850-1858, 2001.

MAZZOLA, J.L.; SIROVER, M.A. Alteration of intracellular structure and function of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: a common phenotype of neurodegenerative disorders? **Neurotoxicology**, v. 23, p. 603-609, 2003.

MCKENNA, S.M.; DAVIES, K.J.A. The inhibition of bacterial growth by hypochlorous acid. Possible role in the bacterial activity of phagocytes. **Biochemical Journal**, v. 254, p. 685-692, 1988.

MENDES, P. Biochemistry by numbers: simulation of biochemical pathways with Gepasi 3. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, p. 361-363, 1997.

MEOTTI, F.C.; JAMESON, G.N.L.; TURNER, R.; HAEWOOD, D.T.; STOCKWELL, S.; REES, M.D.; THOMAS, S.R.; KETTLE, A.J. Urate as a physiological substrate for myeloperoxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 12901-12911, 2011.

MULLEN, L.; HANSCHMANN, E.M.; LILLIG, C.H.; HERZENBERG, L.A.; GHEZZI, P. Cysteine Oxidation Targets Peroxiredoxins 1 and 2 for Exosomal Release through a Novel Mechanism of Redox-Dependent Secretion. **Molecular Medicine**, v. 21, p. 98-108, 2015.

MEUILLET, E.J.; MAHADEVAN, D.; BERGGREN, M.; COON, A.; POWIS, G. Thioredoxin-1 binds to the C2 domain of PTEN inhibiting PTEN's lipid phosphatase activity and membrane binding: a mechanism for the functional loss of PTEN's tumor suppressor activity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 429, p. 123-133, 2004.

MEYER, Y.; BUCHANAN, B.B.; VIGNOLS, F.; REICHEL, J.P. Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology. **Annual Review of Genetics**, v. 43, p. 335-367, 2009.

MICHNIK, A.; MICHALIK, K.; KLUCZEWSKA, A.; DRZAZGA, Z. Comparative study of human and bovine serum albumin. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 84, p. 113-117, 2006.

MIYAMOTO, S.; SAKAMOTO, T.; SOEJIMA, H.; SHIMOMURA, H.; KAJIWARA, I.; KOJIMA, S.; HOKAMAKI, J.; SUGIYAMA, S.; YOSHIMURA, M.; OZAKI, Y.; NAKAMURA, H.; YODOI, J.; OGAWA, H. Plasma thioredoxin levels and platelet aggregability in patients with acute myocardial infarction. **American Heart Journal**, v. 146, p. 465-471, 2003.

MOWBRAY, A.L.; KANG, D.H.; RHEE, S.G.; KANG, S.W.; JO, H. Laminar shear stress up-regulates peroxiredoxins (PRX) in endothelial cells: PRX 1 as a mechanosensitive antioxidant. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 1622-1627, 2008.

MULLEN, L.; HANSCHMANN, E.M.; LILLIG, C.H.; HERZENBERG, L.A.; GHEZZI, P. Cysteine oxidation targets peroxiredoxin 1 and 2 for exosomal release through a novel mechanism of redox-dependent secretion. **Molecular Medicine**, v. 21, p. 98-108, 2015.

NAKAMURA, H.; HERZENBERG, L.A.; BAI, J.; ARAYA, S.; KONDO, N.; NISHINAKA, Y.; HERZENBERG, L.A.; YODOI, J. Circulating thioredoxin suppresses lipopolysaccharide-induced neutrophil chemotaxis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 15143-15148, 2001.

NETEA M.G.; KULLBERG B.J.; BLOK W.L.; NETEA R.T.; VAN DER MEER J.W.M. The role of hyperuricemia in the increased cytokine production after lipopolysaccharide challenge in neutropenic mice. **Blood**, v. 89, p. 577-582, 1997.

NETTO, L.E.S.; ANTUNES, F. The roles of the peroxiredoxin and thioredoxin in hydrogen peroxide sensing and signal transduction. **Molecules and Cells**, v. 39, p. 65-71, 2016.

NEUMANN, C.A.; KRAUSE, D.S.; CARMAN, C.V.; DAS, S.; DUBEY, D.P.; ABRAHAM, J.L.; BRONSON, R.T.; FUJIWARA, Y.; ORKIN, S.H.; VAN ETEN, R.A. Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defense and tumour suppression. **Nature**, v. 424, p. 561–565, 2003.

NISHIMURA, F.C.Y.; ALMEIDA, A.C.; RATTI, B.A.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C.V.; XIMENES, V.F.; SILVA, S.O. Antioxidant effects of quercetin and naringenin are associated with impaired neutrophil microbicidal activity. **Evidence-based complementary and alternative medicine**. ID 795916, 2013.

NISHINAKA, Y.; MASUTANI, H.; NAKAMURA, H.; YODOI, J. Regulatory roles of thioredoxin in oxidative stress-induced cellular responses. **Redox Report**, v. 5, p. 298-295, 2013.

NISHITOH, H.; MATSUZAWA, A.; TOBIUME, K.; SAEGUSA, K.; TAKEDA, K.; INOUE, K.; HORI, S.; KAKIZUKA, A.; ICHIJO, H. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats **Genes and Development**, v. 16, p. 1345-1355, 2002.

O'HAIR, R. A. J.; REID, G. E. Neighboring group versus cis-elimination mechanisms for side chain loss from protonated methionine, methionine sulfoxide and their peptides. **European Mass Spectrometry**, v. 5, p. 325–334, 1999.

OBERMAYR, R.P.; TEMML, C.; GUTJAHR, G.; KNECHTELSDORFER, M.; OBERBAUER, R.; KLAUSER-BRAUN, R. Elevated uric acid increases the risk for kidney disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 19, p. 2407-2413, 2008.

OGUSUCU, R.; RETTORI, D.; MUNHOZ, D.C.; NETTO, L.E.; AUGUSTO, O. Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxyxynitrite: rate constants by competitive kinetics. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, p. 326-334, 2007.

PAGET, M.S.; BUTTNER, M.J. Thiol-based regulatory switches. **Annual Review of Genetics**, v. 37, p. 91–121, 2003.

PARIKH, H.; CARLSSON, E.; CHUTKOW, W.A.; JOHANSSON, L.E.; STORGAARD, H.; POULSEN, P.; SAXENA, R.; LADD, C.; SCHULZE, P.C.; MAZZINI, M.J.; JENSEN, C.B.; KROOK, A.; BJÖRNHOLM, M.; TORNQVIST, H.; ZIERATH, J.R.; RIDDERSTRÅLE, M.; ALTSHULER, D.; LEE, R.T.; VAAG, A.; GROOP, L.C.; MOOTHA, V.K. TXNIP regulates peripheral glucose metabolism in humans. **PLoS Medicine**, v. 4, p. e158, 2007.

PARSONAGE, D.; NELSON, K.J.; FERRER-SUETA, G.; ALLEY, S.; KARPLUS, P.A.; FURDUI, C.M.; POOLE, L.B. Dissecting peroxiredoxin catalysis: separating binding, peroxidation, and resolution for a bacterial AhpC. **Biochemistry**, v. 54, p. 1567-1575, 2015.

PATRÍCIO, E.S.; PRADO, F.M.; SILVA, R.P.; CARVALHO, L.A.C.; PRATES, M.V.C.; DADAMOS, T.; BERTOTTI, M.; DI MASCIIO, P.; KETTLE, A.J.;

MEOTTI, F.C. Chemical characterization of urate hydroperoxide, a pro-oxidant intermediate generated by urate oxidation in inflammatory and photoinduced processes. **Chemical Research in Toxicology**, v. 28, p. 1556-1566, 2015.

PATRICIO, ELIZIANE DE SOUZA. Avaliação da interação do hidroperóxido de urato com a proteína dissulfeto isomerase (PDI) em processos inflamatórios [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Química; 2014. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46131/tde-22012015-111631/>.

PEKKARI, K.; GURUNATH, R.; ARNER, E.S.; HOLMGREN, A. Truncated thioredoxin is a mitogenic cytokine for resting human peripheral blood mononuclear cells and is present in human plasma. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 37474-37480, 2000.

PERKINS, A.; NELSON, K.J.; WILLIAMS, J.R.; PARSONAGE, D.; POOLE, L.B.; KARPLUS, P.A. The sensitive balance between the fully folded and locally unfolded conformations of a model peroxiredoxin. **Biochemistry**, v. 52, p. 8708-8721, 2013.

PESKIN, A.V.; LOW, F.M.; PATON, L.N.; MAGHZAL, G.J.; HAMPTON, M.B.; WINTERBOURN, C.C. The high reactivity of peroxiredoxin 2 with H₂O₂ is not reflected in its reaction with other oxidants and thiol reagents. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 11885-11892, 2007.

PESKIN, A.V.; DICKERHOF, N.; POYNTON, R.A.; PATON, L.N.; PACE, P.E.; HAMPTON, M.B.; WINTERBOURN, C.C. Hyperoxidation of peroxiredoxins 2 and 3: rate constants for the reactions of the sulfenic acid of the peroxidatic cysteine. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, p. 14170-14177, 2013.

PESKIN, A.V.; PACE, P.E.; BEHRING, J.B.; PATON, L.N.; SOETHOUDT, M.; BACHSCHMID, M.M.; WINTERBOURN, C.C. Glutathionylation of the active site cysteines of peroxiredoxin 2 and recycling by glutaredoxin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, p. 3053-3062, 2016.

PESKIN, A. V.; TURNER, R.; MAGHZAL, G. J.; WINTERBOURN, C. C.; KETTLE, A. J. Oxidation of methionine to dehydromethionine by reactive halogen species generated by neutrophils. **Biochemistry**, v. 48, p. 10175–10182, 2009.

POWIS, G.; MONTFORT, W.R. Properties and biological activities of thioredoxins. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 41, p. 261-295, 2001.

RADI, R.; BUSH, K.M.; COSGROVE, T.P.; FREEMAN, B.A. Reaction of xanthine oxidase-derived oxidants with lipid and protein of human plasma. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 286, p. 117–125, 1991.

RAFTERY, M.J.; YANG, Z.; VALENZUELA, S.M.; GRECZY, C.L. Novel intra- and inter-molecular sulfonamide bonds in S100A8 produced by hypochlorite oxidation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 33393-33401, 2001.

RHEE, S.G.; CHAE, H.Z.; KIM, K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. **Free Radical in Biology and Medicine**, v. 38, p. 1543-1552, 2005.

RHEE, S.G. Overview on Peroxiredoxin. *Molecules and Cells*, v. 39, P.1-5, 2016.

RHEE, S.G., WOO, H.A., KIL, I.S., BAE, S.H. Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, p. 4403-4410, 2012.

RICE, M.E.; RUSSO-MENNA, I. Differential compartmentalization of brain ascorbate and glutathione between neurons and glia. **Neuroscience**, v. 82, p. 1213-1223, 1998.

RIDDLES, P.W.; BLAKELEY, R.L.; ZERNER, B. Ellman's reagent: 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)-a reexamination. **Analytical Biochemistry**, v. 94, p. 75-81, 1979.

RIDDELL, J.R.; WANG, X.Y.; MINDERMAN, H.; GOLLNICK, S.O. Peroxiredoxin 1 stimulates secretion of proinflammatory cytokines by binding to TLR4. **Journal of Immunology**. V. 184, p. 1022-1030, 2010.

RONCAL CA, MU W, CROKER B, REUNGJUI S, OUYANG X, TABAH-FISCH I,. Effect of elevated serum uric acid on cisplatin-induced acute renal failure. **American Journal Of Physiology – Renal Physiology**, v. 292, p. F116-F22, 2007.

SAHAF, B.; SODERBERG, A.; SPYROU, G.; BARRAL, A.M.; PEKKARI, K.; HOLMGREN, A; ROSEN, A. Thioredoxin expression and localization in human cell lines: detection of full-length and truncated species. **Experimental Cell Research**, v. 236, p. 181-192, 1997.

SAITOH, M.; NISHITOH, H.; FUJII, M.; TAKEDA, K.; TOBIUME, K.; SAWADA, Y.; KAWABATA, M.; MIYAZONO, K.; ICHIJO, H. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulation kinase (ASK)1. **The EMBO Journal**, v. 17, p. 2596-2606, 1998.

SALZANO, S.; CHECCONI, P.; HANSCHMANN, E.M.; LILLIG, C.H.; BOWLER, L.D.; CHAN, P.; VAUDRY, D.; MENGIOZZI, M.; COPPO, L.; SACRE, S.; ATKURI, K.R.; SAHAF, B.; HERZENBERG, L.A.; HERZENBERG, L.A.; MULLEN, L.; GHEZZI, P. Linkage of inflammation and oxidative stress via release of glutathionylated peroxiredoxin-2, which acts as a danger signal. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 33, p. 12157-12162, 2014.

SANCHEZ-LOZADA L.G.; SOTO V.; TAPIA E.; AVILA-CASADO C.; SAUTIN Y.Y.; NAKAGAWA T. Role of oxidative stress in the renal abnormalities induced by experimental hyperuricemia. **American Journal of Physiology**, v. 295, p. F1134-1141, 2008.

SANTOS, C.X.C.; ANJOS, E.I.; AUGUSTO, O. Uric acid oxidation by peroxynitrite: multiple reactions, free radical formation and amplification of lipid

oxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 372, p. 285-294, 1999.

SANTUS, R.; PATTERSON, L.K.; FILIPE, P. MORLIÉRE, P.; HUG, G.L.; FERNANDES, A.; MAZIÉRE, J.C. Redox reactions of the urate radical/ urate couple with the superoxide radical anion, the tryptophan neutral radical and selected flavonoids in neutral aqueous solutions. **Free Radical Research**, v. 35, p. 129-136.

SASAKI, M.; JORDAN, P.; JOH, T.; ITOH, M.; JENKINS, M., PAVLICK, K.; MINAGAR, A.; ALEXANDER, S.J. Melatonin reduces TNF- α induced expression of MAdCAM-I via inhibition of NF-kB. **BMC Gastroenterology**, v. 2, p.9, 2002.

SAUTIN Y.Y.; NAKAGAWA T.; ZHARIKOV S.; JOHNSON R.J. Adverse effects of the classic antioxidant uric acid in adipocytes: NADPH oxidase-mediated oxidative/nitrosative stress. **American Journal of Physiology – Cell Physiology**, 293, p. C584-596, 2007.

SAUTIN, Y.Y.; JOHNSON, R.J. Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox. **Nucleosides, nucleotides and nucleic acids**, v. 27, p. 603-619, 2008.

SCHROEDER, P.; POPP, R.; WIEGAND, B.; ALTSCHMIED, J.; HAENDELER, J. Nuclear redox-singling is essential for apoptosis inhibition in endothelial cells – important role for nuclear thioredoxin-1. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 27, p. 2325-2331, 2007.

SCOTT G.S.; HOOPER D.C. The role of uric acid in protection against peroxynitrite-mediated pathology. **Medical Hypotheses**, v. 56, p. 95–100, 2001.

SEIDEL, A.; PARKER, H.; TURNER, R.; DICKERHOF, N.; KHALILOVA, I.S.; WILBANKS, S.M.; KETTLE, A.J.; JAMESON, G.N.L. Uric acid and thiocyanate as competing substrates of lactoperoxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, p. 21937-21949, 2014.

SEO, J.H.; LIM, J.C.; LEE, D.Y.; KIM, K.S.; PISZCZEK, G.; NAM, H.W.; KIM, Y.S.; AHN, T.; YUN, C.H.; KIM, K.; CHOCK, P.B.; CHAE, H.Z. Novel protective mechanism against irreversible hyperoxidation of peroxiredoxin: N alpha-terminal acetylation of human peroxiredoxin II. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 13455-13465, 2009.

SHAO, D.; OKA, S.; LIU, T.; ZHAI, P.; AGO, T.; SCJARRETTA, S.; LI, H.; SADOSHIMA, A redox dependent mechanism for regulation of AMPK activation by thioredoxin 1 during energy starvation. **Cell Metabolism**, v. 19, p. 232-245, 2014.

SHI,Y. **Journal of Clinical Investigation**, v.120, p. 1809–1811, 2010.

SHICHITA, T.; HASEGAWA, E.; KIMURA, A.; MORITA, R.; SAKAGUCHI, R.; TAKADA, I.; SEKIYA, T.; OONOSHI, H.; KITAZONO, T.; YANAGAWA, T. Peroxiredoxin Family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. **Nature Medicine**, v. 18, p.911-917, 2012.

SIROVER, M.A. New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1432, p. 159-84, 1999.

SMITH C.A.; MITCHINSON M.J.; ARUOMA O.I.; HALLIWELL B. Stimulation of lipid peroxidation and hydroxyl-radical generation by the contents of human atherosclerotic lesions. **Biochemical Journal**, v. 286, p. 901-5, 1992.

SOBOTTA, M.C.; LIOU, W.; STOCKER, S.; TALWAR, D. OEHLER, M.; RUPPERT, T.; SCHARF, A.N.D., DICK, T.P. Peroxiredoxin 2 and STAT3 form a redox relay for H₂O₂ signaling. **Nature Chemical Biology**, v. 11, p. 64-71, 2015.

SOFAER J.A.; EMERY A.E.H. Genes for super-intelligence? **Journal Medical Genetics**, v. 18, p. 410-3, 1981.

SOGA, M.; MATSUZAWA, A.; ICHIJO, H. Oxidative Stress-Induced Diseases via the ASK1 Signaling Pathway. **International Journal of Cell Biology**, v. 2012, p. 1-5, 2012.

SQUADRITO, G.L.; POSTLETHWAIT, E.M.; MATALON, S. Elucidating mechanisms of chlorine toxicity: reaction kinetics, thermodynamics, and physiological implications. **American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 299, p. L289-L300, 2010.

STEILL, J. D.; SZCZEPANSKI, J.; OOMENS, J.; EYLER, J. R.; BRAJTERTOTH, A. Structural characterization by infrared multiple photon dissociation spectroscopy of protonated gas-phase ions obtained by electrospray ionization of cysteine and dopamine. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, p. 2463-2473, 2011.

SURDHAR, P.; ARMSTRONG, D. Redox potentials of some sulfur-containing radicals. **Journal of Physical Chemistry**, v. 90, p. 5915-5917, 1986.

TAIRUM, C.A.; SANTOS, M.C.; BREYER, C.A.; GEYER, R.R.; NIEVES, C.J.; PORTILLO-LEDESMA, S.; FERRER-SUETA, G.; TOLEDO, J.C., JR., TOYAMA, M.H.; AUGUSTO, O. Catalytic Thr or Ser Residue Modulates Structural Switches in 2-Cys Peroxiredoxin by Distinct Mechanisms. **Scientific Reports**, v. 6 p. 1-12, 2016.

TOLEDO, J.C., AUDI, R.; OGUSUCU, R.; MONTEIRO, G.; NETTO, L.E.; AUGUSTO, O. Horseradish peroxidase compound I as a tool to investigate reactive protein-cysteine residues: from quantification to kinetics. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 50, p. 1032-1038, 2011.

TOMIDA, M.; ISHIMARU, J.; HAYASHI, T.; NAKAMURA, K.; MURAYAMA, K.; ERA, S. The redox states of serum and synovial fluid of patients with temporomandibular joint disorders. **The Japanese Journal of Physiology**, v. 53, p. 351-355, 2003.

TREVELIN, S.C.; SANTOS, C.X.; FERREIRA, R.G.; LIMA, L.S.; SILVA, R.L.; SCAVONE, C.; CURI, R.; ALVES-FILHO, J.C.; CUNHA, T.M.; ROXO-JÚNIOR, P.; CERVI, M.C.; LAURINDO, F.R.M.; HOTHERSALL, J.S.; COBB, A.M.;

ZHANG, M.; IVETIC, A.; SHAH, A.M.; LOPES, L.R.; CUNHA, F.Q. Apocynin and Nox2 regulate NF κ B by modifying thioredoxin-1 redox state. **Scientific Reports**, v.6, p. 34581-34593, 2016.

TURELL, L.; BOTTI, H.; CARBALLAL, S.; FERRER-SUETA, G.; SOUZA, J.M.; DURÁN, R.; FREEMAN, B.A.; RADI, R.; ALVAREZ, B. Reactivity of sulfenic acid in human serum albumin. **Biochemistry**, v. 47, p. 358-367, 2008.

TURNER-IVEY, B.; MANEVICH, Y.; SCHULTE, J.; KISTNER-GRIFFIN, E.; JEZERSKA-DRUTEL, A.; LIU, Y.; NEUMANN, C.A. Role for Prdx1 as a specific sensor in redox-regulated senescence in breast cancer. **Oncogene**, v. 32, p. 5302-5314, 2013.

TRUJILLO, M.; CLIPPE, A.; MANTA, B.; FERRER-SUETA, G.; SMEETS, A.; DECLERCQ, J.P.; KNOOPS, B.; RADI, R. Pre-steady state kinetic characterization of human peroxiredoxin 5: taking advantage of Trp84 fluorescence increase upon oxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 467, p. 95-106, 2007.

VALÉRIO, D.A.; GEORGETTI, S.R.; MAGRO, D.A.; CASAGRANDE, R.; CUNHA, T.M.; VICENTINI, F.T.M.C.; VIEIRA, S.M.; FONSECA, M.J.V.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q.; VERRI, W.A. Quercetin reduces inflammatory pain: inhibition of oxidative stress and cytokine production. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 1975-1979, 2009.

VASSILAKOPOULOS, T.; KARATZA, M.H.; KATSAOUNOU, P.; KOLLINTZA, A.; ZAKYNTINOS, S.; ROUSSOS, C. Antioxidants attenuate the plasma cytokine response to exercise in humans. **Journal of Applied Physiology**, v. 94, p. 1025-1032, 2003.

WANG J.; WANG Y.; ZHAO D.; GUO X.; ZHONG J.Q. Association between serum uric acid and mortality in a Chinese population of hypertensive patients. **Renal Failure**, v. 37, p. 73-76, 2015.

WATANABE, S.; KANG, D.H.; FENG, L.; NAKAGAWA, T.; KANELIS, J.; LAN, H.; MAZZALI, M.; JOHNSON, R.J. Uric acid, hominoid evolution and the pathogenesis of salt-sensitivity. **Hypertension**, v. 40, p. 355-360, 2002.

WATSON, W.H.; POHL, J.; MONTFORT, W.R.; STUCHLIK, O.; REED, M.S.; POWIS, G.; JONES, D.P. Redox potential of human thioredoxin 1 and identification of a second dithiol/disulfide motif. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 33408–33415, 2003.

WATSON, W.H.; YANG, X.; CHOI, Y. E.; JONES, D. P.; KEHRER, J. P. Thioredoxin and its role in toxicology. **Toxicological Sciences**, v. 78, p. 3–14, 2004.

WEICHSEL, A.; BRAILEY, J.L.; MONTFORT, W.R. Buried S-nitrosocysteine revealed in crystal structures of human thioredoxin. **Biochemistry**, v. 46, p. 1219-1227, 2007.

WEN C.P.; DAVID CHENG T.Y.; CHAN H.T.; TSAI M.K.; CHUNG W.S.I.; TSAI S.P. Is high serum uric acid a risk marker or a target for treatment? Examination

of its independent effect in a large cohort with low cardiovascular risk. **American Journal of Kidney Disease**, v. 56, p. 273-288, 2010.

WHITEMAN M.; KETSAWATSAKUL U.; HALLIWELL B. A reassessment of the peroxynitrite scavenging activity of uric acid. In: Chiueh CC, Hong JS, Leong SK, editors. Nitric Oxide: Novel Actions, Deleterious Effects and Clinical Potential. Annals of the New York Academy of Sciences. 962. New York: New York Acad Sciences; p. 242-59, 2002.

WILSON, J.M.; WU, D.; MOTIU-DEGROOD, R.; HUPE, D.J. A spectrophotometric method for studying the rates of reaction of disulfides with protein thiol groups applied to bovine serum albumin. *Journal of American Chemical Society*, v. 102, p. 359–363, 1980.

WINTERBOURN, C.C.; HAMPTON, M.B. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, p. 549-561, 2008.

WINTERBOURN, C.C.; METODIEWA, D. Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, p. 322-328, 1999.

WINTERBOURN, C.C.; PARSONS-MAIR, H.N.; GEBICKI, S.; GEBICKI, J.M.; DAVIES, M.J. Requirements for superoxide-dependent tyrosine hydroperoxide formation in peptides. **Biochemical Journal**, v. 381, p. 241-248, 2004.

WINTERBOURN, C.C.; KETTLE, A.J. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 18, p. 642-660, 2013.

WINTERBOURN, C.C.; PESKIN, A.V. Kinetic Approaches to Measuring Peroxiredoxin Reactivity. **Molecules and Cells**, v. 39, p. 26-30, 2016.

WITMER, J.R.; WETHERELL, B.J.; WAGNER, B.A.; DU, J.; CULLEN, J.J.; BUETTNER, G.R. Direct spectrophotometric measurement of supra-physiological levels of ascorbate in plasma. **Redox Biology**, v. 8, p. 298-304.

WOO, H.A., JEONG, W., CHANG, T.S., PARK, K.J., PARK, S.J., YANG, J.S., RHEE, S.G. Reduction of cysteine sulfinic acid by sulfiredoxin is specific to 2-Cys peroxiredoxins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 3125-3128, 2005.

WOOD, Z.A.; POOLE, L.B.; KARPLUS, P.A. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. **Science**, v. 300, p. 650-653, 2003.

WOOD, Z.A.; SCHRODER, E.; HARRIS, J.R.; POOLE, L.B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. **Trends in Biochemical Science**, v. 28, p. 32-40, 2003.

WOOD, Z.A., POOLE, L.B., HANTGAN, R.R., KARPLUS, A.P. Dimers to doughnuts: redox-sensitive oligomerization of 2-Cysteine peroxiredoxins. **Biochemistry**, v. 41, p. 5493-5504, 2002.

WOODWARD, J.J. The effects of thiol reduction and oxidation on the inhibition of NMDA-stimulated neurotransmitter release by ethanol. **Neuropharmacology**, v. 33, p. 635-640, 1994.

WOLFF, S.P. Ferrous Ion Oxidation in Presence of Ferric Ion Indicator Xylenol Orange for Measurement of Hydroperoxides. **Oxygen Radicals in Biological Systems**, v.233, 182-189, 1994.

WU, C.; LIU, T.; CHEN, W.; OKA, S.; FU, C.; JAIN, M.R.; PARROTT, A.M.; BAYKAL, A.T.; SADOSHIMA, J.; LI, H. Redox regulatory mechanism of transnitrosylation by thioredoxin. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 9, p. 2262-2275, 2010.

YU ES, KIM MJ, SHIN HS, JANG YH, CHOI HS, JO I. Uric acid-induced phenotypic transition of renal tubular cells as a novel mechanism of chronic kidney disease. **American Journal of Physiology – Renal Physiology**, v. 304, p. F471-80, 2013.

YU M.A.; SANCHEZ-LOZADA L.G.; JOHNSON R.J.; KANG D.H: Oxidative stress with an activation of the renin-angiotensin system in human vascular endothelial cells as a novel mechanism of uric acid-induced endothelial dysfunction. **Journal of Hypertension**, v. 28, p.1234-42, 2010.

ZALAWADIYA S.K.; VEERANNA V.; MALLIKETHI-REDDY S.; BAVISHI C.; LUNAGARIA A.; KOTTAM A. Uric acid and cardiovascular disease risk reclassification: Findings from NHANES III. **European Journal of Preventive Cardiology**, v. 22, p. 513-518, 2015.

ZHARIKOV S.; KROTOVA K.; HU H.; BAYLIS C.; JOHNSON R.J.; BLOCK E.R. Uric acid decreases NO production and increases arginase activity in cultured pulmonary artery endothelial cells. **American Journal of Physiology – Cell Physiology**, v.295, p. C1183-C90, 2008.

ZHOU, R.; TARDIVEL, A.; THORENS, B.; CHOI, I; TSCHOPP, J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. **Nature Immunology**, v. 11, p. 136-140, 2011.

ZITO, E.; MELO, E. P.; YANG, Y.; WAHLANDER, A.; NEUBERT, T. A.; RON, D. Oxidative protein folding by an endoplasmic reticulum-localized peroxiredoxin. **Molecular Cell**, v. 40, p. 787–797, 2010.

Redoxoma Highlight

The two faces of peroxiredoxins

By redoxoma October 31, 2015 Highlights

by **Larissa Anastacio da Costa Carvalho**

In the antiquity, many cities protected their territories by surrounding fortifications, with giant gates and arches working as unique gateways. The Roman god Janus, known as the protector of entrances or new-beginnings, is represented by a head with two faces in opposite directions. The two faces of Janus symbolize the duality of nature. Well, nature itself is marked by dichotomy. What in nature cannot be good and bad at the same time? That is the origin of the term *Janus effect*.

A remarkable example of the Janus effect is the mustard gas (1,1-thiobis-2-chloroethane). Used as a chemical weapon during World War I, it causes serious inflammation of the skin and painful blisters. In high-exposition levels, it acutely causes blindness and destroys the lungs' alveoli, killing the exposed victim. But, what a coincidence: during World War II, the mustard gas showed its therapeutic face. In 1943, the Liberty ship carrying such gas suffered an attack. The survivors were treated by doctor Cornelius Rhoads, who noticed a dramatic drop in the number of white blood cells, attributing it to the mustard gas inhaled by the crew members. The doctor suggested the use of this compound to treat cancer, especially leukemia, where the increase of leukocytes is brutal. Although nowadays other compounds are safer and more effective than mustard gas, this serves as a reminder of how many compounds can be rediscovered after their first reported effects.

It is well established that the role of peroxiredoxins is to eliminate H_2O_2 by directly discharging the oxidative equivalents to the thioredoxin system. However, for the first time, Sobotta and colleagues [1] described a new role for human peroxiredoxin 2 as a redox signaling pathway. At the same time it plays its role of detoxifying the organism, it relays oxidative equivalents to a transcription factor, STAT3, inactivating it. In response to cytokines and growth factors, STAT3 mediates the expression of many prostimulatory genes such as those related to cell growth and apoptosis, playing a key role in many cellular processes.

In the past, peroxiredoxins have been found to be associated with many signaling complexes, but it always has been assumed that its association is of a non-specific type or that its role is to remove H_2O_2 and to protect other proteins from oxidation damage. However, depending on location and context, peroxiredoxins may switch between thioredoxin and other proteins, acting as a dual-face protein: playing scavenging and signaling modes. Therefore, the anti- and pro-oxidant pathways (scavenging and signaling) may be inextricably interconnected through thiol peroxidases. Notwithstanding, could the peroxiredoxin be a new example of the *Janus effect*? Well, like Barry Halliwell and John Gutteridge wrote in their book *Free radicals in biology and medicine*, the Neil Young's song and an undeniable truth: *The same thing that makes you live, can kill you in the end*.

-
1. M. C. Sobotta, W. Liou, S. Stocker, D. Talwar, M. Oehler, T. Ruppert, A. N. Scharf, T. P. Dick. **Peroxiredoxin-2 and STAT3 form a redox relay for H_2O_2 signaling** *Nature Chemical Biology*, 11(1): 64-70, 2015 | doi: 10.1038/nchembio.1695
-

Larissa Anastacio da Costa Carvalho is a PhD Student from the laboratory of Redox Processes in Inflammatory Response, Instituto de Química da USP, coordinated by Flavia C. Meotti.