UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**ESTUDO MECANÍSTICO DE LESÕES
OXIDATIVAS EM BIOMOLÉCULAS POR
AMINOACETONA**

Fernando Dutra

Tese de Doutorado

Etelvino José Henriques Bechara

ORIENTADOR

SÃO PAULO

12 de maio de 2003

Dutra, Fernando

D978e Estudo mecanístico de lesões oxidativas em biomoléculas
por aminoacetona / Fernando Dutra. -- São Paulo, 2003.
108p.

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

Orientador: Bechara, Etelvino José Henriques

1. Mecanismo de reação : Físico-química : Orgânica 2.
Radical : Estrutura molecular : Bioquímica teórica I. T. II.
Bechara, Etelvino José Henriques, orientador.

547.139 CDD

Agradecimentos

Muito tenho a agradecer ao meu orientador, Etelvino Bechara, pelo apoio, confiança, amizade, paciência e compreensão.

Aos Drs. Alícia Kowaltowski, Ana Maria Ferreira, Brian Bandy, Denise Curi, Fernanda Knudsen, Francisco Laurindo, Giuseppe Rotílio, Lília Calabrese, Maria Ciriolo, Maria Tereza Miranda, Marisa Medeiros, Ohara Augusto e Paolo Di Mascio pelas discussões e por disponibilizarem seus laboratórios para a elaboração desta tese.

Por sempre estarem ao meu lado agradeço aos meus pais, Durval e Maria José, as minhas irmãs, Flávia e Fabiana, aos meus cunhados, Carlos e Fábio, e aos meus tios, Ildefonso e Maria do Rosário. Aos meus sobrinhos, Matheus, Rafaela e Samuel, por sempre alegrarem meus dias.

Por toda a ajuda e colaboração, além das agradáveis conversas, agradeço a Adriana Wendel e a Doris Araújo.

Aos meus colegas de laboratório: Adriana, Ana Luiza, Avishek, Carlos, Cassius, Daniela, Karine, Leandro, Marcelo, Moacir, Paulo e Samir. Por participarem de bons e maus momentos.

Aos meus amigos: Ana Cristina, Angelo de Martino, Daniela Dezios, Floripes, Giuseppe Filomeni, Hans Viertler, José Alberto, Katia Aquilano, Marcela, Solange Sakata, Vera Pardini e Virgínia. Palavras não exprimem todo meu agradecimento.

Agradeço a Maria Helena pelo apoio, compreensão, pelos bons e não tão bons momentos passados durante este doutorado.

A FAPESP, Pró-reitoria de Pós-graduação e Pró-reitoria de Pesquisa pelas bolsas e auxílios concedidos.

Aos meus pais, Durval e Maria José.

Aos meus tios, Ildelfonso e Maria do Rosário.

Índice

Abreviaturas.....	3
Resumo.....	4
Abstract	5
1. Introdução	6
1.1. Formação endógena de aminoacetona.....	6
1.2. Catabolismo da aminoacetona	7
1.3. Aminoacetona, metilglioxal e <i>diabetes mellitus</i>	11
1.4. Oxidação não enzimática de aminocetonas	17
1.5. Metabolismo de ferro	19
1.6. Ferritina	21
1.7. Ceruloplasmina	24
2. Objetivos	28
3. Materiais e Métodos.....	29
3.1. Materiais	29
3.2. Métodos.....	29
3.2.a. Preparação de aminoacetona.....	29
3.2.b. Preparação de metilglioxal.....	29
3.2.c. Determinação da concentração de metilglioxal	30
3.2.d. Determinação da concentração de amônio	30
3.2.e. Oximetria e espectrofotometria	30
3.2.f. Preparação de oxi-hemoglobina e oxi-mioglobina	31
3.2.g. Purificação de ferritina	31
3.2.h. Preparação de apoferritina	31
3.2.i. Separação de isoferritinas com diferentes relações Fe(III)/fosfato	31
3.2.j. Estudos com ferritina.....	32
3.2.k. Análise de aminoácidos de ferritina	32
3.2.l. Medidas de fluorescência de triptofano.....	32
3.2.m. Medida de grupos tióis na apoferritina	32
3.2.n. Análise de incorporação de ferro em apoferritina.....	33
3.2.o. Análise da atividade ferroxidásica de apoferritina	33

3.2.p. Preparação de mitocôndrias de fígado de rato.....	33
3.2.q. Estudos de inchamento mitocondrial	34
3.2.r. Ativação de Sepharose® e purificação de ceruloplasmina	34
3.2.s. Medidas da atividade ferroxidásica de ceruloplasmina.....	35
3.2.t. Medidas da atividade aminoxidásica de ceruloplasmina.....	35
3.2.u. Determinação de concentração de íons cobre livres.....	35
3.2.v. Agregação de ceruloplasmina promovida por aminoacetona.....	35
4. Resultados e Discussão	37
4.1. Preparação e caracterização físico-química de aminoacetona	37
4.2. Determinação do mecanismo de oxidação aeróbica de aminoacetona.....	39
4.2.a. Análise dos produtos de reação	39
4.2.b. Consumo de oxigênio por aminoacetona	40
4.2.c. Oxidação de aminoacetona na presença de SOD, catalase e semicarbazida	45
4.2.d. Estudos de ressonância paramagnética eletrônica (EPR)	48
4.3. Co-oxidação de aminoacetona e hemoglobina ou mioglobina	53
4.4. Danos oxidativos à ferritina promovidos por aminoacetona.....	56
4.5. Permeabilização mitocondrial induzida por aminoacetona	67
4.6. Danos oxidativos à ceruloplasmina promovidos por aminoacetona	73
5. Conclusões e considerações finais	82
6. Bibliografia	86

Abreviaturas

AA: Aminoacetona

AAPH: di-hidrocloreto de 2,2'-azobis-(2-amidinopropano)

AGEs: produtos finais de glicação avançada (*advanced glycation end products*)

ALA: Ácido 5-aminolevulínico

ATP: Adenosina trifosfato

CCT: Complexo de clivagem da treonina

CHELEX: Resina quelante catiônica específica para íons de metais de transição

CP: Ceruloplasmina

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

DTPA: Ácido dietilenotriaminapentacético

DTT: Ditioneitol

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

EGTA: Ácido etileno-glicol-bis(β -amino-etil éter)*N,N,N',N'*-tetracético

EROs: Espécies reativas de oxigênio

GSH: Glutathiona reduzida

Hepes: Ácido *N*-[2-hidroxietil]piperazina-*N'*-[2-etanosulfônico]

IDDM: *Diabetes mellitus* insulino-dependente ou *diabetes mellitus* tipo I

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

MG: Metilglioxal

NADH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido

NIDDM: *Diabetes mellitus* não insulino-dependente *diabetes mellitus* tipo II

PPD: *p*-Fenilenodiamina

SOD: CuZn-superóxido dismutase

SSAO: Amino oxidase sensível à semicarbazida

Tris: Tris[hidroximetil]aminometano

X/XO: Sistema xantina/xantina oxidase

Resumo

Aminoacetona (AA) é um catabólito de Thr e Gly que se acumula nas síndromes *cri-du-chat* e treoninemia. Atualmente, a oxidação de AA é considerada uma das fontes alternativas de metilglioxal (MG), agente citotóxico e genotóxico, em *diabetes mellitus*. Em estados de deficiência metabólica, tal como o diabetes, há acúmulo de AA que, por sua vez, sofre oxidação na presença de amino oxidases sensíveis à semicarbazida (SSAO) com a produção de MG, H_2O_2 e NH_4^+ . As SSAO são enzimas Cu-dependentes, cujo mecanismo de atuação ainda é pouco conhecido e possui como substrato, além de AA, metilamina (endógena) e a benzilamina (xenobiótico). AA possui um grupo amino vicinal à uma carbonila, o que sugere que ela possa sofrer enolização e oxidação catalisada por metal, produzindo espécies reativas de oxigênio (EROs), inclusive radicais $HO^\bullet$. A presente tese tem por objetivo esclarecer o mecanismo pelo qual AA sofre oxidação aeróbica, direta e catalisada por metal, com concomitante produção de EROs. Foi dada ênfase à catalise por ferro por sua implicação em desordens associadas com diabetes. Serão apresentados resultados que implicam AA como promotora de danos a membrana de mitocôndrias isoladas, bem como a estrutura proteica de ferritina e ceruloplasmina (CP). Como ferritina e CP estão envolvidas na homeostase de ferro, os danos causados a estas proteínas por AA possivelmente afetam o estado redox de plasma de diabéticos, contribuindo significativamente para o aumento do estresse oxidativo no diabetes.

Abstract

Aminoacetone (AA) is a threonine and glycine catabolite long known to accumulate in *cri-du-chat* and threoninemia syndromes and, more recently, implicated as a contributing source of methylglyoxal (MG) in *diabetes mellitus*. AcetylCoA overproduction in diabetes also leads to AA accumulation. AA as well as many other endogenous (*e.g.*, methylamine) and xenobiotic amines (*e.g.*, benzylamine) are oxidized by dioxygen in the presence of SSAO, a group of poorly understood plasma circulating and membrane bound Cu-dependent enzymes, yielding an aldehyde, H₂O₂ and NH₄⁺ ions. With AA, SSAO activity paradoxically produces the cytotoxic and genotoxic MG. AA bears an amino group vicinal to the carbonyl function and therefore is expected to undergo phosphate-catalyzed enolization and iron-catalyzed oxidation to yield reactive oxygen species (ROS), including HO[•] radicals. The present work aims to clarify the mechanisms by which AA undergoes direct and metal-catalyzed aerobic oxidation to yield deleterious ROS, with emphasis on the catalytic role of iron given its well-known implications in diabetes. In the present work we show that ROS generated through the aerobic oxidation of AA are able to induce damage in isolated rat liver mitochondria as well as in horse spleen ferritin (HoSF) and human ceruloplasmin (CP). The current findings of changes in HoSF and CP may contribute to explain intracellular iron-induced oxidative stress during AA accumulation in *diabetes mellitus* patients.

1. Introdução

Aminoacetona (AA) é um catabólito de treonina e glicina que se acumula em síndromes como o *cri-du-chat*¹ e a treoninemia,² doenças caracterizadas por um alto nível de treonina circulante. Recentemente AA tem sido apontada, junto com triose fosfatos e acetona, como fonte endógena de metilglioxal (MG) principalmente em *diabetes mellitus*. Metilglioxal é um potente agente de modificação de proteínas e DNA e está acumulado principalmente em tecidos susceptíveis a lesões observadas no diabetes. A seguir serão apresentadas as principais rotas de formação e degradação de AA assim como seu possível papel no *diabetes mellitus*.

1.1. Formação endógena de aminoacetona

A descoberta da produção endógena de AA por bactérias e mamíferos ocorreu na mesma época em que havia um crescente interesse por aminocetonas, iniciado com a descoberta do ácido δ -aminolevulínico (ALA) e com a determinação de sua função biológica. ALA é uma aminocetona precursora de porfirinas.³ No final da década de 50, foi demonstrado por Gibson e colaboradores⁴ que partículas isoladas de reticulócitos de galinhas eram capazes de sintetizar ALA, a partir de succinil-CoA e glicina, e AA, a partir de acetil-CoA e glicina. Elliott⁵ foi o primeiro a demonstrar, em 1960, que suspensões de células de *Staphylococcus aureus* eram capaz de metabolizar treonina com a consequente produção de AA, caracterizada por métodos de cromatografia em papel. Esta bactéria também foi capaz de metabolizar glicina com a formação de AA, o que levou Elliott^{5,6} a propor dois mecanismos distintos de formação de AA por *Staphylococcus aureus*.

A partir das descobertas relatadas acima foram caracterizadas três enzimas que catalisam a degradação de treonina: (i) treonina desidratase, formadora de 2-oxobutirato e NH_4^+ ; (ii) treonina aldolase, produtora de acetaldeído e glicina; e (iii) treonina desidrogenase, fonte de 2-amino-3-oxobutirato,⁷⁻⁹ sendo apenas a última de origem mitocondrial. Bird e Nunn⁸ estimaram que as atividades destas três enzimas-chave, no fígado de ratos alimentados, normalmente mobilizam 10%, 3% e 87%, respectivamente, da treonina hepática.

Quando do início dos estudos do processo de formação de AA endógena, propunha-se que a oxidação da treonina por NAD^+ , catalisada pela treonina desidrogenase, formava o 2-amino-3-oxobutirato que, por ter tempo de meia vida de menos de 1 min, em pH 7,0 a 37°C , poderia sofrer descarboxilação espontânea com consequente formação de AA^{10} ou sofrer ação da denominada 2-amino-3-oxobutirato-CoA ligase dando origem a glicina e acetil-CoA.¹¹ Uma vez que não foi demonstrada a formação do 2-amino-3-oxobutirato *in vivo*, ganhou importância uma proposta que sugere que este metabólito não é efetivamente formado, mas seria disputado entre duas enzimas: a treonina desidrogenase, que formaria glicina e acetil-CoA, e uma outra enzima denominada aminoacetona sintetase, que formaria AA e CO_2 .^{5,6,9}

Boylan e Dekker,¹² em 1981, foram os primeiros a purificar a treonina desidrogenase, dando novo impulso aos estudos desta rota metabólica. Tressel *et al.*¹³ demonstraram que a treonina desidrogenase e a aminoacetona sintetase estão associadas fisicamente, formando o que eles denominaram de *Complexo de Clivagem da Treonina* (CCT). A proposta mecanística destes pesquisadores propõe a ação direta do CCT sobre treonina catalisando a conversão desta em glicina (Esquema 1).

A conversão de treonina a glicina por CCT é dependente de coenzima-A (CoA), ou seja, a abundância de CoA favorece a conversão de treonina a glicina e sua ausência favorece a formação de AA. Desde que ambos NAD^+ e CoA são cofatores do catabolismo da treonina e da glicina, o controle desta via metabólica depende das relações mitocondriais NAD^+/NADH e $\text{CoA}/\text{acetil-CoA}$.¹⁴

Normalmente o catabolismo da treonina produz glicina e acetil-CoA, contudo, em casos como a ceto-acidose em diabéticos, onde os níveis de acetil-CoA estão aumentados, a treonina é catabolizada à AA a qual se acumula em tecidos de diabéticos.¹⁵

1.2. Catabolismo da aminoacetona

Em paralelo aos estudos do metabolismo da treonina, Elliott¹⁶ descreveu a formação de MG a partir de AA tanto em fatias de rins e fígados de rato quanto em plasma de bovinos. Esta reação envolvendo AA não pôde ser relacionada

com uma ação enzimática, mas o produto MG pôde ser indentificado com clareza. Elliott⁶ foi o primeiro a descrever que AA é estável em soluções fortemente ácidas (HCl 6 N), mesmo quando aquecidas, e que esta estabilidade diminui em meio alcalino.

Urata e Granick⁹ descreveram a formação e o desaparecimento da AA em reações com glicina, acetil-CoA e homogenatos de alguns tecidos de rato. Seus resultados revelam que as quantidades formadas de AA são aproximadamente as mesmas para homogenatos de rins, fígado, glândula supra-renal e baço (~60 nmol/g de tecido), a metade para o músculo cardíaco (~30 nmol/g de tecido) e menor para mucosa intestinal e músculo gastrocnemius (~20 nmol/g de tecido). Observaram também que as atividades para formação de AA por homogenatos é muito menor que as medidas para frações mitocondriais (~600 nmol/g de tecido para mitocôndrias de rins e ~200 nmol/g de tecido para mitocôndrias de fígado), confirmando o sítio onde AA é produzida na célula.⁹ O desaparecimento da AA se dá principalmente no fígado de ratos e este processo é enzimático. A eficiência da catalise é maior na presença de oxigênio, fato este confirmado pelo decréscimo de 90% na velocidade quando se borbulha N₂ no meio reacional.⁹ Ray e Ray^{17,18} descreveram a formação de MG, a partir de AA, catalisada por uma aminoxidase presente no plasma e no fígado de ruminantes. Esta

aminoxidase foi purificada e estudada com diversos substratos porém AA se mostrou o mais reativo de todos ($K_m = 9 \mu M$, para a enzima hepática de caprinos), o que levou estes pesquisadores a acreditarem que esta enzima tinha especificidade para formação de MG.

São conhecidas várias aminoxidases e é comum subdividi-las em duas classes principais, com base na natureza química de seus cofatores:¹⁹

- A) Enzimas que possuem como cofator a flavina adenina dinucleotídeo (FAD): são as chamadas monoamina oxidases (MAO) e a forma intracelular da poliamina oxidase (PAO);
- B) Enzimas que possuem um ou mais cofatores que contenham grupos carbonila: esta classe agrupa as enzimas de tecidos como a diamino oxidase (DAO), lisil oxidase (LO) e uma monoamina oxidase sensível à ação de semicarbazidas (SSAO, do inglês *semicarbazide sensitive amine oxidase*).

A enzima descrita por Ray e Ray pode ser classificada como uma SSAO. Este tipo de enzima pode ser diferenciado da MAO pois é inibida por semicarbazida (de 0,1 até 1 mM) e, apesar de sua função metabólica ainda não ter sido determinada,²⁰ seus substratos são aminas primárias, sendo as mais reativas a AA, a metilamina²¹ e a benzilamina (não endógena).²⁰

A descoberta de que o *diabetes mellitus* é um estado onde há aumento na concentração de AA e que a SSAO circulante está aumentada tanto no *diabetes mellitus* do tipo I (insulino-dependente, IDDM) quanto no *diabetes mellitus* do tipo II (não insulino-dependente, NIDDM)²² tornou de grande importância a caracterização dos mecanismos de ação desta enzima.

A atividade normal da SSAO em plasma humano é de aproximadamente 350 mU/L, sendo que os valores aumentam consideravelmente em pacientes diabéticos: 641 mU/L para diabetes tipo I e 619 mU/L para diabetes tipo II.²² Pacientes com falha cardíaca congestiva também possuem níveis elevados de atividade de SSAO (590 mU/L), porém não há informações sobre a causa desta elevação.²³

Apesar de estar distribuída em diversos tecidos humanos, são os vasos sangüíneos que possuem maior atividade da SSAO.²⁴ Localiza-se também em

retina e microvasos cerebrais,²⁵ cartilagens,²⁶ útero, uretra, vasos deferentes,²⁷ rins²⁸ e na circulação sanguínea.²⁹ A SSAO em mamíferos está ligada predominantemente na membrana plasmática de tecidos, especialmente em células de músculo liso.³⁰ Foi provado que culturas de células de músculo liso vascular secretam uma forma solúvel de SSAO, indicando a possível origem da SSAO circulante.³¹ Sua importância fisiológica ainda não foi estabelecida, mas acredita-se que tenha papel inibitório da angiogênese em diabéticos, daí seu possível envolvimento na nefropatia, neuropatia e retinopatia típicas desta doença.³²

A SSAO é uma glicoproteína que contém apenas um cofator contendo carbonila (provavelmente 6-hidroxi-dopa),²⁵ possui dois íons de cobre por mol de enzima^{33,34} e acha-se distribuída em vários tecidos de mamíferos.³²

Os substratos desta enzima variam conforme a espécie estudada, tanto que SSAO de aorta de ratos é capaz de promover oxidação de aminas aromáticas de forma mais eficiente que a SSAO de aorta de humanos.²⁰ Este fato sugere que se deve tomar cuidado com certas predições sobre a atividade da SSAO humana quando se toma como base experimentos com animais de laboratório.²⁰

Aminoguanidina, uma hidrazina nucleofílica, mostrou-se eficiente inibidora da formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs, do inglês *advanced glycation end products*), com a diminuição de formação de placas ateroscleróticas, além de prevenir a nefropatia em diabetes induzida em ratos.²⁵ Foi demonstrado que aminoguanidina (10 mg/kg) bloqueia o sítio catalítico da SSAO de maneira irreversível, aumentando a excreção de metilamina (substrato da SSAO) e da lactato desidrogenase (indicador de nefropatia).²⁵ A SSAO é uma enzima dependente de cobre e deve ter como cofator um grupo do tipo 6-hidroxi-dopa ou um piridoxal ou ainda um grupo pirroloquinolina quinona. Todos estes fatores possuem um grupo ceto acessível à inibição por semicarbazidas e hidrazinas.²⁵ O esquema 2 mostra o mecanismo inibitório de aminoguanidina sobre SSAO.

Por estar distribuída na vasculatura e no plasma, como sugerido por Ray e Ray,^{17,18} acredita-se que sua função não seja apenas produzir MG a partir de

AA, mas também metabolizar aminas circulantes, endógenas ou não, que possam ter atividades farmacológicas ou deletérias.

Esquema 2. Ação de aminoguanidina sobre SSAO

A ação de SSAO sobre AA (com a consequente formação de MG e peróxido de hidrogênio, espécies reconhecidas como citotóxicas) tem sido proposta como potencial fonte de espécies reativas de oxigênio (EROs) e consequente causadora das disfunções vasculares observadas em pacientes diabéticos.^{25,32,35}

1.3. Aminoacetona, metilglioxal e *diabetes mellitus*

Nos últimos anos, AA e seu produto de oxidação, MG, estão sendo relacionados com o *diabetes mellitus* por diversos grupos.^{19,32,36} Apesar de o diabetes ser considerado como um estado em que há aumento de estresse oxidativo no organismo,³⁷ ainda não está completamente estabelecido qual o mecanismo que leva a este aumento. Neuropatia, nefropatia e retinopatia são alguns dos distúrbios que estão relacionados com a acelerada arteriosclerose causada pela diabetes em decorrência da ação do MG sobre proteínas, provocando a formação de AGEs.³²

Serão descritos, a seguir, alguns aspectos da química do MG: rotas de produção e consumo, ação deletéria sobre proteínas e tecidos e importância no diabetes.

A concentração normal estimada de MG em plasma está na faixa de 5 µM sendo que está aumentada de 5 a 6 vezes em pacientes de diabetes tipo I e de 2

a 3 vezes em pacientes de diabetes tipo II.³⁸ São conhecidas três rotas metabólicas de formação de MG em mamíferos (Esquema 3).³⁹

Uma das rotas sintéticas apresentadas no esquema 3 aponta a formação de metilglioxal a partir de trioses fosfato e outra a partir de corpos cetônicos. Segundo Kalapos⁴⁰ estas duas rotas são responsáveis por 90% da quantidade de MG formada no organismo. Uma terceira rota leva à formação de MG a partir de glicina e treonina com a formação prévia de AA, como discutido anteriormente. Apesar de esta terceira rota ter menor importância na formação do MG em organismos normais (~10%), o fato de a concentração de SSAO estar aumentada em tecidos suscetíveis a danos causados no diabetes^{32,36} é um indício do papel deletério da SSAO em pacientes diabéticos.

Esquema 3. Rotas metabólicas de formação de metilglioxal

TPI: triose-fosfato isomerase

P₄₅₀: citocromo P₄₅₀

NE: não enzimático

SSAO: aminoxidase sensível a semicarbazida

CCT: complexo de clivagem da treonina

Aceita-se hoje que a principal rota de degradação do metilglioxal inclui o sistema enzimático das glioxalases. Este sistema contém duas enzimas: a glioxalase I e a glioxalase II (Esquema 4). Foi descoberto em 1913 por Dakin e Dudley⁴¹ e por Neuberg,⁴² de forma independente, e mostrou-se capaz de transformar α -oxoaldeídos em seus derivados de ácido. Esta descoberta levou vários pesquisadores a procurar qual a sua verdadeira função biológica e, no início dos anos 60, Szent-Györgyi e colaboradores propuseram uma teoria em que o sistema das glioxalases⁴³ é responsável pelo controle da proliferação

celular. De forma simplificada: o MG (chamado por Szent-Györgyi de “retina”) age como um agente bloqueador da proliferação celular, enquanto a glioalase I (chamada por Szent-Györgyi de “promina”) age como um desbloqueador através da retirada do MG do sistema.^{39,44} Muitas dúvidas ainda pairam sobre a função do sistema das glioalases e, hoje, poucos pesquisadores acreditam que este sistema enzimático seja de fato responsável pela regulação da proliferação celular.

O sistema das glioalases está presente no citossol de células e organelas celulares (principalmente mitocôndria) e parece crucial para o suporte da vida.⁴⁵ Foi determinado que a glioalase II é a enzima limitante da velocidade da reação, mas nos dois tipos de diabetes a atividade da glioalase I está significativamente elevada e a atividade da glioalase II está muito reduzida.⁴⁶ Como se sabe que MG acha-se em concentrações elevadas em diabéticos, pode-se concluir que há também um acúmulo de S-D-lactoil-glutathiona. O acúmulo de MG e S-D-lactoilglutathiona é um forte indício de um possível papel de MG como depletor de GSH, o que sugere um aumento na ação deletéria de EROs no diabetes.⁴⁷

Estudos com culturas de hepatócitos de ratos revelaram que concentrações de MG abaixo de 1 mM não provocam danos consideráveis neste

tipo de célula; no entanto, acima desta concentração, há um aumento na geração de EROs.⁴⁷ Baseado nestes dados foram propostos dois mecanismos distintos de ação deletéria de MG em humanos: ação direta e ação indireta de MG sobre biomoléculas (Esquema 5).

Importantes relatos na literatura apontam para um possível papel do MG em manifestações clínicas observadas no diabetes tais como sua concentração em cristalino humano ser 20 vezes maior que sua concentração plasmática⁴⁸ e bastante elevada em rins e sangue de pacientes diabéticos.^{28,49} Porém metilglioxal começou a ser relacionado a danos clínicos observados em portadores de diabetes após outras constatações, a saber:⁴⁰ e referências citadas

- durante hiperglicemia, glioxais são acumulados em eritrócitos;
- autooxidação de monossacarídeos envolve formação de radicais livres;
- aumento da concentração de metilglioxal em plasma de diabéticos;
- acetona e metilglioxal diminuem a concentração de glutathione reduzida no fígado;
- a demanda por vitamina E é maior em *diabetes mellitus* e a concentração de compostos reativos com ácido tiobarbitúrico (sinal de elevada peroxidação lipídica) também está aumentada; e

- Elevada glicação de proteínas (proteínas glicadas não-enzimaticamente estão envolvidas em produção de superóxido).

A ingestão crônica de MG por camundongos, mesmo em baixas concentrações (1,7 $\mu\text{mol}/\text{dia}$), resultou em uma diminuição de 30,6% dos níveis sanguíneos de GSH em relação aos controles, em paralelo com a diminuição de 20% na atividade da GSH-S-transferase,⁵⁰ uma importante enzima no metabolismo e detoxificação de substâncias exógenas carcinogênicas e tóxicas.⁵¹

A adição de MG à cultura de células pancreáticas de ratos estimula uma discreta liberação de insulina por estas células.⁵² Pode-se explicar este fato pois a liberação de insulina está ligada diretamente com os níveis de GSH em células β -pancreáticas,⁵³ e MG reage espontaneamente com GSH com consequente diminuição de seus níveis intracelulares.

Metilglioxal mostrou-se um agente mutagênico endógeno, provocando deleções multi-bases (50%) e substituição nos pares de base (35%) em células de símios.⁵⁴ As substituições (transversões) observadas *in vivo* mais importantes foram G:C $\rightarrow$ C:G e G:C $\rightarrow$ T:A.⁵⁴

Doses de aproximadamente 360 μM de MG são capazes de inibir o crescimento de células de leucemia humana 60 (HL60) enquanto doses de 520 μM tornam inviáveis culturas destas células.⁵⁵ Outra observação importante é que MG inibe o fluxo de elétrons através do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial e inativa a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de células de carcinoma 'Ehrlich ascites' e de leucócitos de pacientes de leucemia, enquanto não exerce nenhum efeito nas mesmas células normais.^{56,57} Apesar destes dados, a eficácia de MG como agente anti-tumoral é pequena devido ao uso de doses próximas ao máximo de saturação do sistema enzimático das glioxalases, sendo o tratamento seguido de um novo aumento na taxa de crescimento tumoral.³⁸ A injeção intravenosa de doses acima de 250 mg/kg de MG é capaz de matar, por parada cardíaca, gatos usados como animais experimentais.⁵⁸

Metilglioxal, formado na oxidação enzimática de AA, é um α -oxoaldeído e, como tal, envolvido em reações de Maillard⁵⁹ com proteínas. *In vitro* sabe-se que

MG é capaz de reagir com proteínas e formar produtos de Maillard fluorescentes. Estas reações entre MG e proteínas são inicialmente reversíveis e geralmente com resíduos de arginina e lisina (formando derivados de glicosilaminas) e também com resíduos de cisteína (formando derivados de hemitioacetais).^{48,60} Este equilíbrio inicial pode ser deslocado irreversivelmente para a formação de produtos, sendo os resíduos de arginina os mais susceptíveis a este tipo de modificação.⁶⁰ Estas proteínas modificadas por MG ligam-se a receptores na superfície celular de monócitos e macrófagos sofrendo então endocitose mediada por receptor e então degradação lisosomal.^{61,62} Apesar de a glicose ser o açúcar fisiológico mais abundante, sua concentração efetiva na forma de cadeia aberta é de apenas 100 nM no sangue para indivíduos normais e 200-500 nM em diabéticos. Já o MG está presente em concentrações estimadas em 10 μ M em indivíduos normais e aumentada de 2 a 6 vezes em diabéticos, mostrando que MG pode ser tão eficiente quanto a glicose na modificação de proteínas em diabéticos.³⁶

Lee e colaboradores⁶³ provaram que durante a formação de ligações cruzadas de MG a aminoácidos (em especial alanina) há formação de EROS *in vitro* (Esquema 6). A etapa determinante para as ligações cruzadas é a formação da base de Schiff entre MG e o aminoácido. Provou-se que não há necessidade de metais de transição nem de oxigênio na reação em que a proteína (ligada ao MG) transforma-se em cátion radical e metilglioxal em ânion radical. Na presença de O_2 , o $MG^{\bullet+}$ tem papel de redutor e forma $O_2^{\bullet-}$, comprovando que, uma vez formado, MG funciona como agente redutor além de fazer ligações cruzadas com proteínas. Íons superóxidos formados durante a reação podem dar sequência a uma série de reações de propagação de cadeia, provocando danos característicos de EROs.

Esquema 6. Ligações cruzadas entre metilglioxal e proteínas

Foi constatado que além de ser um inibidor da SSAO, aminoguanidina pode prevenir a modificação irreversível de proteínas de plasma humano por metilglioxal.⁶⁴ O mecanismo pelo qual MG é derivatizado por aminoguanidina foi desvendado por Thornalley e colaboradores.⁶⁵ Por diminuir a progressão da retinopatia, neuropatia e nefropatia em ratos com diabetes induzida,⁶⁶⁻⁶⁹ prevenir a formação de ligações cruzadas em proteínas⁷⁰ e prevenir a formação de fatores de reconhecimento para os receptores de AGEs com concomitante disfunção em células endoteliais, aminoguanidina tem sido considerada um possível agente terapêutico em pacientes com *diabetes mellitus*.

1.4. Oxidação não enzimática de aminocetonas

O interesse de nosso grupo por aminocetonas endógenas iniciou-se há 15 anos com o início dos estudos do ácido 5-aminolevulínico (ALA). O ALA é o primeiro metabólito da via biossintética do grupo heme e está acumulado em porfirias hereditárias (ex. porfiria aguda intermitente, PAI) e em porfirias adquiridas (ex. saturnismo e tirosinemia). A PAI apresenta como sintomas fadiga muscular, dores abdominais, alterações neuromotoras, alterações neuropsiquiátricas, cirrose hepática e hepatoma.⁷¹ Os mesmos sintomas são observados na intoxicação por chumbo e tirosinemias.⁷² Nas crises agudas de PAI e plumbismo há uma elevação de até 100 vezes nos níveis plasmáticos de ALA⁷³ e esta elevação pode estar relacionada com a alta incidência de câncer hepático nos portadores destas doenças. Pouco se conhece sobre as bases

moleculares das lesões neurológicas e hepáticas na PAI,⁷⁴⁻⁷⁶ mas alguns possíveis mecanismos já foram propostos. Nosso grupo desvendou o mecanismo pelo qual ALA, uma α -aminocetona, é capaz de sofrer enolização e subsequente oxidação aeróbica (não enzimática) gerando o ácido 4,5-dioxovalérico (DOVA), íons NH_4^+ e EROs, entre elas $\text{O}_2^{\bullet-}$ e $\text{HO}^\bullet$.

Foi demonstrado que ALA pode agir *in vivo* como um potente pró-oxidante, sublinhando um papel de EROs nas manifestações clínicas tanto de PAI quanto de plumbismo e tirosinemia. Os principais resultados obtidos pelo grupo estão resumidos no esquema 7.

Assim como ALA, AA também é uma α -aminocetona e, portanto, deve sofrer oxidação aeróbica por um mecanismo semelhante ao proposto para o ALA.

Durante o andamento das pesquisas para confecção da presente tese foi publicado um artigo que revela um possível papel pró-oxidante de AA na presença de Cu^{2+} , causando danos a DNA.⁹⁰ Neste trabalho, Kawanishi e colaboradores descrevem o aumento nas concentrações de 8-oxo-7,8-diidro-2'-deoxyguanosina (8-oxodG) quando DNA de timus de bezerro é incubado na presença de AA e Cu(II) . O mecanismo desta reação envolve complexação de AA por Cu^{2+} , seguida de dimerização oxidativa de AA, com formação de 2,5-dimetilpirazina, MG e EROs, como produtos principais.

1.5. Metabolismo de ferro

O ferro é o segundo metal mais abundante na crosta terrestre (após o alumínio) e é um dos elementos mais quimicamente versáteis. Por apresentar dois estados redox estáveis, é importante do ponto de vista bioquímico, visto que seu potencial de redução pode ser modificado por uma série de ligantes metabólicos.⁹¹ Existem várias proteínas transportadoras de elétrons que possuem ferro em seu sítio ativo, com diferentes potenciais redox. Proteínas com outras funções, como por exemplo a hemoglobina (transportadora de O_2), também possuem ferro em seus centros ativos.

Apesar da abundância de ferro em nosso ambiente, sua bio-disponibilidade é bastante reduzida, visto que o ferro em condições de pH fisiológico e meio oxidante é extremamente insolúvel. Tal fato exigiu que os diversos organismos terrestres se adaptassem e adquirissem estratégias para absorção deste importante metal. A estratégia apropriada por plantas e bactérias foi a produção de pequenas moléculas orgânicas com grande afinidade por Fe(III) , chamadas comumente de sideróforas.⁹²

Em sistemas biológicos, a maior parte do ferro intracelular está associado a enzimas e proteínas de transporte ou armazenagem deste metal.⁹³ Porém, uma menor parte deste ferro intracelular forma um “pool” de íons ferro quelatável. Neste “pool”, tanto íons Fe(II) quanto Fe(III) estão fracamente associados a ligantes variados tais como ânions orgânicos (fosfato e carboxilatos), polipeptídios e fosfolipídeos de superfície de membrana (principalmente à cabeça polar).⁹⁴ A concentração normal do “pool” de ferro quelatável intracelular não ultrapassa 2,5 μM porém possui importante papel

como fonte de íons ferro para incorporação em diversas proteínas.⁹⁵ Por outro lado, a labilidade deste “pool” de íons ferro os torna disponíveis para diversas reações redox inclusive deletérias, com formação de EROs,⁹⁶ tais como:

A soma destas duas reações é a chamada reação de Haber-Weiss, muito lenta na ausência de complexos de ferro e cobre, mas catalisada por estes íons:

A formação do radical hidroxila ($\text{HO}^{\bullet}$) nesta reação ainda é uma questão polêmica na literatura mas sabe-se que a mistura $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ tem capacidade hidroxilante e que é extremamente reativa, sendo capaz de causar peroxidação lipídica, quebra de fitas de DNA e degradação de diversas outras biomoléculas.

Uma das estratégias para detoxificação de ferro em organismos vertebrados inclui a produção de duas proteínas capazes de estocar o ferro “livre” e torná-lo inacessível para reações redox. Elas são a transferrina (extracelular)⁹⁷ e a ferritina (intracelular).⁹⁸ A ferritina tem atividade ferroxidásica e armazena Fe(III) em seu núcleo. Nesta estratégia, de forma contraditória, íons de ferro são armazenados principalmente no interior da célula onde sua capacidade de produzir danos é potencialmente maior.

Em humanos há uma quantidade total de ferro que pode variar de 3 a 5 g/indivíduo sendo que aproximadamente dois terços deste total está na circulação na forma de hemoglobinas.⁹⁹ De 15 a 25% são armazenados na forma de ferritina e 8% estão na forma de mioglobina em músculos e citocromos. Os tecidos que mais contêm ferro são o fígado, o baço e a medula óssea.⁹⁹

A transferrina é uma proteína que possui o papel de transporte de ferro, quelando-o principalmente do trato intestinal e distribuindo-o para tecidos capazes de produzir enzimas e proteínas ferro-dependentes (medula óssea principalmente). Existem patologias associadas a falhas no transporte e

acúmulo de ferro, onde a quantidade de ferro não ligado à transferrina torna-se importante, sendo este “ferro livre” ou “ferro quelatável” acumulado em tecidos tais como o fígado e o pâncreas.¹⁰⁰

1.6. Ferritina

Denomina-se ferritina uma classe de proteínas amplamente distribuídas na natureza, estando presentes em mamíferos, plantas e procariotos.^{101,102} A ferritina é uma proteína diretamente relacionada com o armazenamento de ferro possuindo então importante papel na detoxificação deste metal nestes organismos.¹⁰² Exerce papel importante também nas células de intestino de humanos, regulando a absorção de ferro através do seqüestro de excesso deste metal. Em pacientes com hemocromatose, doença de origem genética onde há grande absorção de ferro pelo intestino e seu acúmulo no fígado, não há ferritina em células de absorção do duodeno, sugerindo seu papel regulador na absorção deste metal.¹⁰³

A ferritina é uma proteína que pode ser caracterizada como uma concha oca com diâmetro externo de aproximadamente 12 nm, diâmetro interno de 7 a 8 nm, massa molecular de 500 kDa e sua cavidade possui um diâmetro de 80 Å. É composta por 24 subunidades polipeptídicas e é capaz de estocar até 4.500 átomos de Fe(III) como complexo inorgânico. Localizada principalmente no citoplasma, pode ser encontrada em pequenas quantidades no plasma sanguíneo (~100 ng/mL).^{104,105} As ferritinas isoladas de mamíferos são, na verdade, misturas de isoferritinas com composição variada de subunidades e conteúdo de ferro. São descritos dois tipos de subunidades constituintes das isoferritinas denominadas H ou L de acordo com a seqüência de seus polipeptídeos. São esperados então 25 tipos de isoferritina, variando suas subunidades de H₂₄L₀ à H₀L₂₄.¹⁰⁶ As isoferritinas com maior número de subunidades L possuem, em média, mais de 1.500 átomos de Fe(III) por molécula.⁹¹ Esta nomenclatura foi adotada porque isoferritinas ricas em subunidades L foram encontradas inicialmente no fígado (*Liver*), mas foi adaptada para *light* pois possui 174 resíduos de aminoácidos¹⁰⁷ e estão presentes também em outros órgãos estocadores de ferro (ex.: baço). Por outro lado, as isoferritinas com maior número de subunidades H foram encontradas

originalmente no músculo cardíaco (*Heart*) mas por possuir 182 resíduos de aminoácidos e estão presentes em órgãos como coração e cérebro, sua denominação atual como H vem de *heavy*.¹⁰⁷ As isoferritinas ricas em subunidades H possuem menos de 1.000 átomos de Fe(III) por molécula.⁹¹ Apesar das diferenças estruturais, as subunidades H e L possuem 55% de homologia em suas sequências de aminoácidos.^{91,107}

Ao final de cada subunidade, as ferritinas possuem um núcleo apolar caracterizado como ferridrito ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)¹⁰⁸ sendo que cada átomo de Fe(III) deste complexo é ladeado por aproximadamente 6 átomos de oxigênio.¹⁰⁹⁻¹¹¹ Este sítio tem sido relacionado com a capacidade ferroxidásica da ferritina. O núcleo da ferritina contém, geralmente, íons de fosfato inorgânico, sendo este fosfato caracterizado como fator importante para a entrada de Fe(III) na cavidade da ferritina.¹¹² Não há evidências de que o fosfato esteja presente no núcleo da apoferritina, mas sabe-se que ferritina de baço de cavalo contém aproximadamente 1 fosfato para cada 10 íons de ferro incorporado.¹¹³ Apesar de não se saber exatamente qual a função fisiológica de fosfato no núcleo da ferritina, sabe-se que este ânion facilita a formação do núcleo inorgânico e assiste a oxidação de Fe(II) a Fe(III) inerente à apoferritina.^{114,115}

Não se sabe ao certo de que forma o ferro chega a ferritina, nem qual seu doador intracelular, mas sabe-se que a entrada de ferro na ferritina é gradual.⁹¹ Os resultados experimentais são de difícil interpretação pois há intensa competição pelo ferro entre as subunidades protéicas, a superfície da cavidade e as interfaces das subunidades.⁹¹ Sabe-se também que todo Fe(II) que chega até a ferritina é cataliticamente oxidado a Fe(III) antes de atingir a cavidade.⁹¹

A capacidade ferroxidásica de ferritina humana está diretamente ligada a suas subunidades H,^{107,112-117} onde foi identificada uma ponte dimérica de Fe(III) como intermediária do processo de oxidação de Fe(II) a Fe(III). A subunidade L está diretamente ligada à capacidade de formação dos núcleos inorgânicos de Fe(III), na subsequente mineralização e no armazenamento do Fe(III) por longos períodos de tempo.^{91,118} Fica claro então que uma boa estratégia de detoxificação de Fe(II) nas células repousa na presença de isoferritinas contendo tanto subunidades H e L, sendo que a primeira é

responsável pela rápida oxidação de Fe(II) a Fe(III) e a segunda responsável pela incorporação e nucleação do *cluster* inorgânico. Foi observada uma velocidade ótima de incorporação de ferro em isoferritinas com uma quantidade de subunidades H entre 5 e 8.¹¹⁹

A liberação de ferro de ferritina pode ser feita *in vitro* por diversas substâncias. Entre elas pode-se citar o íon superóxido,^{120,121} flavinas reduzidas,^{122,123} semiquinonas¹²⁴ e o radical enoil de ALA.⁸⁹ Mas, *in vivo*, há propostas que esta liberação de ferro é feita por uma ferri-redutase dependente de NAD(P)H através do uso de uma lançadeira de flavinas reduzidas,¹²⁵ apesar de sua concentração intracelular ser baixa.

A liberação de ferro de ferritina prenuncia a peroxidação lipídica.¹²¹ Foi provado que as EROs formadas durante a oxidação aeróbica de ALA, além de liberarem Fe(II) da ferritina,⁸⁵ provocam danos a sua estrutura proteica.¹²⁶ Estes danos são detectados principalmente pela diminuição da fluorescência dos resíduos de triptofano e por mudanças no espectro de dicroísmo circular da proteína, indicadores do teor de α -hélice. As principais mudanças nas características físico-químicas da ferritina são a diminuição de sua capacidade ferroxidásica e de sua capacidade de incorporação de Fe(III).

Esquema 8. Liberação de Fe(II) de ferritina *in vivo*

Algumas desordens podem ser caracterizadas pelo alto nível de ferritina sérica tais como doenças renais, doenças de fígado, AIDS e câncer.¹²⁷

Abdalla et al.,¹²⁸ em seus estudos *in vitro*, descrevem que a presença de concentrações elevadas de ferritina em tecidos suscetíveis a inflamação crônica pode exacerbar a lipoperoxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Neste processo, a liberação de ferro de ferritina por ânion superóxido gerado durante o “burst” respiratório de neutrófilos aumenta a formação de LDL oxidado que, após incorporação por macrófagos, pode potencialmente induzir a formação de ateromas.¹²⁹

1.7. Ceruloplasmina

Cobre, assim como ferro, é um metal essencial à nutrição humana.¹³⁰ Ele é importante para o funcionamento normal do metabolismo celular, estando presente em todos os órgãos e tecidos humanos, principalmente no fígado, cérebro e cabelos.¹³¹ O conteúdo total de cobre em um adulto varia entre 50 e 80 mg, sendo absorvido principalmente pelo intestino e excretado pela bile. Sua absorção está em estreita competição com ferro e zinco.¹³²

As principais enzimas que dependem de cobre são a CuZn-superóxido dismutase (SOD) e a citocromo oxidase (cit_{a3}), formadas principalmente no fígado.^{131,133} Outra proteína, formada no fígado, que contém cobre é a ceruloplasmina (CP), responsável por aproximadamente 95% do cobre plasmático.¹³⁴ Sua síntese é influenciada pela quantidade de estrógeno e sua concentração plasmática é de 350 mg/L.¹³⁰

Ceruloplasmina é uma proteína com cadeia polipeptídica simples, possui aproximadamente 1.046 resíduos de aminoácidos, até 4 cadeias de carboidratos (7-8% do peso total) e sua massa total é de 132 kDa.¹³⁵ Sua estrutura foi determinada por métodos cristalográficos usando radiação X sincrotron e provou-se que a CP possui 6 átomos de cobre integrais (podendo chegar a 9 átomos).¹³⁶

No início, CP foi caracterizada como uma simples proteína transportadora de cobre, tendo papel fundamental no transporte deste metal do fígado para os demais tecidos do organismo.¹³⁷ Hoje, apesar de não ser clara a função fisiológica da CP, foram desveladas mais quatro características suas, além do

transporte de cobre: (a) função ferroxidásica;¹³⁸ (b) função aminoxidásica;¹³⁹ (c) função NO-oxidásica;¹⁴⁰ e (d) função antioxidante.¹⁴¹

O função de transporte de cobre fica evidenciada pois sabe-se que CP está ligada a 95% do cobre plasmático e que pacientes com a doença de Wilson não possuem CP circulante, havendo acúmulo de cobre no fígado, cérebro, rins e córnea destes pacientes.¹⁴² Além disso, CP possui habilidade para transferir íons cobre para outras proteínas dependentes de cobre e é a principal fonte de cobre para recém-nascidos (absorvido através do leite materno e líquido amniótico).^{143,144}

Sua função ferroxidásica ficou evidenciada após a constatação de que CP é capaz de oxidar Fe(II) de forma eficiente a Fe(III) *in vitro*.¹³⁹ Sabe-se que pacientes com deficiência de biossíntese de CP possuem acúmulo de ferro no cérebro, no fígado e no pâncreas, levando ao aparecimento de diabetes e demência.¹³⁹ A CP pode aumentar várias vezes a velocidade de carregamento de apoferritina através de sua capacidade ferroxidásica, sugerindo um papel cooperativo na detoxificação de ferro por ferritina.¹⁴⁵

São conhecidos alguns fatos que evidenciam a sua capacidade aminoxidásica, tais como: CP é capaz de oxidar aminas aromáticas e catecóis,¹³⁹ assim como óxido nítrico *in vitro*¹⁴⁶ e catalisa a oxidação da 6-hydroxidopamina sem a formação de intermediários semiquinóides e espécies reativas de oxigênio.¹⁴⁷ A perda da atividade aminoxidásica de CP é utilizada como ferramenta para diagnosticar fase de rejeição de transplantes de órgãos.

Ceruloplasmina catalisa a S-nitrosação de tióis, inclusive a glutatona, o que poderia, pelo menos em parte, explicar a depleção de tióis no diabetes.¹⁴⁰

A atividade antioxidante de CP é, na verdade, derivada das outras atividades, ou seja: quando há oxidação de Fe(II) para Fe(III) ou quando há retirada de cobre livre da circulação há claramente um papel detoxificante pois CP indisponibiliza estes metais para a catálise da reação de Fenton.

O nível plasmático de CP tem sido relacionado com a incidência de aterosclerose e outras doenças cardiovasculares.¹³⁵ Altos níveis plasmáticos de CP são encontrados em pacientes com aterosclerose,¹⁴⁸ aneurisma aórtico abdominal,¹⁴⁹ angina e vasculites.¹⁵⁰ Há relatos de que há aumento dos níveis

séricos de CP em pacientes com diabetes do tipo II, correlacionado com um decréscimo dos níveis séricos de óxido nítrico.¹⁵¹ Este fato pode estar correlacionado com a observação de que a hiperglicemia aumenta os níveis séricos da CP.

Na última década, tem ganhado importância a proposta de que há uma ligação direta entre o metabolismo de cobre e o de ferro em mamíferos.^{152,153} Reilly e Aust¹⁵⁴ formularam a hipótese de que existe uma interação direta entre as duas proteínas, sendo necessário que ferritina esteja diretamente ligada a ceruloplasmina para que haja cooperatividade. Dados experimentais^{155,156} indicam que a eficiência máxima de cooperatividade entre CP e ferritina é atingida quando se tem uma relação molar de 1:1 entre ceruloplasmina e maior número de cadeias H da ferritina, a subunidade que possui atividade ferroxidásica.⁹¹ Van Eden e Aust demonstram também que a interação CP:ferritina é específica para cada espécie e que, para a eficiência da interação, a CP deve estar intacta, sem ter sofrido prévia proteólise.¹⁵⁷

A hipótese de Reilly e Aust foi comprovada *in vitro*,^{158,159} mas o grande desafio é a demonstração de que esta interação entre CP e ferritina possa se dar *in vivo*, uma vez que CP é uma proteína essencialmente plasmática enquanto ferritina é citoplasmática. A argumentação usada por Aust, para justificar seus resultados e a possível interação CP:ferritina *in vivo*, parte do princípio de que a atividade ferroxidásica das cadeias H de ferritina só é mensurável em tampões ótimos, ou seja, em ambientes extremamente diferentes dos observados na célula, e que o carregamento de ferritina por sua própria atividade ferroxidásica gera radicais livres (inclusive radical hidroxil), capazes de provocar danos a biomoléculas.¹⁶⁰ Outro argumento é que, apesar de CP não ser uma proteína intracelular, neste ambiente pode-se encontrar proteínas que possuam a mesma atividade que CP.¹⁶¹ Além disso, há relatos da presença de mRNA para CP em órgãos não secretores tais como coração, cérebro e pulmão, sendo que este mRNA é induzido em condições de estresse oxidativo.¹⁶²⁻¹⁶⁵ Um análogo de CP foi encontrado, purificado e caracterizado em cérebro sugerindo a produção de CP não só pelo fígado como por outros órgãos.¹⁶⁶ Estes dados sugerem um possível papel de CP, ou de uma proteína muito semelhante estruturalmente

com CP, no carregamento de ferro em apoferritina *in vivo*. Apesar de todo o conhecimento construído até hoje sobre a CP, seu papel fisiológico e patológico ainda não foram estabelecidos claramente.

2.Objetivos

Antes de apresentarmos os objetivos desta tese, devemos fazer algumas considerações no que concerne às propostas mecanísticas da oxidação enzimática de AA.

A SSAO, apesar de ser uma aminoxidase e estar distribuída no plasma e em diversos tecidos no organismo humano (acentuadamente em diabéticos), não é específica para AA. Seu substrato mais reativo é uma monoamina não-endógena, benzilamina e, nos tecidos, está ligada ao meio extra-celular. A função metabólica da SSAO permanece desconhecida, assim como a função metabólica da AA. Além do mais, é difícil aceitar que a regulação da proliferação celular possa ser feita por MG, um composto citotóxico e, assim, é difícil aceitar que SSAO possa ter alguma participação neste controle de proliferação. Outro fato importante é que a AA é um metabólito mitocondrial enquanto SSAO está localizada na face externa da membrana plasmática. Dessa forma o metabolismo oxidativo de AA e seus efeitos deletérios podem, além de associados à atividade enzimática da SSAO, estarem associados com sua oxidação química. Por outro lado, Kawanishi⁹⁰, em sua proposta mecanística, não leva em consideração a capacidade de AA (uma α -aminocetona) sofrer enolização.

Nossa proposta inicial de trabalho é que AA, similarmente ao ALA, pode sofrer enolização em pH fisiológico e subsequente oxidação aeróbica com a produção de NH_4^+ , MG e $\text{O}_2^{\bullet-}$, espécies reconhecidamente tóxicas capazes de atacar biomoléculas e estruturas sub-celulares.

Foram realizados os seguintes estudos:

- A) Mecanismo pelo qual AA sofre oxidação aeróbica não enzimática na presença e ausência de catalisadores metálicos;
- B) Produção de EROs durante a oxidação de AA;
- C) Efeito destas EROs sobre proteínas estocadoras de metais de transição, tais como ferritina e ceruloplasmina; e
- D) Ação de AA sobre mitocôndrias isoladas de fígado de ratos.

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich ou Merck e apresentam alto grau de pureza. Piridina, éter etílico, anidrido acético e etanol, utilizados na síntese da AA foram purificados conforme métodos descritos na literatura.¹⁶⁷ Todos os tampões foram preparados com água Milli-Q[®] e tratados previamente com CHELEX[®]. As dosagens protéicas foram feitas utilizando método de Bradford.¹⁶⁸

3.2. Métodos

3.2.a. Preparação de aminoacetona¹⁶⁹

Uma mistura de glicina (1,0 mol), piridina (6,0 mol) e anidrido acético (12,0 mol) foi aquecida até o refluxo do solvente e foi deixada sob agitação por 6 horas. Após decorrido este tempo o excesso de piridina, anidrido acético e ácido acético foram rotoevaporados a pressão reduzida porém sem aquecimento. O resíduo, um óleo negro, foi destilado à pressão reduzida (~0,5 mmHg). O produto, acetoamidoacetona, tem aparência oleosa, cor amarelada e foi obtido com rendimento de 75%.

A acetoamidoacetona assim obtida (0,45mol) foi dissolvida em 350 mL de HCl 6 M. A mistura foi aquecida até a ebulição por 6 horas, sob atmosfera de N₂. A solução resultante foi concentrada em rotoevaporador, sem que a temperatura do banho chegasse a 60°C, até que toda a água, HCl e ácido acético (formado na reação) fossem eliminados. O óleo castanho obtido foi dissolvido em etanol superseco e, após adição de éter seco, ocorreu sua recristalização (relação etanol:éter 2:8). Por ser muito higroscópica, a aminoacetona resultante foi filtrada em atmosbag, sob atmosfera de N₂ e seca em dessecador, sob pentóxido de fósforo, pesada em frascos de penicilina, selados sob nitrogênio e armazenados em congelador (-20°C).

3.2.b. Preparação de metilglioxal¹⁷⁰

1,1-Dimetoxipropanona (100 mmol) recém-destilada foi dissolvida em 300 mL de solução 5% de ácido sulfúrico em água destilada. A mistura final foi aquecida por uma hora em um banho-maria. Decorrido este tempo, a mistura foi destilada em uma coluna de fracionamento Vigreux de 34 cm (comp.) x 1,5

cm ($\varnothing_{\text{int}}$) sob pressão reduzida (~ 20 mmHg). Para determinação do metilglioxal nas frações destiladas foram adicionadas alíquotas destas frações a 3 mL de tampão fosfato 100 mM (pH=7,4) contendo 67 mM de cloridato de semicarbazida. A absorção molar do metilglioxal-disemicarbazona foi determinada a 286 nm. O coeficiente molar de extinção do metilglioxal-disemicarbazona é igual à $32,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.2.c. Determinação da concentração de metilglioxal¹⁷¹

Aminoacetona (5 mM) foi deixada reagir com oxigênio, em tampão fosfato 100 mM (pH 7,4), por duas horas a 37°C. A reação foi realizada em tubo Eppendorff de 1 mL de modo a não haver ar entre a tampa e a solução. Após duas horas de reação o frasco foi aberto e adicionado 50 μL de HCl 6,0 N a fim de parar a reação. Foi adicionado ao frasco reacional *o*-diaminobenzeno (concentração final 100 mM) e a mistura foi deixada em agitação por mais duas horas à 60°C. O tubo foi centrifugado por 5 minutos a 12.000 g e o sobrenadante obtido foi filtrado e analisado por HPLC.

3.2.d. Determinação da concentração de amônio

Amônia foi determinada em uma mistura reacional contendo AA (5 mM) em tampão fosfato 100 mM (pH 7,4) a 37°C. A reação foi realizada em tubo Eppendorff de 1 mL, de modo a não haver ar entre a tampa e a solução, e deixada sob agitação por 2 horas. Após este tempo amônia foi determinada espectrofotometricamente pela diminuição na absorbância em 340 nm devido a oxidação de NADPH ($\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) usando um kit comercial (Ammonia Diagnostic Kit, Sigma) baseado na aminação enzimática de α -oxoglutarato dependente de NADPH.

3.2.e. Oximetria e espectrofotometria

Os experimentos para caracterização da cinética de consumo de oxigênio foram realizados em um oxígrafo Hansatech Instruments interfaceado a um microcomputador IBM-PC Pentium e equipado com eletrodo de Clark. Os espectrofotômetros utilizados foram um Beckman modelo DU-70, um Hitachi modelo U-2000 e um SLM-Aminco DW-2000 com feixe duplo.

3.2.f. Preparação de oxi-hemoglobina e oxi-mioglobina¹⁷²

Oxi-hemoglobina (oxi-Hb) e oxi-mioglobina (oxi-Mb) foram preparadas por dissolução da hemeproteína comercial em tampão Tris/Gly 10 mM (pH 7,4) seguida de adição de ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) até a solução atingir a coloração vermelha intensa. O excesso do reagente redutor foi eliminado por filtração em coluna Sephadex-G25 equilibrada no mesmo tampão. As preparações de oxi-Hb foram consideradas boas para o uso quando a razão A_{577}/A_{540} foi superior a 1,04. Para a oxi-Mb a razão A_{582}/A_{543} deveria ser maior que 1,02. As concentrações de oxi-Hb e oxi-Mb foram determinadas espectrofotometricamente usando $\epsilon_{577} = 14,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e $\epsilon_{582} = 16,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, respectivamente.

3.2.g. Purificação de ferritina¹⁷³

Para retirada do excesso de íons ferro de ferritina (*loosely bound iron*), foi preparada uma solução (1:1) da proteína comercial em tampão Tris/HCl 20 mM, (pH 7,4) contendo NaCl 140 mM e EDTA 10 mM. Esta solução foi incubada por 1 hora a 4°C. Depois, a ferritina foi purificada em coluna Sephadex G-25 (2 g para cada 0,5 mL de ferritina), usando como eluente o tampão Tris/HCl descrito acima.

3.2.h. Preparação de apoferritina¹⁷⁴

Uma solução de ferritina em tampão acetato 200 mM (pH 5,5) contendo tioglicolato 1% e 2,2'-bipiridil 10 mM a 4°C foi colocada em uma cela de ultrafiltração com capacidade de 10 mL equipada com uma membrana PM10 (Amicon) e um reservatório com capacidade para 40 mL de solução. Através de um fluxo de nitrogênio foi forçada a passagem de solução redutora até que a solução proteica ficasse incolor e que nenhum traço de Fe(II) pudesse ser detectado espectrofotometricamente no ultrafiltrado. Então o reservatório foi preenchido com tampão acetato 100 mM (pH 5,5) contendo 2,2'-bipiridil 5 mM. Finalmente o reservatório foi preenchido com tampão MOPS 10 mM (pH 7,0) e, após passagem de 80 mL deste tampão, a apoferritina estava pronta para ser usada.

3.2.i. Separação de isoferritinas com diferentes relações Fe(III)/fosfato¹⁷⁵

A separação foi obtida por ultracentrifugação da ferritina de baço de cavalo (~ 13 mg) em gradiente descontínuo de sacarose em tampão Tris/HCl

(20 mM, pH 7,4). Após a coleta das frações, elas foram dialisadas em NaCl (50 mM) contendo CHELEX[®]. Para cada fração foram determinadas as quantidades de fosfato total, ferro total e proteína, a fim de classificá-las por sua relação ferro:fosfato (Fe(III):Pi).

3.2.j. Estudos com ferritina¹⁷³

A liberação de ferro de ferritina foi acompanhada espectrofotometricamente pelo aumento da absorbância em 530 nm devido à capacidade do sulfonato de batofenantrolina quelar Fe(II) ($\epsilon_{530} = 22,14 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A mistura reacional continha 1 mM de batofenantrolina e 0,25 mg/mL de ferritina de baço de cavalo. A reação foi iniciada pela adição de AA à mistura.

3.2.k. Análise de aminoácidos de ferritina

Uma solução de ferritina (4 mg/mL) foi incubada com AA 10 mM em tampão fosfato 100 mM (pH 7,4) contendo EDTA 100 μM por 24 h a 37°C. A solução final foi seca e depois hidrolisada com HCl 6 N por 20 horas a 110°C antes da análise. Os aminoácidos nativos foram quantificados com um analisador de aminoácidos Beckman 7300. Cada análise foi calibrada com um padrão para todos os aminoácidos, em concentração 15 nM. O limite de detecção é de apenas 1 nm para cada aminoácido.

3.2.l. Medidas de fluorescência de triptofano

A emissão de fluorescência entre 310 e 360 nm (excitação em 280 nm) foi usada como indicadora da quantidade de triptofano em uma amostra. Para medir a diminuição da fluorescência do triptofano, apoferritina (1 mg/mL) ou triptofano comercial (10 mM) foram incubados em tampão fosfato 100 mM (pH 7,4) com AA (1, 5 e 10 mM) na presença e ausência de manitol (50 mM) por 24 h a 37°C. Os resultados foram apresentados como porcentagem do controle (100%).

3.2.m. Medida de grupos tióis na apoferritina¹⁷⁶

Apoferritina de baço de cavalo (1 mg/ml) foi incubada na presença e ausência de AA 10 mM por 24 h em tampão fosfato 100 mM (pH 7,4; 37°C). O conteúdo de tióis proteicos foi medido colorimetricamente após reação com ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzóico). Aliquotas contendo 50 μg de proteína foram adicionadas a 1 ml de EDTA 0,5 mM, tampão Tris/HCl 0,5 M (pH 8,3)

contendo ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzóico) 0,1 mM. Após 15 min, o aduto foi medido através de sua absorção em 412 nm. O ensaio foi feito usando glutatona como controle.

3.2.n. Análise de incorporação de ferro em apoferritina¹⁰¹

Apoferritina (50 mg/mL) foi incubada com AA 10 mM em tampão fosfato 100 mM (pH 7,0) por 24 h a 4 ou 37°C. Aliquotas de apoferritina (50 µg/mL) foram então adicionadas a uma solução de sulfato ferroso amoniacal 100 µM e a oxidação de Fe(II) foi acompanhada pelo aumento da absorbância em 310 nm *vs.* 600 nm. O coeficiente de extinção utilizado para os cálculos foi igual a $2,48 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.2.o. Análise da atividade ferroxidásica de apoferritina¹⁷⁷

A atividade ferroxidásica da subunidade H da apoferritina foi medida usando apotransferrina como aceptor de Fe(III). Apoferritina (1 mg/mL) foi incubada com AA 10 mM em tampão fosfato 100 mM (pH 7,0; 37°C) por 24 h. A atividade ferroxidásica foi medida após adição de ferritina 0,1 mg/mL e transferrina 5 mg/mL a uma solução de sulfato ferroso amoniacal 0,1 mM. As leituras de absorbância foram feitas a 470 nm e 600 nm durante pelo menos 5 min para medir a incorporação de ions Fe(III) pela apotransferrina. O coeficiente de extinção da transferrina diférrica utilizado para os cálculos foi igual a $2,3 \times 10^3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.2.p. Preparação de mitocôndrias de fígado de rato¹⁷⁸

Para preparação de mitocôndrias foram utilizados ratos do tipo Wistar, machos, com dois meses de idade (200-250 g), deixados em jejum por 12 horas antes de serem sacrificados por guilhotinamento. A cavidade abdominal foi exposta, o fígado foi removido rapidamente e lavado em solução gelada de sacarose 250 mM contendo 1 mM de EGTA e 10 mM de tampão Hepes (pH 7,2). O tecido foi picado com tesouras cirúrgicas e lavado extensivamente até todo o sangue ser removido do tampão. O tecido foi então dividido em quatro partes e cada uma delas homogenizadas em aproximadamente 50 mL do mesmo tampão. A suspensão resultante foi centrifugada por 10 min a 4°C e 2.000 g. Após centrifugação, o sobrenadante foi filtrado através de gaze e centrifugado a 10.000 g por 10 min. O precipitado foi ressuspenso em

aproximadamente 30 mL de solução de sacarose contendo EGTA 0,1 mM e Hepes 5 mM (pH 7,2) e centrifugado novamente a 10.000 g por 10 min. O precipitado final foi ressuspenso em poucas gotas de solução de sacarose 125 mM sem EGTA. A concentração final de proteína, em média, foi de 100 mg/mL. A suspensão final de mitocôndria deve permanecer em banho de gelo e mantém-se útil por aproximadamente 4 h, apesar de sua integridade declinar gradualmente após isolamento.

3.2.q. Estudos de inchamento mitocondrial⁸⁴

Os experimentos de inchamento mitocondrial foram feitos em tampão Hepes 10 mM (pH 7,2; 25°C) contendo sacarose 125 mM. Às cubetas contendo AA (0,5 a 5 mM), rotenona 4 μ M e mitocôndria 0,5 mg/mL, foi adicionado succinato 2,5 mM para iniciar a reação. O inchamento mitocondrial foi avaliado através do monitoramento das mudanças espectrais em 520 nm.

3.2.r. Ativação de Sepharose[®] e purificação de ceruloplasmina¹⁷⁹

Sepharose[®] (aproximadamente 100 mL) foi ressuspensa em 70 mL de NaOH 5 M com agitação constante em um banho de gelo. Foi adicionado lentamente epícloridrina (7 mL) e após alguns minutos foi adicionado NaBH₄ (0,5 g). A mistura foi incubada a 40°C por uma hora e então incubada a 60°C por mais duas horas. Decorrido este tempo a resina foi filtrada em funil Buchner e lavada com água destilada até o pH tornar-se neutro. A resina obtida foi ressuspensa em NaOH 2 M (70 mL) contendo NaBH₄ (0,25 g). A mistura foi aquecida a 95°C por 45 min e então lavada com 1 L de NaOH 1 M contendo 5 g de NaBH₄ seguida de lavagem com água até a neutralidade. O excesso de NaBH₄ foi retirado por adição de ácido acético diluído (pH 3-4; aprox. 500 mL) à resina seguido de lavagem com água até a neutralidade do pH. A resina tratada foi então ressuspensa em NaOH 10 M (70 mL) com agitação constante, a temperatura elevada até 60°C e então adicionou-se lentamente cloroetilamina 100% (~100 mL) tomando-se o cuidado de manter o pH entre 10 e 12. A resina foi incubada mais uma vez por 2 horas a 70°C e lavada com água até a neutralidade do pH. A resina assim tratada pôde ser então ressuspensa em tampão fosfato e estava pronta para o uso, sendo que cada mL de resina comporta no máximo 10 mg de CP.

Após retirada do sangue, o plasma foi diluído duas vezes em tampão fosfato 50 mM (pH 6,8), contendo ácido ϵ -aminocapróico 20 mM a fim de evitar proteólise da CP. A mistura de plasma e tampão foi eluída na sepharose ativada com gradiente contínuo de tampão fosfato (de 100 mM até 200 mM). A separação foi feita a 4°C e as frações de coloração azul foram separadas. Frações com $A_{610}/A_{280} > 0,045$ foram consideradas puras.

3.2.s. Medidas da atividade ferroxidásica de ceruloplasmina¹⁷⁹

Ceruloplasmina (7 μ M) foi incubada em tampão fosfato 100 mM (pH 7,4) com AA (2,5, 5,0 e 10,0 mM) por 24 horas. Aliquotas de proteína (0,30 μ M) foram retiradas e a atividade ferroxidásica foi medida em tampão acetato 300 mM, pH 6,0 através do monitoramento do aparecimento de íons Fe(III) a 310 nm após adição de Fe(II) ($\epsilon = 2.475 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

3.2.t. Medidas da atividade aminoxidásica de ceruloplasmina¹⁷⁹

A atividade aminoxidásica de CP foi medida através da reação da proteína com *p*-fenilenodiamina (PPD). O ensaio tem como base o consumo de NADH pelo primeiro produto de oxidação de PPD. Ceruloplasmina (0,5 mg/mL) foi inicialmente incubada com AA (5 mM) por determinados intervalos de tempo e alíquotas da reação foram retiradas para executar-se a determinação de sua atividade. Esta foi realizada em tampão fosfato 100 mM pH 6,3 contendo DTPA 0,25 mM, NADH 0,25 mM e KCl 12 mM. Após adição de PPD (50 μ g), a reação foi acompanhada espectrofotometricamente através do decaimento da absorção em 340 nm.

3.2.u. Determinação de concentração de íons cobre livres¹⁸⁰

Ceruloplasmina (7 μ M) foi incubada em tampão fosfato 100 mM (pH 7,4) com AA (2,5, 5,0 e 10,0 mM) por 1, 2, 5, e 10 horas e, então, as soluções de proteína foram ultra-filtradas usando filtros Millipore® Ultrafree-MC ("cutoff" = 3kDA). As concentrações de íons cobre foram determinadas nos ultra-filtrados por espectrofotometria de absorção atômica em um equipamento Shimadzu modelo AA-6601F.

3.2.v. Agregação de ceruloplasmina promovida por aminoacetona¹⁸⁰

Amostras de CP (0,2 mg/mL) foram incubadas na ausência (controle) e na presença de AA em tampão fosfato 100 mM (pH 7,4) a 37°C por 8 horas.

Decorrido este tempo alíquotas da mistura reacional (aprox. 5 µg de proteína) foram diluídos com “sample buffer” concentrado (Tris 0,25 mM, Glicerol 40%, azul de bromofenol 0,01%). As soluções resultantes foram submetidos a uma eletroforese em gel (native-PAGE) de acrilamida 10% ou como indicado nos resultados. Os géis resultantes foram corados com solução de Coomassie brilliant blue R-250 0,15% ou solução de *o*-dianisidina 0,1% em solução 30% em etanol e registradas digitalmente.

4. Resultados e Discussão

4.1. Preparação e caracterização físico-química de aminoacetona

Há muito tempo, sabe-se que AA só é estável em soluções com pH ácido. Por isso foi preparado seu sal de amônio com HCl, a partir de anidrido acético e glicina, através das duas etapas sintéticas descritas no esquema 9.¹⁶⁹

Esquema 9. Síntese da aminoacetona

A primeira reação representa a preparação da acetamidoacetona, cujo produto é na verdade sua forma *N*-acetilada. Este composto foi caracterizado por CG-MS e ¹H RMN.

¹H-RMN, CDCl₃/TMS; δ (ppm): 1,97(3H, s, H₁); 2,18 (6H, s, H₃); 4,36 (2H, s, H₂);
CG-MS (m/z): 157,2 (C₇H₁₁NO₃⁺); 115,0 (C₅H₉NO₂⁺).

Ponto de ebulição entre 87 e 89°C a 0,2 mmHg (p.e._{lit.}=120-125°C a 1 mmHg).

O rendimento foi de 75%, dentro do relatado na literatura (70 a 78%).¹⁶⁹

A reação subsequente consiste na hidrólise da acetoamidoacetona em meio ácido para obtenção do cloridrato de AA. Esta reação é muito simples do ponto de vista sintético mas, por ser o produto facilmente oxidado, ela deve ser realizada sob atmosfera de nitrogênio e em vidraria rigorosamente isenta de contaminação por íons metálicos.

Cloridrato de aminoacetona foi obtido com rendimento de 48%, considerado satisfatório por nós. Por tratar-se de reagentes de baixo custo comercial, a preparação pôde ser repetida várias vezes. O produto foi caracterizado por ¹H-RMN.

^1H -RMN, DMSO- d_6 (I); $\delta(\text{ppm})$: 2,16 (3H, s, H_1); 3,56 (2H, s, H_3); 8,23 (2H, s, H_2);

^1H -RMN, D_2O (II); $\delta(\text{ppm})$: 2,09 (3H, s, H_1); 3,93 (4H, s, H_2) para **pH 3,0**.

^1H -RMN, D_2O (III); $\delta(\text{ppm})$: 2,17 (3H, s, H_1); para **pH 7,4**.

O pK_a de AA foi determinado por titulação potenciométrica como sendo igual a 6,8, indicando que em pH fisiológico a forma predominante de AA em solução é sua forma desprotonada (Figura 1).

Figura 1: Titulação potenciométrica de aminoacetona. Aminoacetona 10 mM foi titulada potenciometricamente com solução de NaOH 100 mM a 25°C em atmosfera de nitrogênio.

Através do espectro de ^1H -RMN realizado em D_2O , pH aproximadamente 3, pôde-se caracterizar a AA. Porém em pH $\sim 7,4$ os sinais relativos ao grupo $-\text{CH}_2-$ desaparecem, devido à enolização do substrato, cujos prótons são cambiáveis por D^+ do meio.

4.2. Determinação do mecanismo de oxidação aeróbica de aminoacetona

A capacidade de AA sofrer oxidação aeróbica catalisada por SSAO foi descrita em detalhes na seção 1.2. da Introdução. A hipótese aqui aventada é de que AA, além de sofrer oxidação catalisada por SSAO, pode reagir diretamente com oxigênio na ausência de enzima (Esquema 10).

Esquema 10. Hipótese de trabalho

Desta forma, serão apresentados inicialmente os experimentos realizados com o intuito de desvendar o mecanismo pelo qual AA sofre oxidação aeróbica não-enzimática.

4.2.a. Análise dos produtos de reação

Evidentemente, a elucidação do mecanismo pelo qual AA sofre oxidação aeróbica passa pela análise dos produtos finais esperados desta reação: MG, amônio e H₂O₂. As determinações foram realizadas em soluções de AA 5 mM incubada em tampão fosfato 100 mM (pH 7,4; 37°C). A reação foi realizada de modo que o oxigênio fosse limitante da reação, utilizando tubos Eppendorff com o mínimo de espaço entre a solução e a tampa a fim de eliminar as bolhas de ar e possível redissolução de O₂ na solução. A formação estequiométrica de H₂O₂ foi confirmada com o uso de catalase, quando metade do oxigênio consumido foi devolvido à solução, e será descrita no item 4.1.c.

Metilglioxal foi derivatizado com *o*-diaminobenzeno (*o*-DB) sendo que a melhor condição experimental para determinação de MG exigiu que, após a incubação na presença de *o*-DB, a reação fosse terminada pela adição de HCl e a mistura resultante aquecida a 60°C por mais duas horas. A partir de AA 5 mM, na ausência de ferro adicionado, encontramos 205 ± 13 μM (triplicata) de MG. A determinação de amônio na mistura final de reação foi realizada com a utilização de um "kit" da Sigma, baseado na aminação enzimática de α-oxoglutarato

dependente de NADPH. A concentração determinada para NH_4^+ foi $212,4 \pm 16 \mu\text{M}$ (triplicata) para reação na ausência de ferro adicionado.

As concentrações tanto de MG quanto de NH_4^+ e H_2O_2 determinadas são, portanto, estequiométricas com a concentração de O_2 dissolvido em solução aquosa a 37°C e totalmente consumido pela AA (nas condições experimentais a concentração de O_2 dissolvido é de $\sim 200 \mu\text{M}$).¹⁸¹

4.2.b. Consumo de oxigênio por aminoacetona

Paralelamente às determinações dos produtos de reação, foram feitos experimentos para caracterizar cineticamente a capacidade de AA sofrer oxidação aeróbica e o mecanismo pelo qual tal reação ocorre. Métodos convencionais de oximetria foram empregados para verificação da capacidade de AA reagir com oxigênio gerando espécies reativas e radicais livres. Estes estudos foram realizados na ausência de metais e sob adição de complexos de ferro ou cobre.

Reações na ausência de metais de transição

Aminoacetona mostrou-se capaz de consumir o oxigênio presente em tampão fosfato de forma dependente de sua concentração e seguindo uma cinética de autooxidação.

Figura 2: Consumo de oxigênio por aminoacetona. A cinética de consumo de oxigênio por AA foi monitorada em tampão fosfato 100 mM (pH 7,4; 37°C) com adições de AA: 1,0 mM (A); 3,0 mM (B); 5 mM (C) e 7 mM (D).

As velocidades máximas de consumo de oxigênio (k_{obs} , s^{-1}) respondem de forma linear ao aumento das concentrações de AA (3-20 mM) e permitiram o cálculo de uma constante de velocidade aparente de segunda ordem para a reação, $k_2 = 0,160 \pm 0,007 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Figura 3).

Figura 3: Efeito da concentração de aminoacetona na velocidade de reação. Valores das velocidades máximas de consumo de oxigênio por AA foram medidas em tampão fosfato 100 mM (pH 7,4; 37°C). Para o cálculo dos valores de k_{obs} e k_2 foi considerado $[\text{O}_2] = 200 \mu\text{M}$.

Tanto a adição de DTPA (3 mM) quanto a adição de desferral (3 mM) não alteram significativamente as velocidades de consumo de oxigênio por AA, indicando a ausência de íons de metais de transição contaminantes, capazes de catalisar a reação.¹⁸²

A velocidade de consumo de oxigênio por AA aumenta com o aumento da concentração do tampão fosfato. Em tampão Hepes ou em tampão Tris/HCl (ambos 100 mM), a velocidade é menor que em tampão fosfato nas mesmas condições (Tabela 1). Este dado pode ser explicado pelo fato de que oxi-ânions tais como OH^- , carbonato, bicarbonato, fosfato e hidrogenofosfato são bons catalisadores (catalise básica geral) para interconversão ceto-enólica, envolvendo abstração de prótons dos grupos metilênicos vizinhos à carbonila.¹⁸³

Tabela 1: Interdependência entre velocidade de consumo de oxigênio por AA e a natureza e concentração do tampão^a

Tampão	Concentração (mM)	Consumo de oxigênio ($\mu\text{M}/\text{min}$) ^b
Fosfato	10	0,65
	50	1,14
	100	3,90
	250	6,63
	500	10,11
Hepes	100	0,30
Tris/HCl	100	2,00

^a Consumo de oxigênio por AA 5 mM em tampão (pH 7,4, 37°C).

^b Valores de velocidade reprodutíveis dentro de 15% (triplicatas).

Os resultados apresentados na tabela 1 podem ser tomados como um indício de que a reação entre AA e oxigênio deve ser precedida pela conversão da forma AA-ceto para a forma AA-enol e que tal interconversão é catalisada por fosfato inorgânico. Tanto Hepes quanto Tris não possuem a mesma capacidade para catálise e a diminuição na velocidade pode indicar uma menor reatividade da espécie AA-ceto frente a oxigênio.

Reações na presença de metais de transição

Oxidações aeróbicas de ácidos poli-insaturados, proteínas e DNA estão implicadas no desenvolvimento de várias patologias e efeitos tóxicos distintos de substâncias exógenas.¹⁸⁴ Contudo, a reação de oxigênio com diversas biomoléculas apresenta restrições cinéticas, uma vez que o estado fundamental do oxigênio molecular é o estado triplete o que impõe uma restrição de *spin* à reação. As reações observadas entre oxigênio e biomoléculas, longe de serem reações de autooxidação, são geralmente catalisadas por metais de transição, uma vez que tais metais são eficientes catalisadores de reações redox e suas reações com oxigênio não possuem restrições de *spin*.¹⁸² Dentre os metais de transição,

ferro e cobre apresentam um papel central na geração de EROs. Seu ciclo redox promove a reação de Fenton com a produção de radical hidroxil ($\text{HO}^\bullet$).¹⁸⁵

Nossos estudos elegeram o ferro como catalisador da reação de oxidação de AA, em virtude de descarga de ferro estar implicada nas patologias em que supostamente AA se acumula. Para efeitos comparativos, foram realizados alguns experimentos com Cu(II) mesmo sabendo-se que Kawanishi e colaboradores descrevem um mecanismo distinto para oxidação de AA (1 mM) na presença de tais íons.⁹⁰

A utilização de ferro como catalisador das reações estudadas exigiu o emprego de quelantes para este metal, uma vez que íons de ferro se precipitam na forma de hidróxido em pH fisiológico. O principal quelante utilizado foi o EDTA, utilizado amplamente em estudos modelo com íons ferro, mas foram também testados outros com importância biológica (ATP e citrato). Deve-se lembrar que as concentrações intracelulares do “pool” de ferro quelatável não ultrapassa 2,5 μM .⁹⁵

Tabela 2: Velocidade do consumo de oxigênio por aminoacetona na presença de complexos metálicos

Complexo metálico ^a (μM)	Consumo de $\text{O}_2^{\text{b,c}}$ ($\mu\text{M}/\text{min}$)	Complexo metálico ^a (μM)	Consumo de $\text{O}_2^{\text{b,c}}$ ($\mu\text{M}/\text{min}$)
Nenhum	3,9	Cu(II) H_2O (10)	7,3
Fe(II)EDTA (30)	12,5	Cu(II) H_2O (50)	77,7
Fe(III)EDTA (30)	3,9	Cu(II)EDTA (100)	4,9
Fe(III)EDTA (300)	15,5	Cu(II)histidina ^d (30)	26,5
Fe(II)ATP (150)	5,0		
Fe(III)ATP (150)	3,8		
Fe(II)citrato (300)	5,3		
Fe(III)citrato (300)	6,1		

^aRelação metal:quelante igual a 1:1,2; ^b Velocidades de consumo de oxigênio por AA 5 mM em tampão fosfato (pH 7,4; 37°C); ^c Valores de velocidade reprodutíveis dentro de 15% (triplicatas); ^d relação Cu(II):histidina igual a 1:2

Adições de Fe(II) e Cu(II) ao sistema de autooxidação de AA foram estudadas, tendo-se observado aumento na velocidade de reação de consumo de oxigênio (tabela 2). O cobre II em solução aquosa mostra-se o catalisador mais eficiente porém, como já informado anteriormente, a reação tem produtos de reação diferentes daqueles na ausência de metal. Quando EDTA foi utilizado como quelante, Fe(II) torna-se um catalisador mais eficiente que Cu(II). O maior efeito catalítico de Fe(II) quando comparado a Fe(III) pode ser atribuído à autooxidação de Fe(II), com geração de íon $O_2^{\bullet-}$, um iniciador e propagador da reação, como será discutido na seção seguinte. No entanto foi notada saturação na velocidade de consumo de oxigênio com concentrações de Fe(II) maiores que 30 μM . Nas mesmas condições, tanto Fe(III)EDTA e complexos entre Fe(II) e Fe(III) com ATP ou citrato foram ineficazes como catalisadores, contudo estes complexos apresentam efeitos catalíticos quando empregados em concentrações maiores ($\sim 200 \mu M$).

Outro íon testado foi o Mn(II), mas surpreendentemente ele se mostrou um inibidor da reação, tanto na presença como na ausência de EDTA; concentrações de Mn(II) entre 1 e 200 μM resultaram em velocidades de consumo de oxigênio entre 0,1 a 0,5 $\mu M/min$.

Com base no consumo de oxigênio por AA na presença de Fe(II)EDTA 30 μM , foi construída a curva de dependência entre velocidade de reação e a variação do pH do meio.

Figura 4: Perfil de pH da oxidação da aminoacetona catalisada por Fe(II)EDTA. A velocidade de consumo de oxigênio por AA 5 mM na presença de Fe(II)EDTA 30 μM foi monitorada em tampão fosfato 100 mM (37°C) em diferentes pH.

A inflexão observada em pH 7,2 é ligeiramente acima do pK_a da AA ($pK_a=6,8$), sendo este mais um resultado que corrobora a proposta de prévia enolização da AA antes da sua oxidação aeróbica.

Concluindo, os resultados obtidos tanto na ausência de metais de transição claramente demonstram que AA sofre oxidação aeróbica produzindo MG e NH_4^+ . Na presença de ferro, o MG não foi detectado na mistura final de reação, a qual apresentou um precipitado escuro, provavelmente oriundo de reação do derivatizante utilizado (*o*-diaminobenzeno) com O_2 e ferro.

As reações redox de biomoléculas com oxigênio frequentemente requerem sua redução por um elétron com a formação sequencial de $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e água. Assim, serão apresentados experimentos realizados com a finalidade de se determinar quais são as EROs formadas durante a reação entre AA e oxigênio, bem como verificar seu papel no mecanismo de reação.

4.2.c. Oxidação de aminoacetona na presença de SOD, catalase e semicarbazida

CuZn-superóxido dismutase, semicarbazida e catalase foram adicionados à mistura reacional na presença e ausência de ferro, com o intuito de se confirmar

o envolvimento do íon $O_2^{\bullet-}$ e de H_2O_2 no mecanismo de reação (Figura 5 e Tabela 3).

Figura 5: Efeito da adição de SOD no consumo de oxigênio por aminoacetona. O consumo de oxigênio por AA foi medido em tampão fosfato 100 mM (pH 7,4; 37°C) contendo: apenas AA 5 mM na ausência (A) e presença de SOD (50 unidades/mL; B), e com adição de Fe(II)EDTA 30 μ M na ausência (C) e na presença (D) SOD 50 unidades/mL.

Tabela 3: Efeito de SOD, catalase e semicarbazida sobre o consumo de oxigênio por aminoacetona^a

Sequestrador	Metal	Inibição (%)
Catalase	+ Fe(II)	53
Catalase	- Fe(II)	40
SOD	+ Fe(II)	22
SOD	- Fe(II)	90
semicarbazida	$\pm$ Fe(II)	80

^a Consumo de oxigênio por AA 5 mM em tampão fosfato 100 mM (pH 7,4; 37°C) na presença (+) e na ausência (-) de Fe(II)EDTA 30 μ M. Catalase, 4,5 μ M; SOD, 50 unidades/mL; semicarbazida, 5 mM. Os valores obtidos para a inibição são reprodutíveis dentro de 15% (triplicatas).

Os resultados apresentados tanto na figura quanto na tabela acima mostram que sequestradores de $O_2^{\bullet-}$, tais como SOD e semicarbazida, são capazes de

diminuir a velocidade de consumo de oxigênio quando adicionados ao meio reacional. Isto evidencia a participação de $O_2^{\bullet-}$ na propagação da reação de autooxidação da AA (Tabela 3 e Figura 5, linha B). De forma surpreendente, SOD (50 unidades/mL) exerce apenas um pequeno efeito sobre a velocidade de consumo de oxigênio por AA na presença de Fe(II)EDTA (Tabela 3 e Figura 5, linha D). Este fato pode ser interpretado como o resultado de uma redução direta de dois elétrons do oxigênio a H_2O_2 ou inativação da enzima pelo alto fluxo de radicais $HO^{\bullet}$. Este resultado será analisado adiante quando os resultados de EPR forem apresentados.

Quando a reação de consumo de oxigênio por AA foi realizada na presença de catalase, observou-se uma diminuição de cerca de 50% na velocidade da reação tanto na presença quanto na ausência de metais de transição (Tabela 3). Sabendo-se que a ação de catalase sobre H_2O_2 produz oxigênio ($catalase + H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2} O_2$) em uma relação $H_2O_2:O_2$ de 2:1, pode-se concluir que neste experimento não houve uma inibição efetiva da reação, mas sim a devolução ao meio reacional de metade do oxigênio consumido. Portanto, este resultado não só caracteriza H_2O_2 como produto de reação mas também que esta espécie é produzida estequiometricamente em relação ao oxigênio consumido.

Foi demonstrado por Mashino e Fridovich¹⁸⁶ que íons $O_2^{\bullet-}$ são capazes de abstrair um elétron de di-hidroxiacetona e iniciar sua autooxidação. Para testar o efeito desta espécie reativa na cinética da oxidação de AA, a reação foi estudada na presença do sistema xantina/xantina oxidase como fonte geradora de $O_2^{\bullet-}$.

Figura 6: Co-oxidação de aminoacetona com o sistema xantina/xantina oxidase. O consumo de oxigênio foi acompanhado em tampão fosfato 100 mM (pH 7,4; 37°C) contendo: AA 1 mM (controle, linha A); o sistema xantina (50 μ M)/xantina oxidase (60 nM; controle, linha B); e o sistema completo (linha C)

O resultado apresentado na figura acima mostra claramente que o sistema xantina/xantina oxidase empregado é capaz de acelerar a reação de consumo de oxigênio por AA de forma sinérgica. Este resultado juntamente com o efeito de SOD e semicarbazida sobre a velocidade de reação e o efeito de fosfato na autooxidação de Fe(II) confirmam um importante papel de íons $O_2^{\bullet-}$ na etapa de iniciação da reação.

4.2.d. Estudos de ressonância paramagnética eletrônica (EPR)

Para melhor entender o sistema de AA e identificarmos os radicais formados durante sua reação de autooxidação, foram realizados estudos de EPR com a técnica de “spin trapping” usando-se DMPO como captador.

Figura 7: Estudos de EPR sobre o efeito de ferro e SOD sobre a oxidação aeróbica de aminoacetona. Espectro de EPR dos adutos DMPO-radical foram obtidos após 10 min de incubação de AA 5 mM a em tampão fosfato 100 mM (pH7,4; 25oC) com DMPO 100 mM: controle sem AA (A); adição de DTPA 100 μ M (B); adição de SOD 50 unidades/mL e DTPA 100 μ M (C); adição de Fe(II)EDTA 30 μ M (D); adição de Fe(II)EDTA 30 μ M e SOD 50 unidades/mL (E); e adição de DMSO (10% v/v) e DTPA 100 μ M (F). Condições experimentais: potência; 20,2 mW; amplitude de modulação 1,0; constante de tempo: 1,63 s; velocidade de aquisição: 0,1 G/s; ganho: $1,12 \times 10^{-6}$.

As atribuições dos sinais de EPR se basearam nos valores observados das constantes de acoplamento hiperfino, comparados com dados da literatura.¹⁸⁷

O espectro B, relativo a mistura de DMPO com AA, apresenta 4 linhas (marcadas com o símbolo -o-) com constantes de acoplamento hiperfino $a_N = a_H = 14,6$ G. Estes sinais foram atribuídos ao aduto DMPO- $\cdot$ OH, formado após decomposição do aduto DMPO- $O_2^{\cdot-}$ ($a_N = a_H = 14,8$ G, segundo Kohno e col.¹⁸⁸ para o sistema xantina/xantina oxidase e $a_N = a_H = 14,87$ G para o ALA).¹⁸⁹ Isto pôde ser confirmado pelo efeito supressor de SOD adicionada nas intensidades dos sinais observado (espectro C). Ainda neste espectro pode-se observar a presença de um sinal com 6 linhas ($a_N = 15,5$ G e $a_H = 23,2$ G) atribuível a um radical centrado em carbono, provavelmente o radical enoil de aminoacetona ($AA^{\cdot}$; discutido abaixo). Como a adição de DTPA não provocou nenhum efeito sobre os

sinais observados nos espectros B e C (não apresentado), pode-se considerar a ausência de metais contaminantes que, porventura, poderiam agir como catalisadores da reação de Fenton. A formação do radical $\text{HO}^\bullet$ na ausência de ferro pode ser explicada pela redução de H_2O_2 pelo provável radical $\text{AA}^\bullet$ (Fenton orgânica) da mesma forma como demonstrado com semiquinonas por Monteiro *et al.*¹⁹⁰

Com a adição de Fe(II)EDTA ao sistema, são observados dois grupos de sinais menos intensos (espectro D): o primeiro grupo, com 6 linhas (marcadas com o sinal -x-) com $a_N = 15,5 \text{ G}$ e $a_H = 23,2 \text{ G}$, atribuído ao aduto DMPO com um radical centrado em carbono (hipoteticamente $\text{AA}^\bullet$; $a_N = 16,56 \text{ G}$ e $a_H = 23,68 \text{ G}$, para o ALA);¹⁸⁹ o segundo, com 4 linhas, atribuído ao aduto $\text{DMPO-}^\bullet\text{OH}$. Neste sistema contendo Fe(II)EDTA , não se observou efeito inibitório de SOD na relação de intensidades dos dois grupos de sinais (espectro E). Este fato está consistente com os dados obtidos nos experimentos de consumo de oxigênio (Figura 4). O aumento nas intensidades dos sinais observados após adição de SOD (espectro D *vs.* espectro E) pode ser o resultado da maior formação de H_2O_2 por transferência concomitante de um elétron de Fe(II) e outro de AA para O_2 . A adição de DMSO à mistura reacional contendo Fe(II)EDTA causou a formação esperada do aduto $\text{DMPO-}^\bullet\text{CH}_3$ ($a_N = 15,9 \text{ G}$ e $a_H = 23,2 \text{ G}$, espectro F), onde os grupos metila resultam da oxidação de DMSO por radicais $\text{HO}^\bullet$.

Deve-se salientar que todos os sinais apresentados na Figura 6 estão ausentes nos experimentos controle sem adição de AA (espectro A) e tanto na presença quanto na ausência de SOD e Fe(II)EDTA .

Os resultados até então apresentados, suportam as seguintes conclusões parciais:

1. Em pH fisiológico, aminoacetona sofre rápida tautomerização, catalisada por fosfato, à sua forma enólica, seguida de consumo de oxigênio;
2. Metilglioxal, NH_4^+ e H_2O_2 são produtos de oxidação de AA, em concentrações estequiométricas com o oxigênio consumido;
3. Íons radicais superóxido iniciam e propagam a reação de autooxidação de AA;

4. Um radical centrado em carbono, provavelmente $AA^\bullet$, é intermediário da reação; e
5. O mecanismo de oxidação de AA catalisada por íons de ferro difere do mecanismo de sua autooxidação.

Com base nestes resultados, é imperativa a proposição de dois possíveis mecanismos para a reação entre AA e oxigênio:

A) **Reação de autooxidação:** Após enolização, AA sofre reação de oxidação por oxigênio com formação do radical enoil $AA^\bullet$, enquanto oxigênio é reduzido a $O_2^{\bullet-}$. Tanto $O_2^{\bullet-}$ quanto $AA^\bullet$ podem propagar a cadeia de reação. A oxidação de $AA^\bullet$ produz a imina de AA (AA_{imino}) que, após hidrólise produz MG e NH_4^+ em quantidades estequiométricas em relação ao O_2 consumido, enquanto $O_2^{\bullet-}$ pode sofrer dismutação ou redução a H_2O_2 (Esquema 11).

Esquema 11. Mecanismo de autooxidação de aminoacetona

B) **Reação de oxidação catalisada por metais de transição:** Após a etapa de enolização, AA forma um complexo com $Fe(II)$ e oxigênio. Em seguida há transferência simultânea de dois elétrons (um de AA, outro de $Fe(II)$) para oxigênio com formação direta de H_2O_2 , $AA^\bullet$ e $Fe(III)$.

Posterior formação de radicais $\text{HO}^\bullet$ a partir da reação de H_2O_2 com Fe(II) ou AA pode amplificar a cadeia de reação (Esquema 12).

Esquema 12. Mecanismo de oxidação catalisada por Fe(II) de AA

O mecanismo proposto para autooxidação de AA é consistente ao proposto para a oxidação de ALA (seção 1.4.). Por outro lado, o mecanismo proposto para reação de oxidação de AA na presença de íons ferro é análogo ao descrito por Caughey e colaboradores para reação entre oxi-hemoglobina, oxigênio e nucleófilos.¹⁹¹

Caracterizados os mecanismos de reação, serão apresentados a seguir resultados relativos à ação das EROs formadas durante oxidação aeróbica de AA sobre biomoléculas e mitocôndrias.

4.3. Co-oxidação de aminoacetona e hemoglobina ou mioglobina

Tanto hemoglobina quanto mioglobina são consideradas fontes biológicas de oxi-radicais em eritrócitos, agindo como complexo de ferro capaz de catalisar reações de Fenton. Nucleófilos podem atuar como indutores da transformação de oxi-hemoglobina a meta-hemoglobina com a formação de $O_2^{\bullet-}$.¹⁹² Este é o caso de ALA demonstrado por Monteiro e colaboradores¹⁹³ capaz de induzir a conversão de oxi-Hb a met-Hb.

A fim de verificar um papel idêntico de AA, como pró-oxidante das hemoproteínas, foram realizados experimentos com oxi-mioglobina e oxi-hemoglobina. A adição tanto de oxi-hemoglobina (oxi-Hb) quanto de oxi-mioglobina (oxi-Mb), ambas em uma concentração de 10 μ M, aumentou consideravelmente a velocidade de consumo de oxigênio ao sistema de autooxidação de AA 5 mM (respectivamente 10 e 8 vezes). Paralelamente, as hemoproteínas sofreram conversão às suas formas oxidadas (Figura 8).

Figura 8: Co-oxidação de aminoacetona e oxi-hemoproteínas. Comportamento temporal do espectro de oxi-hemoglobina (10 μ M, espectro A) e oxi-mioglobina (10 μ M, espectro B) na presença de AA 5 mM em tampão Tris-Gly 50 mM (pH 7,8; 36°C). OxiHb (A): 0, 10, 15, 20 e 25 min e após 60 min (linha tracejada) de incubação com AA. OxiMb (B): 0, 5, 10, 15, 20 e 25 min e após 60 min (linha tracejada) de incubação com AA.

A formação de meta-hemoglobina (met-Hb) foi caracterizada pelo decaimento da absorbância medida em 540 e em 577 nm, com pontos isosbéticos em 522 e

587 nm.¹⁷² A formação de meta-mioglobina (met-Mb) foi caracterizada pelo decaimento da absorbância medida em 543 e em 582 nm. Em ambos os casos a velocidade de co-oxidação das hemoproteínas responde de forma linear ao aumento da concentração de AA (0,5-5,0 mM). A oxidação de oxi-Hb foi inibida em 95% com a adição ao sistema de catalase 1 μ M e em apenas 13% pela adição de SOD 60 unidades/mL, indicando um papel principal de H₂O₂ via radical HO• e do complexo Hb-H₂O₂ neste processo. Deve-se salientar que, na ausência de AA, o espectro de absorção de ambas as hemoproteínas sofrem apenas variações muito pequenas ao longo do tempo.

Os resultados apresentados na figura 8 confirmam que durante oxidação aeróbica de AA ocorre co-oxidação de oxi-hemoglobina e oxi-mioglobina às respectivas meta-hemoproteínas. Desta forma, o sistema AA/hemoproteína poderia, através da geração de oxi-radicais, provocar danos a estruturas celulares. Não é de nosso conhecimento, entretanto, que a meta-hemoglobinemia seja uma característica das doenças ligadas ao acúmulo de AA.

Os experimentos cinéticos de autooxidação de AA na presença de oxi-Hb ou oxi-Mb (Figura 8-A e B) mostram que há um tempo de indução para a oxidação. Para oxi-Hb percebe-se o aumento na velocidade da reação de propagação dependente da concentração de oxi-Hb após aproximadamente 15 min de seu início. O mesmo observa-se para oxi-Mb, mas o tempo de indução é um pouco menor, aproximadamente 10 min. Nos primeiros minutos, percebe-se pequenas reduções na intensidade das absorções que se tornam mais rápidas com o tempo, culminando com a obtenção dos espectros das meta-hemoproteínas no final das reações.

O tempo de indução, para ambas as proteínas, pode ser creditado à ação inibitória do tampão, já que o tampão utilizado (Tris-Gly), sendo um sequestrador de oxi-radicais, retarda a autooxidação de AA. Quando os experimentos foram realizados em tampão fosfato, o tempo de indução desapareceu tanto para oxi-Hb quanto para oxi-Mb; em compensação não se observou efeito de dose de AA (dados não apresentados).

Sabe-se que o catabolismo de hemoglobina e mioglobina converge para a formação de hemoínas seguida de oxigenação das porfirinas com liberação de

ferro que se torna disponível para envolver-se em reações deletérias que competiriam com reações de reutilização do ferro liberado ou seu sequestro por ferritina.¹⁹⁴

4.4. Danos oxidativos à ferritina promovidos por aminoacetona

Anteriormente foi demonstrado que tanto complexos de metais de transição quanto hemeproteínas são catalisadores da oxidação aeróbica de AA (Tabela 2 e Figura 8).

Durante a realização do presente estudo foi dada especial atenção para metais de transição agindo como catalisadores de reações de formação de EROs por AA. Dos metais estudados o ferro foi mais explorado devido à sua importância, sua presença em vários tipos de seres vivos, sua grande capacidade de reagir com pró-oxidantes e produzir EROs e por estar acumulado em patologias onde são característicos os danos por EROs. Nada mais necessário, portanto, que se estude a principal proteína estocadora de ferro, a ferritina, e tentar relacionar sua presença com algumas manifestações clínicas em doenças onde há acúmulo de ferro.

Inicialmente foram realizados experimentos de consumo de oxigênio por AA na presença de ferritina. Estes estudos apresentam uma complicação inicial por dois motivos: (i) sabe-se que tampão Tris (usualmente utilizado na purificação desta proteína), por ser um amino-álcool, sequestra radicais hidroxil e pode assim inibir a reação de oxidação de AA (Tabela 1) e (ii) o uso de tampão fosfato certamente altera a relação ferro:fosfato na estrutura da ferritina, mudando assim suas características. Deste modo os experimentos de consumo de oxigênio por AA na presença de ferritina foram realizados nestes dois tampões a fim de se poder comparar os resultados.

Vimos que a velocidade de consumo de oxigênio por AA é aumentada quando na presença de metais de transição tais como ferro e cobre (seção 4.2.c). Na presença de ferritina também se observa um aumento da velocidade de consumo de oxigênio (Figura 9).

Figura 9: Efeito de ferritina e EDTA no consumo de oxigênio por aminoacetona. O consumo de oxigênio por AA foi medido em tampão fosfato 100 mM (A-Pi) e em tampão Tris-HCl (B-Tris), ambos pH 7,4 a 37°C, contendo: AA 5 mM, ferritina 0,25 mg/mL e EDTA 0,1 mM como indicado na figura.

A velocidade de consumo de oxigênio na presença de apenas AA 5 mM é 3,9 $\mu\text{M}/\text{min}$ quando o experimento é realizado em tampão fosfato (Figura 9, A-Pi). A adição de ferritina 0,25 mg/mL no sistema acelera a reação para 7,2 $\mu\text{M}/\text{min}$. Quando a reação é realizada em tampão Tris-HCl as velocidades de consumo de oxigênio decrescem relativamente ao tampão fosfato tanto na presença quanto na ausência de ferritina 0,25 mg/mL. Nestas condições, as velocidades na ausência e presença de ferritina são respectivamente 1,0 e 3,5 $\mu\text{M}/\text{min}$ (Figura 9, B-Tris). Sabe-se que fosfato catalisa a autooxidação de Fe(II) produzindo $\text{O}_2^{\bullet-}$, que já se mostrou eficiente na iniciação da reação de consumo de oxigênio por AA (Tabela 2). A adição de EDTA aumenta a velocidade de consumo de oxigênio por AA tanto em tampão fosfato quanto em tampão Tris-HCl. A tabela 4 apresenta os resultados descritos acima e outros obtidos com o uso de ATP e citrato como quelantes de ferro. Na presença destes quelantes, a velocidade de consumo de oxigênio pelo sistema AA/ferritina em tampão fosfato é aumentada, porém o aumento velocidade intrínseca de reação é bem menor em tampão Tris-HCl.

Tabela 4: Velocidades de consumo de oxigênio por aminoacetona em tampão fosfato e Tris-HCl

	Velocidade ($\mu\text{M}/\text{min}$)	
	Tris-HCl	Fosfato
AA	$1,0 \pm 0,3$	$3,9 \pm 0,6$
AA + Fe(II)EDTA	$12,0 \pm 0,7$	$17,4 \pm 0,9$
AA + Ferritina	$3,5 \pm 0,6$	$7,2 \pm 0,7$
AA + Ferritina + Citrato	$4,2 \pm 0,8$	$7,0 \pm 1,0$
AA + Ferritina + ATP	$5,1 \pm 0,8$	$8,4 \pm 1,0$
AA + Ferritina + EDTA	$11,4 \pm 1,0$	$15,0 \pm 1,2$

Mistura reacional: tampão Tris-HCl ou fosfato ambos 100 mM (pH 7,4; 37°C) suplementado por AA 5 mM, sulfato de ferro 30 μM , EDTA 0,1 mM, ATP 1 mM, citrato 1 mM e ferritina 0,25 mg/mL. Relação Fe(II): EDTA igual a 1:1,2. Os resultados são médias de três experimentos independentes $\pm$ SD.

Adição de quelantes de ferro, tais como citrato e ATP, não exerce efeito pronunciado na velocidade de reação quando comparada com a velocidade de reação na ausência de tais quelantes.

A liberação de ferro de ferritina, como descrito na seção 1.6. da Introdução pode ser feita *in vitro* por diversos pró-oxidantes, inclusive o radical enoil de ALA.⁸⁹ Uma vez demonstrado que durante a oxidação aeróbica de AA há formação de um radical centrado no carbono, assumido aqui como sendo o radical enoil $\text{AA}^\bullet$, foi estudada a possibilidade de AA promover a liberação de ferro de ferritina.

Como esperado, espécies reativas formadas durante a autooxidação de AA mostraram-se hábeis para liberar ferro de ferritina de baço de cavalo (Figura 10). Atribuiu-se a liberação de ferro de ferritina à ação tanto de $\text{O}_2^{\bullet-}$ quanto do hipotético radical $\text{AA}^\bullet$.

Figura 10: Liberação de ferro de ferritina induzida por aminoacetona. A figura mostra a liberação de ferro de ferritina (2,5 mg/mL) na ausência (controle, linha A) e presença de AA 0,5 mM (linha B). A liberação foi medida através do aumento da absorção em 530 nm devido a quelação de Fe(II) por batofenantrolina (1 mM). As linhas C e D representam respectivamente a adição de SOD 100 unidades/mL e a saturação da solução com nitrogênio.

Os experimentos controle (linhas A e D) mostram uma liberação de ferro residual mesmo na ausência de agentes redutores. A adição de SOD inibe parcialmente (~ 25%) a liberação de Fe(II) por AA (linha C) enquanto a saturação da solução tampão com nitrogênio bloqueia completamente a liberação (linha D). É importante notar que, na ausência de oxigênio, AA não é capaz de reduzir o Fe(III) de ferritina.

O mecanismo proposto para a liberação de Fe(II) considera a redução de Fe(III) estocado na cavidade da ferritina pelos radicais gerados durante a oxidação aeróbica de AA. A baixa afinidade de ferritina por íons Fe(II) faz com que esta espécie seja liberada para o meio extra-cavidade e o torne disponível ou para re-oxidação e incorporação ou para catálise de reações radicalares. O efeito da adição de SOD (0-400 U/mL) indica que $\text{O}_2^{\bullet -}$ responde no máximo por 25% da liberação total de ferro sendo o radical $\text{AA}^{\bullet}$ possivelmente responsável pelo restante do ferro liberado. Este efeito do radical enoil também foi observado nos estudos do sistema ALA/ O_2 /ferritina.^{85,89} Deaeração da solução, através de borbulhamento de N_2 , eliminou completamente a redução de Fe(III) à Fe(II) na

cavidade da ferritina. Estes resultados confirmam que a liberação de Fe(II) promovida por AA depende tanto de íon $O_2^{\bullet-}$ quanto do radical $AA^{\bullet}$, porém esta última espécie parece ter maior participação no mecanismo. Deve-se salientar que o radical enoil de ALA ($ALA^{\bullet}$) responde por, no máximo, 50% da liberação de ferro de ferritina promovida por ALA.⁸⁵

Sabe-se que a quantidade de fosfato inorgânico na cavidade da ferritina influencia a velocidade de formação do núcleo de ferridrito e portanto a velocidade de incorporação de ferro à apoproteína.¹⁰⁵ Desta forma é de grande interesse estudar isoferritinas com diferentes relações ferro:fosfato a fim de verificarmos o efeito do conteúdo tanto de ferro quanto de fosfato inorgânico sobre a velocidade de liberação de ferro de ferritina por AA.

Isoferritinas foram separadas por ultra-centrifugação diferencial e foram determinados os conteúdos de fosfato inorgânico e de ferro em cada fração separada. Analisada a liberação de ferro, percebeu-se que ferritinas com diferentes relações ferro/fosfato respondem de forma diferente quando incubadas na presença de AA (Tabela 5).

Tabela 5: Relação entre Fe(II) liberado de ferritina por aminoacetona e o conteúdo de fosfato na cavidade da proteína

Mol Pi/mol ferritina	Fe(II) liberado (μ M)	Mol Fe(III)/mol ferritina	Fe(III)/Pi
73 $\pm$ 5,8	6,2	183 $\pm$ 10	2,5
80 $\pm$ 5,3	6,4	226 $\pm$ 12	2,8
88 $\pm$ 5,0	6,5	135 $\pm$ 15	1,5
92 $\pm$ 5,4	6,8	240 $\pm$ 11	2,6
99 $\pm$ 4,9	7,0	435 $\pm$ 27	4,4
140 $\pm$ 5,2	7,7	390 $\pm$ 21	2,8
140 $\pm$ 4,6	7,9	470 $\pm$ 32	3,4
157 $\pm$ 4,6	8,1	265 $\pm$ 20	1,7
165 $\pm$ 5,2	8,4	860 $\pm$ 72	5,2
172 $\pm$ 3,8	8,5	297 $\pm$ 53	1,7

Mistura reacional: Tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7,4; 37°C) contendo sulfonato de batofenantrolina 1 mM, AA 5 mM e isoferritina 0,25 mg/mL. Os resultados são a diferença

entre o ferro liberado na presença de AA e o controle após 30 min de incubação. Os resultados são reprodutíveis dentro da faixa de 15% (triplicatas).

Uma correlação linear foi encontrada ($R = 0.992$; Figura 11) para a liberação de ferro dependente do conteúdo de fosfato na cavidade da ferritina, porém nenhuma correlação foi encontrada em relação ao conteúdo de ferro na mesma cavidade.

Figura 11: Liberação de $Fe(II)$ de ferritina com diferentes relações $Fe(III):Pi$ por aminoacetona. Liberação de $Fe(II)$ acompanhada pelo aumento da absorbância em 530 nm devido a ação quelante de batofenantrolina (1 mM) em tampão Tris/HCl (100 mM, pH 7,4 a 37°C) por 30 min. A mistura reacional continha 0,25 mg/mL de ferritina de baço de cavalo e 5 mM de AA.

Não é guardada nenhuma relação entre a quantidade de $Fe(III)$ estocado na ferritina e a quantidade de $Fe(II)$ liberada, indicando a participação direta de fosfato na formação e disposição do ferro na cavidade da ferritina. Sabe-se que a presença de fosfato na estrutura da ferritina afeta a cristalinidade do centro mineral da proteína,¹⁹⁵ altera o potencial redox da cavidade^{196,197} e promove reações redox específicas de ferro.¹⁹⁸ A quantidade elevada de fosfato em isoferritinas, além de produzir efeitos no potencial redox do ferro, afeta a estrutura dos cristais inorgânicos de ferro,¹⁹⁹ deixando-os mais planares e facilitando assim sua retirada por pró-oxidantes tais como AA.

As principais características da ferritina foram discutidas e apresentadas na seção 1.6. da Introdução, onde se mencionou que a ferritina possui atividade enzimática, principalmente atividade ferroxidásica, que auxilia na captação de ferro e portanto, é essencial em seu papel protetor. Porém sabe-se que modificações químicas na estrutura proteica da ferritina leva ao bloqueio de suas funções ferroxidásicas.²⁰⁰ Por outro lado, estudos realizados anteriormente com ALA mostraram que as espécies reativas formadas durante a autooxidação desta aminocetona eram capazes de provocar danos a estrutura proteica de apoferritina além da liberação de ferro da ferritina carregada.¹²⁶

Assim, foram feitos experimentos para verificar se EROs geradas durante a oxidação de AA podem afetar ou modificar quimicamente a estrutura da ferritina.

Inicialmente foram feitos estudos de agregação proteica de ferritina após incubação com AA na presença e ausência de sequestradores de radicais livres. Estes experimentos (Figura 12) forneceram dados qualitativos sobre o efeito de AA sobre a estrutura de apoferritina.

Figura 12: Danos oxidativos em apoferritina de baço de cavalo. Apoferritina 0,2 mg/mL foi incubada em tampão fosfato 100 mM (pH 7,4; 37°C) por 8 horas em: (A) com as concentrações indicadas de AA; (B) com AA 10 mM na presença dos seguintes sequestradores de radicais livres: ausência de sequestradores (banda 1, controle); apoferritina + AA (banda 2); banda 2 + SOD 0,1 mg/mL (banda 3); banda 2 + SOD 0,2 mg/mL (banda 4); banda 2 + catalase 0,1 mg/mL (banda 5); banda 2 + etanol 100 mM (banda 6); banda 2 + etanol 200 mM (banda 7); e banda 2 + manitol 200 mM (banda 8).

8). Todas as adições de sequestradores de radicais livres foram feitas antes da incubação com AA. Eletroforese em gel (native-PAGE) de acrilamida 10%.

Pode-se observar através da análise da Figura 12-A uma diminuição nas intensidades das bandas eletroforéticas após incubação de apoferritina com AA. Esta diminuição foi atribuída à agregação proteica, observada visualmente nos géis, promovida por AA. Superóxido dismutase mostrou-se capaz de proteger parcialmente a apoferritina de sofrer agregação (Figura 12-B, bandas 3 e 4) enquanto catalase, etanol e manitol não proporcionaram efeito protetor à apoferritina (Figura 12-B, bandas 5, 6, 7 e 8), confirmando o envolvimento de íon $O_2^{\bullet-}$ nos danos à proteína. A figura 12-A demonstra que, em paralelo à liberação de ferro, AA promove a agregação da apoferritina em uma forma aparentemente dose-dependente. A proteção contra a agregação proteica promovida pela adição de SOD na mistura reacional em paralelo à pouca proteção promovida por catalase e manitol sugere que $O_2^{\bullet-}$ é mais efetivo na promoção da agregação de apoferritina que H_2O_2 e $HO^{\bullet}$.

Após observação da modificação na estrutura proteica provocada por espécies reativas formadas durante autooxidação de AA, foram realizados experimentos de análise de resíduos de aminoácidos em apoferritina tratada com AA 10 mM. As análises de resíduos de aminoácidos não detectaram nenhuma alteração significativa no conteúdo de aminoácidos em relação às proteínas não tratadas com AA, indicando que os resíduos mais susceptíveis a oxidação por EROs (metionina, histidina, lisina, tirosina e prolina) não foram oxidados. Porém durante a preparação de amostras há necessidade de hidrolisar a proteína com HCl concentrado a quente, o que destrói outros dois resíduos de aminoácidos susceptíveis à oxidação: triptofano e cisteína.

A metodologia empregada para análise de resíduos de triptofano baseia-se na emissão fluorescente em 315 nm da apoferritina. Por ser a apoferritina uma proteína globular, esta emissão é geralmente atribuída exclusivamente à emissão do triptofano. A cinética de diminuição das intensidades de fluorescência tanto de apoferritina quanto de triptofano puro foi medida e os resultados estão apresentados na figura 13.

Figura 13: Efeito de aminoacetona na fluorescência de triptofano de apoferritina.

(A-Apo) Apoferritina 1 mg/mL foi incubada em tampão fosfato 100 mM (pH 7,4; 37°C) com: nenhuma adição (A, controle) e com adição de AA 1 mM (B), 5 mM (C), 10 mM (D) e AA 10 mM + manitol 50 mM (E). **(B-Trp)** Triptofano puro foi incubado com as mesmas adições e as mesmas condições experimentais. Os resultados representam as médias $\pm$ SD de 3 experimentos independentes.

As intensidades de fluorescência de triptofano de apoferritina após 5 horas de incubação com AA 1, 5 e 10 mM diminuíram 13, 27 e 30% respectivamente (Figura 13, A-Apo). Um efeito similar foi observado com triptofano incubado, porém com decréscimos de 4, 40 e 42% nas mesmas concentrações de AA (Figura 13, B-Trp). A adição de manitol 50 mM, um reconhecido sequestrador de $\text{HO}^\bullet$, mostrou-se pouco efetivo na proteção tanto de apoferritina quanto de triptofano puro (Figura 13, linhas E). Incubação prolongada (24 h) de apoferritina com AA não alterou significativamente as intensidades de fluorescência em relação àquela observada após 5 horas. A diminuição da emissão do triptofano de apoferritina apresenta certa dose-dependência com a concentração de AA.

Em experimentos paralelos, verificamos que incubação de apoferritina 0,2 mg/mL com AA 10 mM por 24 h produziu um decréscimo de 29% no conteúdo de tióis ($17,6 \pm 1,2$ vs. $24,8 \pm 1,3$ nM), medido por método colorimétrico. Este resultado indica que resíduos de cisteína também são oxidados por AA/ O_2 .

Tanto os resíduos de triptofano quanto os de cisteína danificados por AA podem estar em um sítio importante da apo-ferritina e mudanças na estrutura

proteica poderiam afetar o comportamento ferroxidásico da proteína. Por isso, foram feitos experimentos com o objetivo de verificar possíveis alterações na atividade oxidásica e capacidade de captação de ferro (Tabela 6).

Tabela 6: Efeito da incubação com aminoacetona sobre a atividade ferroxidásica e a captação de ferro de apoferritina.

Tratamento	Atividade ferroxidásica ^a (μM ferro/min)	Captação de ferro ^b (μM ferro/min)
Controle	$3,22 \pm 0,18$	$1,10 \pm 0,20$
+ AA 5 mM	$2,42 \pm 0,20^*$	$0,22 \pm 0,12^*$

^a Apoferritina 0,2 μM em tampão fosfato (100 mM, pH 7,4) foi incubada com AA 5 mM por 24 horas a 37°C. A atividade ferroxidásica após adição de apotransferrina 50 μM e sulfato ferroso aminiactal 0,1 mM foi medida através da diferença de absorbância a 470 nm *vs.* 600 nm ($\epsilon = 4.560 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) após 5 min em um espectrofotômetro de feixe duplo.

^b Apoferritina 0,1 μM em tampão fosfato (100 mM, pH 7,4) foi incubada com AA 5 mM por 24 horas a 37°C. A captação de ferro após adição de sulfato ferroso aminiactal 0,1 mM foi medida através da diferença de absorbância a 310 nm *vs.* 600 nm ($\epsilon = 2.475 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) após 20 min em um espectrofotômetro de feixe duplo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,08$

Os dados apresentados na tabela 6 mostram que a incubação de apoferritina com AA provoca um decréscimo de 25% na atividade ferroxidásica, uma propriedade associada às subunidades H.^{91,105} O mesmo tratamento provocou uma diminuição de 80% na capacidade de captação de ferro, uma habilidade dependente das subunidades L da apoproteína.

O efeito maior na capacidade de apoferritina captar ferro pode ser explicado através da composição da subunidades da apoferritina usada. Ferritina de baço de cavalo é constituída por 90 a 95% de subunidades L e sabe-se que a estocagem de ferro é favorecida em isoferritinas ricas em cadeias L, enquanto cadeias H são responsáveis pela atividade ferroxidásica.²⁰¹⁻²⁰⁴ Cisteína foi sugerida como contribuidora da atividade redox e à nucleação do ferro na cavidade da ferritina, enquanto o triptofano 93 estaria envolvido provavelmente na transferência de elétrons entre as subunidades H e L.²⁰⁵

Os resultados aqui apresentados indicam que EROs geradas durante oxidação aeróbica de AA são importantes agentes causadores de danos à estrutura proteica de apoferritina *in vitro*, com possível implicação na homeostase de ferro *in vivo*. A ação de AA sobre ferritina pode ser um dos mecanismos pelo qual pode-se explicar o aumento de estresse oxidativo induzido por ferro durante o acúmulo de AA observado em pacientes diabéticos.

4.5. Permeabilização mitocondrial induzida por aminoacetona

Há algum tempo sabe-se que a propriedade de a mitocôndria acoplar o consumo de oxigênio à fosforilação de ADP está prejudicada em pacientes diabéticos.²⁰⁶ Outro estudo demonstra um decréscimo no controle respiratório por parte da mitocôndria em estados de cetose em ratos com diabetes induzida e que este decréscimo está relacionado com uma condição de estresse agudo.²⁰⁷ Além disso, mitocôndrias de células β -pancreáticas produz EROs excessivamente durante a hiperglicemia com paralela supressão de secreção de insulina induzida por glicose.²⁰⁸ Estes fatos sugerem que o *diabetes mellitus* é um estado com potencial estado de déficit das funções mitocondriais.

As disfunções mitocondriais observadas em diabetes podem provocar um aumento na produção de EROs com consequências tanto na transcrição de DNA mitocondrial²⁰⁹ e na função respiratória.²⁰⁶⁻²¹² O DNA mitocondrial é muito mais sensível a modificações oxidativas que o DNA nuclear.^{213,214} Somando-se a isto o fato de que mitocôndrias de animais diabéticos estão expostas a um maior estresse oxidativo, justifica-se a relevância do estudo dos mecanismos moleculares que provocam a disfunção mitocondrial de diabéticos.

Como já demonstrado, reação de formação de EROs por aminoacetona são aceleradas na presença de metais de transição como o ferro. Sendo a mitocôndria intrinsecamente rica em ferro,²¹⁵ torna-se um potencial alvo de danos mediados por este metal em *diabetes mellitus*.

Usando técnicas de inchamento mitocondrial foi estudada a possibilidade de EROs geradas durante a oxidação aeróbica de AA promover danos à mitocôndria e consequente disfunção respiratória. Os efeitos de AA em mitocôndrias foram acompanhados pela diminuição na absorbância em 520 nm devido ao inchamento provocado pela ação de EROs na organela⁸³ (Figura 14).

Figura 14: Indução de inchamento mitocondrial por aminoacetona. Mitocôndria de fígado de rato (0,5 mg/mL) foi incubada na presença de rotenona 4 μ M e succinato 2,5 mM em tampão hepes (10 mM, pH 7,2 contendo sacarose 250 mM) na ausência (A) e na presença de AA: 0,15 mM (B); 0,25 mM (C); 0,5 mM (D) e 1,0 mM (E).

De fato, AA (0,15-1,0 mM; linhas B-E) induz o inchamento em mitocôndrias energizadas com succinato. Alguns autores propõem que Ca^{2+} pode mediar a ação deletéria de oxi-radicais formados durante autooxidação de ALA *in vitro*.^{216,217} Sugeriu-se que o aumento na permeabilidade da membrana mitocondrial seja promovido pelo Ca^{2+} intramitocondrial através da perda de Mg^{2+} ligado à membrana, sendo este efeito revertido pela adição de Mg^{2+} exógeno.²¹⁷ e referências citadas Para verificar se o Ca^{2+} intramitocondrial exerce também o mesmo efeito nos danos provocados por AA foi realizado experimento com a adição de Mg^{2+} e EGTA na mistura reacional (figura 15).

Figura 15: *Indução de inchamento mitocondrial por aminoacetona.* Mitocôndria de fígado de rato (0,5 mg/mL) foi incubada na presença de rotenona 4 μ M e succinato 2,5 mM em tampão hepes (10 mM, pH 7,2 contendo sacarose 250 mM) na ausência (A) e na presença de AA 1 mM (D) com adição de: EGTA 130 μ M (B) e Mg^{2+} 5,5 mM (C).

Tanto EGTA (Figura 15, linha B) quanto Mg^{2+} (Figura 15, linha C) aboliram a ação deletéria dos radicais gerados por AA sobre mitocôndrias isoladas. Pode-se atribuir a ação protetora do EGTA à complexação dos íons Ca^{2+} intramitocondrial, evitando assim sua conhecida ação promotora de danos. Já a adição de Mg^{2+} regenera o conteúdo deste metal ligado à membrana, evitando também o dano.

A fim de verificar a natureza dos danos na membrana interna das mitocôndrias por EROs, foram realizados experimentos comparativos na presença de *o*-fenantrolina (quelante de ferro), ditiotreitól (reduzidor tiólico), ciclosporina A (inibidor da abertura do poro de transição) e EGTA (quelante de cálcio) (Figura 16).

Figura 16: Indução de inchamento mitocondrial por aminoacetona. Mitocôndria de fígado de rato (0,5 mg/mL) foi incubada na presença de rotenona 4 μ M e succinato 2,5 mM em tampão Hepes (10 mM, pH 7,2 contendo sacarose 250 mM) na ausência (D) e na presença de AA 1,0 mM contendo: apenas AA (F); *o*-fenantrolina 100 μ M (B); DTT 1,0 mM (C); ciclosporina 1,0 μ M (E) e EGTA 100 μ M (A).

A ciclosporina adicionada inibe danos a mitocôndria apenas por alguns instantes, havendo lesão à membrana mitocondrial após um curto período de tempo (Figura 16, linha E). O EGTA por ser um quelante de Ca^{2+} intramitocondrial, como já mostrado na figura 15, indisponibiliza este metal que, de outra forma, acentuaria danos oxidativos à membrana (Figura 16, linha A). Tanto *o*-fenantrolina quanto DTT inibem o processo de danos causados por AA (Figura 16, linhas B e C), sugerindo o envolvimento de Fe(II) e H_2O_2 no mecanismo de dano e com preferencial ataque a grupos tiólicos de proteína. Os efeitos inibitórios de Mg^{2+} e ciclosporina sobre os danos causados por AA em mitocôndria sugerem que a permeabilização da membrana é mediada pela formação de um poro de transição.

Os dados apresentados aqui indicam que a permeabilização de membrana mitocondrial induzida por AA é dependente do cálcio intramitocondrial, pois Ca^{2+} por si só não é catalisador de reação de oxidação aeróbica da AA e a adição de EGTA, um quelante de Ca^{2+} , interrompe completamente o inchamento mitocondrial.

Já foi mencionado que AA é estruturalmente semelhante ao ALA e então deve-se esperar que o inchamento mitocondrial induzido por AA deva seguir o mesmo mecanismo descrito para o inchamento induzido por ALA, ou seja, os danos à membrana provocados por AA devem ocorrer a partir da formação de poros atribuíveis à agregação de proteínas via ponte de dissulfeto.^{84,216} Foi proposto um modelo de duas etapas para explicar o mecanismo de inchamento mitocondrial promovido por ALA.²¹⁷ Neste modelo a primeira etapa é a modificação de proteínas de membrana pelo radicais HO• ou ALA• com a consequente transição do estado nativo da proteína (chamado Impermeável I) para um estado suscetível a danos oxidativos (denominado Impermeável II). A segunda etapa consiste na ação do Ca(II) para promover mudanças conformacionais nas proteínas com a consequente formação dos poros na membrana (estado denominado Permeável) com o consequente inchamento mitocondrial e perda do potencial transmembrana. O mecanismo de abertura de poros de transição em mitocôndrias é sensível à Mg²⁺, ADP e ciclosporina A.²¹⁸⁻²²²

Sendo aminoacetona capaz de gerar radicais tais como HO• e AA• e promover a oxidação de resíduos de cisteína em ferritina, a hipótese aqui aceita para explicar o efeito do inchamento mitocondrial promovido por AA é a de que esta aminocetona promove a formação de poros na membrana mitocondrial tal como demonstrado para ALA. Deve-se notar que o efeito protetor tanto de DTT quanto de ciclosporina A reforça esta teoria para explicar a ação deletéria de AA sobre mitocôndrias através da formação de poros de transição.

O efeito de *o*-fenantrolina observado pode ser imputado à sua capacidade de quelar íons ferro presente dentro da mitocôndria. Sendo H₂O₂ um dos principais produtos da oxidação aeróbica de AA, a retirada de íons ferro por *o*-fenantrolina bloqueia a formação de HO• através da reação de Fenton. O efeito da adição de catalase na diminuição dos danos observados podem ser explicados com o mesmo argumento.

Tendo o Fe(II) se mostrado um excelente catalisador da reação de oxidação aeróbica de AA, algumas incubações de mitocôndrias com AA foram feitas na presença de ferritina visto que esta proteína é uma fonte intracelular de Fe(II) (Figura 17).

Figura 17: Indução de inchamento mitocondrial por aminoacetona. Mitocôndria de fígado de rato (0,5 mg/mL) foi incubada na presença de rotenona (4 μ M) e succinato (2,5 mM) em tampão Hepes (10 mM, pH 7,2 contendo sacarose 250 mM) na ausência (A) e na presença de AA (1,0 mM; C); na presença de ferritina (3 mg/mL, B) e na presença de ambas ferritina (3 mg/mL) e AA (1,0 mM, D).

Como esperado, a presença de ferritina nas misturas reacionais aumenta a velocidade de inchamento mitocondrial. O mecanismo proposto para este dano é justamente através do efeito de Fe(II) liberado de ferritina por AA, exarcebando o efeito já descrito para íons ferro constituintes da mitocôndria.

O fato de a ferritina exarcebar a velocidade de danos à membrana mitocondrial de forma nenhuma é surpreendente uma vez que esta proteína é fonte de Fe(II) *in vivo*, porém o fato de AA estar acumulada em diabetes e a ferritina ser uma proteína citosólica pode indicar este mecanismo como forte candidato aos danos oxidativos a proteínas da membrana mitocondrial nesta patologia. De fato, diante dos resultados apresentados é imperativo propor que, embasados no reconhecido efeito pró-oxidante de AA *in vitro*, a AA pode agir como uma fonte do desbalanço redox observado em pacientes diabéticos, causando o déficit na capacidade respiratória de mitocôndrias observada nestes pacientes.

4.6. Danos oxidativos à ceruloplasmina promovidos por aminoacetona

Nos estudos exploratórios com metais de transição, o cobre mostrou-se um excelente catalisador para reação de oxidação de AA. Foi discutido em seções precedentes que a velocidade de consumo de oxigênio por AA é aumentada quando na presença de complexos de cobre (Tabela 2). Neste contexto, é importante observar que ceruloplasmina, proteína responsável por 95% dos íons cobre circulante, tem seus níveis elevados em *diabetes mellitus* tipo II.¹⁵¹ Alguns autores atribuem à CP importante papel na homeostase de ferro, exercendo a função de oxidação de Fe(II) a Fe(III), auxiliando assim a apoferritina na incorporação desta espécie.¹⁵²⁻¹⁵⁴ Por outro lado, CP catalisa a S-nitrosação de grupos tiólicos de proteínas citoplasmáticas e mitocondriais.^{140,146}

De forma similar ao estudo realizado com a ferritina, decidimos investigar o efeito que AA pode ter sobre a estrutura proteica de CP. Na hipótese de AA, de fato, impor danos oxidativos à CP, isto poderia afetar tanto o metabolismo de ferro quanto o de cobre.

A primeira limitação nesta etapa de trabalho foi o fato de que CP comercial não preserva suas características estruturais, seja por problemas de purificação ou por transporte e estocagem inadequados. A CP utilizada foi preparada em colaboração com o Prof. Giuseppe Rotilio (Roma-Itália), especialista em estudos de relações estrutura/função tanto de SOD quanto de ceruloplasmina.

Inicialmente foram realizados estudos de consumo de oxigênio por AA na presença de CP (Figura 18).

Figura 18: Consumo de oxigênio por aminoacetona. Reações de consumo de oxigênio por diferentes concentrações de AA foram realizadas em tampão fosfato 100 mM (pH 7,4; 37°C) na presença (A) ou ausência (B) de ceruloplasmina 3,5 μM .

Em nossos estudos, assim como observado para ferritina, CP 3,5 μM mostrou-se eficaz em catalisar o aumento de velocidade de consumo de oxigênio por AA em cerca de 2,5 vezes. O aumento da velocidade de reação observado pode estar ligado a dois fatores: ou a simples catálise pelos íons de cobre ligados a proteína funcionando como um quelato deste metal ou, como no caso da ferritina, a liberação de íons Cu(II) da estrutura proteica por ação de EROs formados durante autooxidação de AA e subsequente catálise pela espécie $\text{Cu(II)}_{(\text{aq})}$. Uma vez que, após análise por ionização de chama, não foram observadas diferenças na quantidade de cobre ligado a proteína mesmo após incubação com AA (5-50 mM) por 8 h (não mostrado), a segunda hipótese pode ser descartada.

Este aumento de velocidade foi considerado modesto, uma vez que ambos os complexos $\text{Cu(II)H}_2\text{O}$ (50 μM) e Cu(II)histidina (30 μM) proporcionam aumento respectivamente de 30 e 7 vezes a velocidade da mesma reação (Tabela 2).

Sabe-se que alquil-peróxidos e radicais alquilperoxil são formados durante a peroxidação lipídica iniciada por di-hidrocloreto de 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) (AAPH).²²³ Por sua vez, Kang e colaboradores demonstraram que radicais peroxil são efetivos em provocar modificações oxidativas na estrutura proteica de ceruloplasmina humana.¹⁸⁰ Tendo por base esta literatura sobre

danos oxidativos infringidos à CP por radicais peroxil, investigamos o papel de EROs formadas durante a oxidação aeróbica de AA sobre a estrutura proteica de CP. Para tanto foram feitos experimentos para verificar agregação proteica de CP e possíveis alterações em suas atividades enzimáticas.

Figura 19: Efeito da aminoacetona sobre a atividade ferroxidásica de ceruloplasmina.

As atividades ferroxidásicas de amostras de CP foram medidas em tampão acetato 300 mM (pH 6,0; 37°C) através do monitoramento espectrofotométrico a 315 nm ($\epsilon=2.475 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) da velocidade do aparecimento de íons Fe(III) após adição de Fe(II). A determinação foi realizada com CP 0,3 μM (A, controle) ou com amostras de CP previamente incubadas com AA 2,5 mM (B), 5,0 mM (C) ou 10 mM (D). Os resultados foram obtidos em triplicatas.

Observou-se que a atividade ferroxidásica de CP foi reduzida após 24 h de incubação com AA (2,5-10 mM) em até 85% (Figura 19). A atividade aminoxidásica, por outro lado, foi diminuída em 80% para todas as concentrações utilizadas de AA, após uma hora de incubação.

Tanto a atividade ferroxidásica quanto a atividade aminoxidásica de CP dependem da relação entre os estados redox de seus seis íons de cobre e de sua estrutura proteica. A rápida interconversão entre os estados redox dos íons cobre de CP, essencial para a manutenção de suas atividades enzimáticas, pode ser prejudicada por alterações estruturais dos sítios ativos da proteína.

A adição de cloreto, íon capaz de auxiliar a re-oxidação de íons cobre de CP,²²⁴ não alterou os resultados obtidos, indicando que as alterações promovidas por AA provoca alterações estruturais importantes em CP.

Ceruloplasmina é caracterizada pela presença de diferentes sítios para íons cobre, geralmente agrupados em 3 tipos. Estes diferentes tipos de sítios acomodam os 6 íons cobre presentes na CP, sendo então três íons localizados em sítios do tipo 1, e os três restantes ligados em um “cluster” trinuclear com sítios dos tipos 2 e 3. Funcionalmente, CP oxida substratos através da aceitação de 1 elétron por vez em seus sítios do tipo 1 com subsequente transferência intramolecular para o “cluster” trinuclear que, por sua vez, transfere elétrons para O₂ com a formação de H₂O sem a formação de intermediários radicalares.^{225,226}

Como dito anteriormente, verificou-se que AA não é capaz de liberar íons cobre constituintes de ceruloplasmina. Geralmente a liberação de tais íons está relacionada aos íons ligados fracamente à proteína que, em nossos estudos, foram eliminados durante a separação e purificação de CP empregada aqui. Assim sendo, o efeito de AA sobre as atividades ferro- e aminoxidase da CP pode ser consequência de mudanças estruturais e de geometria dos sítios catalíticos da CP.

Pouco se sabe do mecanismo pelo qual a CP exerce suas atividades amino- e ferroxidásica, porém dados da literatura apontam para o fato de que pelo menos dois dos seis íons de cobre presentes na proteína agem de forma concomitante.²²⁷ Qualquer diferença na estrutura geométrica da proteína pode afetar a interação entre estes dois íons de cobre e assim suas atividades enzimáticas. Estudos foram realizados de forma a confirmar hipótese de que AA altera a estrutura proteica de CP (Figura 20).

Figura 20: Agregação de ceruloplasmina após incubação com aminoacetona. Ceruloplasmina (0,2 mg/mL) foi incubada com várias concentrações de AA por 8 horas (A) ou com AA 5 mM por diversos períodos de tempo (B). Condições experimentais: tampão fosfato 100 mM (pH 7,4; 37°C). Aliquotas de 5 µg de proteína foram analisadas por eletroforese em gel de acrilamida nativo a 6%.

A estrutura proteica de CP mostrou-se susceptível à ação de AA. Os estudos realizados com a incubação de CP com diversas concentrações das aminocetonas AA e ALA apresentam claramente uma dose-dependência quanto à agregação proteica (Figura 20-A). A agregação é tanto maior quanto maior o tempo de incubação (Figura 20-B).

Para elucidação do mecanismo de agregação de CP, foi avaliado o efeito que enzimas tais como SOD, catalase além de etanol exercem sobre a agregação proteica.

Figura 21: Efeito de SOD, catalase e etanol sobre a agregação de ceruloplasmina. Ceruloplasmina (0,2 mg/mL) foi incubada em tampão fosfato 100 mM (pH 7,4; 37°C) com AA 5 mM por 8 h na presença ou ausência de sequestradores de radicais livres. Todos os sequestradores foram adicionados antes da adição de AA. As misturas reacionais foram: CP intacta (linha 1); CP + aminocetona (linha 2); mesmo que linha 2 com adição de SOD 0,1 mg/mL (linha 3); mesmo que linha 2 com adição de SOD 0,3 mg/mL (linha 4); mesmo que linha 2 com adição de catalase 0,1 mg/mL (linha 5); e mesmo que linha 2 com adição de etanol 200 mM (linha 6). Alíquotas de 5 µg de proteína foram analisadas por eletroforese em gel de acrilamida nativo a 6 %.

Pode-se observar na figura 21 (bandas 3 a 6) o aparecimento de bandas com pouca mobilidade eletroforética. Estas bandas são atribuídas aos agregados proteicos, uma vez que estão presentes na proteína incubada com AA (banda 2) mas não na proteína nativa (banda 1). Desta forma pode-se afirmar que nenhuma das enzimas utilizadas foi efetiva para proteger a CP de danos provocados por AA. A ausência de efeito de SOD, catalase e etanol não exclui a possibilidade de que o radical enoil $AA^{\bullet}$ seja o principal agente oxidante, tal como observado no estudo dos danos provocados à apoferritina pelo AA (seção 4.5.).

Metilglioxal, o produto de reação de oxidação de AA, como referido anteriormente (seção 1.3.) é capaz de formar ligações cruzadas com proteínas e assim provocar sua agregação. Por isso, MG foi estudado quanto à sua capacidade de provocar a agregação de CP.

Figura 22: Agregação de ceruloplasmina provocada por aminoacetona e metilglioxal.

Ceruloplasmina (0,2 mg/mL) foi incubada com AA (25 ou 50 mM) ou MG (25 ou 50 mM) em tampão fosfato 100 mM (pH 7,4; 37°C) por: (*) 4 h ou (**) 1 h. Aliquotas de 5 µg de proteína foram analisadas por eletroforese em gel de acrilamida nativo a 6 %.

A figura 22 mostra que AA é mais efetiva que MG como agente de agregação sobre CP tanto em relação à concentração quanto em relação ao tempo de incubação. A agregação de CP promovida por AA (25 e 50 mM) é acompanhada claramente pelo aparecimento de uma banda de menor mobilidade eletroforética enquanto a ação de MG sobre CP não apresenta esta banda. Porém as bandas eletroforéticas de CP tratada com MG (25 e 50 mM) apresentam uma banda com maior mobilidade eletroforética quando comparado com a proteína nativa, sugerindo uma quebra, ou disrupção de parte da proteína. O tempo de incubação não alterou o efeito. Este efeito observado também reflete uma mudança na estrutura de CP, mas aparentemente de forma distinta da lesão promovida por AA. Deve-se levar em conta que a ação de MG sobre proteínas, quando estudada *in vitro*, ocorre de forma efetiva após 4 dias.²²⁸

O experimento subsequente foi realizado com concentrações menores tanto de MG quanto de AA, porém o tempo de incubação foi maior (Figura 23).

Uma vez que MG provoca modificações na estrutura proteica e que ALA também é uma aminocetona pró-oxidante capaz de provocar danos a proteínas,

estes dois compostos, juntamente com AA foram estudas quanto a sua capacidade de promover agregação e perda da atividade da CP.

Figura 23: Agregação de ceruloplasmina após incubação com aminocetonas e metilglioxal. Ceruloplasmina (0,2 mg/mL) foi incubada em tampão fosfato 100 mM (pH 7,4 a 37°C) com: apenas CP (banda 1); ALA 10 mM (banda 2); AA 10 mM (banda 3); e metilglioxal 10 mM (banda 4) por 8 h e por 48 h (banda 5). Aliquotas de 5 µg de proteína foram analisadas por eletroforese em gel de acrilamida nativo a 6 %. Foram feitas dois tipos de revelação: com coomassie blue (A) e com o-dianisidina (B).

Após incubação por 8 horas com os compostos citados, a estrutura de CP foi modificada aparentemente apenas por AA (Figura 23-A banda 3). Nestas mesmas condições reacionais, MG e ALA não se mostraram bons agentes modificadores da estrutura de CP (Bandas 2 e 4), porém MG, quando incubado com CP por 48 horas, modificou muito o comportamento eletroforético da CP (banda 5). Apesar de promover modificação proteica de CP, MG não promove paralela perda de atividade aminoxidásica (Figura 23-B; bandas 4 e 5) indicando um provável ataque periférico à proteína, sem que os sítios catalíticos da CP sejam modificados. Aminoacetona, como já indicado, modifica tanto estruturalmente (Figura 23-A, banda 3) como funcionalmente CP (Figura 23-B, banda 3). Mas de forma adversa ALA, outra aminocetona pró-oxidante, não foi capaz de promover os mesmos danos após incubação de 8 horas. Após incubação de 48 horas ALA 10 mM provoca pequena agregação proteica (não mostrado), porém

sequestradores de radicais livres (SOD, catalase e etanol) mostraram-se efetivos a proteger CP desta ação lesiva.

A partir dos resultados apresentados e discutidos pode-se concluir que tanto AA quanto MG podem alterar a estrutura proteica de CP porém, dentro do tempo utilizado para realizar os experimentos, apenas AA mostrou-se capaz de provocar a perda das atividades enzimáticas da proteína (Figura 23).

Os dados obtidos são de particular interesse visto que tanto AA quanto CP estão acumuladas em *diabetes mellitus* e, até o presente momento, não há relatos na literatura sobre a modificação de CP no diabetes. Uma vez que a integridade estrutural de CP é exigida para a manutenção da sua atividade ferroxidásica e que CP tem sido apresentada como proteína auxiliadora na incorporação de ferro por ferritina, os danos estruturais provocados em CP por EROs geradas durante oxidação aeróbica de AA podem estar relacionados com a deficiência no metabolismo tanto de cobre quanto de ferro em pacientes diabéticos.

5. Conclusões e considerações finais

Os resultados apresentados no capítulo anterior permite-nos concluir que AA sofre tanto autooxidação quanto oxidação catalisada por metais de transição. Estas reações são propagadas por $O_2^{\bullet-}$, acompanhado da formação de $HO^{\bullet}$ que, por sua vez, pode amplificar ainda mais a reação. Foram identificados como produtos principais de oxidação H_2O_2 , NH_4^+ e MG, um metabólito reconhecidamente cito- e genotóxico.

Foi proposto que a reação de consumo de oxigênio por AA na ausência de metais de transição ocorre através de um mecanismo onde inicialmente ocorre a enolização de AA catalisada por fosfato. Após enolização, AA sofre oxidação unieletrônica formando o radical enoil $AA^{\bullet}$ com consequente redução de oxigênio à $O_2^{\bullet-}$, espécie envolvida na propagação da reação. Nova oxidação unieletrônica ocorre com a formação de AA_{imino} que, após hidrólise, dá origem a MG e NH_4^+ . A dismutação de $O_2^{\bullet-}$ resulta em H_2O_2 , fonte de $HO^{\bullet}$ por reação de Haber-Weiss catalisada por Fe(II) (Esquema 11).

Na presença de íons ferro (tanto de ferritina quanto adicionado diretamente), a oxidação aeróbica de AA segue um mecanismo independente de $O_2^{\bullet-}$: inicialmente ocorre uma complexação $AA-Fe(II)-O_2$ seguida de transferência simultânea de 2 elétrons (um proveniente de AA outro do íon ferro) para o oxigênio com formação direta de H_2O_2 (Esquema 12).

A hipótese envolvendo oxidação de AA por SSAO para explicar a angiopatia associada à diabetes (responsável pela nefropatia, neuropatia e retinopatia) é consistente com a bem conhecida localização desta enzima em membrana plasmática de células vasculares. Contudo, este mecanismo não pode ser aceito como único a produzir MG e H_2O_2 a partir de AA visto que esta não é uma amina primária simples, mas sim uma α -aminocetona facilmente autoxidável e que, além de inibir a SSAO, semicarbazida também é um inibidor de reações propagadas por $O_2^{\bullet-}$. Por outro lado, a função fisiológica de SSAO ainda não foi esclarecida, uma vez que esta enzima possui baixa especificidade (tem como sustratos diversas mono- e poliaminas endógenas e exógenas) e gera como produto principal MG (um promotor de ligações cruzadas altamente citotóxico).

Provavelmente por sua instabilidade frente a oxigênio e à rápida formação de bases de Schiff por MG, ainda não foram determinadas as concentrações fisiológicas e patológicas de AA em plasma e tecidos. A única estimativa da concentração de AA *in vivo* remonta a década de 60,⁹ onde foi encontrado “...aproximadamente 0,4 mg de um composto com propriedades cromatográficas semelhantes às propriedades de AA” em urina de adultos normais (ou 2 μ M se considerarmos a excreção diária de 1,5 L de urina por dia).

Foi demonstrado aqui que a velocidade de consumo de oxigênio por AA é aumentada na presença de ferritina de baço de cavalo com a consequente liberação de ferro desta proteína. Em paralelo, as espécies reativas formadas durante a oxidação aeróbica de AA são capazes de promover em ferritina e apoferritina: (i) modificação no comportamento eletroforético; (ii) oxidação de resíduos de triptofano e cisteína; (iii) perda da atividade ferroxidásica; e (iv) perda da capacidade de incorporação de ferro. O provável mecanismo pelo qual AA promove danos a ferritina e a apoproteína é aqui proposto: AA é convertida a sua forma enólica pela catalise por fosfato presente na cavidade da ferritina. A forma enólica de AA na presença de Fe(III) reage com oxigênio formando ânions $O_2^{\bullet-}$ e o radical enoil de AA. O radical $AA^{\bullet}$ também é capaz de reduzir Fe(III) a Fe(II) e reage novamente com oxigênio para formar MG. Enquanto a oxidação de AA produz a liberação de Fe(II), tanto $AA^{\bullet}$ quanto $O_2^{\bullet-}$ produzem modificações sítio-específicas em resíduos de triptofano e cisteína da proteína (Esquema 13).

Os resultados obtidos em relação a ação de AA sobre ferritina adquire maior relevância pois ferro é apontado como disparador de estresse oxidativo e danos a tecidos tanto em diabéticos humanos quanto em diabetes experimental.^{229,230,231} Por outro lado, o desenvolvimento de *diabetes mellitus*, cirrose e carcinoma hepatocelular é atribuído exclusivamente ao acúmulo de ferro em patologias tais como a hemocromatose hereditária.²³²

Sendo o *diabetes mellitus* um estado em que o estresse oxidativo está aumentado e que há comprovado distúrbio mitocondrial em órgãos de pacientes diabéticos, nossas investigações foram também direcionadas para o

estudo do efeito de EROs geradas por AA sobre a estrutura desta importante organela celular. Os oxi-radicais formados durante a oxidação de AA foram efetivos na promoção de inchamento mitocondrial. Com base no mecanismo de inchamento mitocondrial promovido por ALA, foi demonstrado aqui que AA provoca danos à membrana mitocondrial através da provável indução da abertura de poros de transição nesta organela. Os poros de transição são formados após oxidação de resíduos sulfidril de proteínas constituintes da membrana e consequente agregação proteica. Os efeitos são induzidos pela presença de cálcio e interrompidos por EGTA, Mg(II), ciclosporina A e DTT.

Esquema 13. Liberação de ferro de ferritina por aminoacetona

Aminoacetona mostrou-se efetiva também em provocar agregação proteica em ceruloplasmina, proteína cuja verdadeira função metabólica ainda não se acha completamente esclarecida. Após a agregação proteica, CP perde tanto sua atividade ferroxidásica quanto aminoxidásica, atividades estas que são alvos de estudos direcionados à compreensão de seu papel metabólico.

Finalmente, nossos estudos apontam para um importante papel de AA como fonte não enzimática de MG e EROs. Os produtos de oxidação aeróbica de AA podem provocar danos à estrutura proteica de ferritina e ceruloplasmina, proteínas ligadas à homeostase de ferro e cobre, metais de

transição catalisadores de reações radicalares deletérias e acumulados em diversas patologias. Pelo fato de a AA estar acumulada em *diabetes mellitus*, sua oxidação aeróbica pode ser responsável, em paralelo à oxidação enzimática por SSAO, pelo estresse oxidativo e pelo deficit na função respiratória mitocondrial observada em pacientes diabéticos.

O esquema 14 sumariza os resultados obtidos na presente tese.

Esquema 14. Danos a biomoléculas promovidos por aminoacetona

6. Bibliografia

- [1]. Breg, W.R., Steele, M.W., Miller, O.J., Warburton, D., de Capoa A. e Allderdie, P.W. (1970) The cri du chat syndrome in adolescents and adults: Clinical finding in 13 older patients with partial deletion of the short arm of chromosome nº 5 (5p-). *J. Pediatr.* **77**, 782-791.
- [2]. Reddi, O.S. (1978) Threoninemia - a new metabolic defect. *J. Pediatr.* **93**, 814-815.
- [3]. Shemin, D. e Russel, C.S. (1953) δ -aminolevulinic acid, its role in the biosynthesis of porphyrins and purines. *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 4873-4874.
- [4]. Gibson, K.D., Laver, W.G. e Neuberger, A. (1958) Initial stages in biosynthesis of porphyrins. *Biochem. J.* **70**, 71-81.
- [5]. Elliott, W.H. (1960) Aminoacetone formation by *Staphylococcus aureus*. *Biochem. J.* **74**, 478-485.
- [6]. Elliott, W.H. (1960) The estimation of aminoacetone and δ -aminolevulinic acid. *Biochem. J.* **74**, 90-94.
- [7]. Bird, M.I., Nunn, P.B. e Lord, L.A.J. (1984) Formation of glycine and aminoacetone from L-threonine by rat liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **802**, 229-236.
- [8]. Bird, M.I. e Nunn, P.B. (1983) Metabolic homeostasis of L-threonine in the normally-fed-rat. *Biochem. J.* **214**, 687-694.
- [9]. Urata, G. e Granick, S. (1963) Biosynthesis of α -aminoketones and the metabolism of aminoacetone. *J. Biol. Chem.* **238**, 811-820.
- [10]. Gibson, K.D., Laver, W.G. e Neuberger, A. (1958) Formation of δ -aminolevulinic acid *in vitro* from succinyl-coenzyme A and glycine. *Biochem. J.* **68**, 17-27.
- [11]. Fubara, B., Eckenrode, F. e Tressel, T. (1986) Purification and properties of aminoacetone synthetase from beef-liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **261**, 2189-2196.
- [12]. Boylan, S.A. e Dekker, E.E. (1981) L-threonine dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **256**, 1809-1815.
- [13]. Tressel, T., Thompson, R., Zieske, L.R., Menendez, M.I.T.S. e Davis, L. (1986) Interaction between L-threonine dehydrogenase and aminoacetone synthetase and mechanism of aminoacetone production. *J. Biol. Chem.* **261**, 16428-16437.
- [14]. Davis, A.J. e Austic, R.E. (1997) Dietary protein and amino-acid levels alter threonine dehydrogenase activity in hepatic mitochondria of *Gallus domesticus*. *J. Nutr.* **127**, 738-744.
- [15]. Jagt, D.L.V., Hassebrook, R.K., Hunsaker, L.A., Brown, W.M., and Royer, R.E. (2001) Metabolism of the 2-oxoaldehyde methylglyoxal by aldose reductase and by glyoxalase-I: roles for glutathione in both enzymes and implications for diabetics complications. *Chem. Biol. Interact.* **130-132**, 549-562.
- [16]. Elliott, W.H. (1960) Methylglyoxal formation from aminoacetone by ox plasma. *Nature* **185**, 467-468.
- [17]. Ray, S. e Ray, M. (1983) Formation of methylglyoxal from aminoacetone by amine oxidase from goat plasma. *J. Biol. Chem.* **258**, 3461-3462.

-
- [18]. Ray, S. e Ray, M. (1987) Aminoacetone oxidase from goat liver. *J. Biol. Chem.* **262**, 5974-5977.
- [19]. Lyles, G.A. (1996) Mammalian plasma and tissue-bound semicarbazide-sensitive amine oxidase: biochemical, pharmacological and toxicological aspects. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **28**, 259-274.
- [20]. Lyles, G.A. (1994) Properties of mammalian tissue-bound semicarbazide-sensitive amine oxidase: possible clues to its physiological function? *J. Neural Transm.* **41**, 387-396.
- [21]. Boor, P.J., Trent, M.B., Lyles, G.A., Tao, M. e Ansari, G.A.S. (1992) Methylamine metabolism to formaldehyde by vascular semicarbazide-sensitive amine oxidase. *Toxicology* **73**, 251-258.
- [22]. Boomsma, F., Van den Meiracker, A.H., Winkel, S., Aanstoot, H.J., Batstra, M.R., Veld, A.J.M. e Bruining, G.J. (1999) Circulating semicarbazide-sensitive amine oxidase is raised both in tipe I (insulin-dependent), in tipe II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and even in childhood type I diabetes at first clinical diagnosis. *Diabetologia* **42**, 233-237.
- [23]. Boomsma, F., Van Veldhuisen, D.J., Kam, P.J., in't Veld, A.J.M., Mosterd, A., Lie, K.I. e Schalekamp, M.A.D.H. (1997) Plasma semicarbazide-sensitive amine oxidase is elevated in patients with congestive heart failure. *Cardiovasc. Res.* **33**, 387-391.
- [24]. Lewinsohn, R. (1984) Mammalian monoamine-oxidizing enzymes, with special reference to benzylamine oxidase in human tissues. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **17**, 223-256.
- [25]. Yu, P.H. e Zuo, D.M. (1997) Aminoguanidine inhibits semicarbazide-sensitive amine oxidase activity: implications for advanced glycation and diabetic complications. *Diabetologia* **40**, 1243-1250.
- [26]. Lyles, G.A. e Mcdougall, S.A. (1989) The enhanced daily excretion of urinary methylamina in rats treated with semicarbazide or hydralazine may be related to the inhibition of semicarbazide-sensitive amine oxidase activities. *J. Pharm. Pharmacol.* **41**, 97-100.
- [27]. Lewinsohn, R. (1981) Amine oxidase in human blood vessels and non-vascular smooth muscle. *J. Pharm. Pharmacol.* **33**, 569-575.
- [28]. McLellan, A.C., Phillips, S.A. e Thornalley, P.J. (1992) The assay of methylglyoxal in biological systems by derivatization with 1,2-diamino-4,5-dimethoxy-benzene. *Anal. Biochem.* **206**, 17-23.
- [29]. Dijk, J.V. e Boomsma, F. (1998) Stability of semicarbazide-sensitive amine oxidase in human blood and plasma. *Clin. Chim. Acta* **270**, 189-194.
- [30]. Chalmers, J. e Lyles, G.A. (1995) Aminoacetone metabolism by semicarbazide-sensitive amine oxidase in rat aorta. *Biochem. Pharmacol.* **49**, 416-419.
- [31]. Hysmith, R.M. e Boor, P.J. (1988) Role of benzylamine oxidase in the cytotoxicity of allylamine toward aortic smooth muscle cells. *Toxicology* **51**, 133-145.

-
- [32]. Yu, P.H. (1998) Deamination of methylamine and angiopathy: toxicity of formaldehyde, oxidative stress and relevance to protein glycooxidation in diabetes. *J. Neural Transm.* **52**, 201-216.
- [33]. Barker, R., Boden, N., Cayley, G., Charlton, S.C., Henson, R., Holmes, M.C., Kelly, I.D. e Knowles, P.F. (1979) Properties of cupric ions in benzylamine oxidase from pig plasma as studied by magnetic-resonance and kinetic methods. *Biochem. J.* **177**, 289-302.
- [34]. Turini, P., Sabatini, S., Befani, O., Chimenti, F., Casanova, C., Riccio, P.L. e Mondovi, B. (1982) Purification of bovine plasma amine oxidase. *Anal. Biochem.* **125**, 294-298.
- [35]. Yu, P.H., Zuo, D. e Davis, B.A. (1994) Characterization of human serum and umbilical artery semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO). *Biochem. Pharmacol.* **47**, 1055-1059.
- [36]. Kalapos, M.P. (1999) Methylglyoxal in living organisms. Chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. *Toxicol. Lett.* **110**, 145-175.
- [37]. Baynes, J.W. (1991) Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* **40**, 405-412.
- [38]. Thornalley, P.J. (1996) Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification – a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *Gen. Pharmac.* **27**, 565-573.
- [39]. Kalapos, M.P. (1994) Methylglyoxal toxicity in mammals. *Toxicol. Lett.* **73**, 3-24.
- [40]. Kalapos, M.P. (1992) Mechanisms leading to complications in diabetes mellitus: pathological role of α -oxoaldehydes. *Biochem. Educ.* **20**, 27-29.
- [41]. Dakin, H.D. e Dudley, H.W. (1913) A contribution to a theory concerning the intermediary metabolism of carbohydrates and proteins. The mutual interconversion of α -amino acids, α -hydroxy acids and α -ketotic aldehydes. *J. Biol. Chem.* **14**, 555-561.
- [42]. Neuberg, C. (1914) Further investigations concerning the biochemical transformation of methylglyoxal into lactic acid, with remarks on the origin of the different lactic acids in nature. *Biochem. Z.* **51**, 484-508.
- [43]. Szent-Györgyi, A. (1967) On retine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **57**, 1642-1643.
- [44]. Kalapos, M.P. (1999) On the promine/retine theory of cell division: now and then. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**, 1-16.
- [45]. Thornalley, P.J. (1990) The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem. J.* **269**, 1-11.
- [46]. Atkins, T.W. e Thornalley, P.J. (1989) Erythrocyte glyoxalase activity in genetically obese (ob/ob) and streptozotocin diabetic mice. *Diabetes Res.* **11**, 125-129.
- [47]. Kalapos, M.P., Littauer, A. e de Groot, H. (1993) Has reactive oxygen a role in methylglyoxal toxicity? A study on cultured rat hepatocytes. *Arch. Toxicol.* **67**, 369-372.
- [48]. Haik, G.M., Lo, T.W.C. e Thornalley, P.J. (1994) Methylglyoxal concentration and glyoxalase activities in the human lens. *Exp. Eye Res.* **59**, 497-500.

- [49]. Shipanova, I.N., Glomb, M.A. e Nagaraj, R.H. (1997) Protein modification by methylglyoxal: chemical nature and synthetic mechanism of a major fluorescent adduct. *Arch. Biochem. Biophys.* **344**, 29-36.
- [50]. Ankrah, N. e Appiah-Opong, R. (1999) Toxicity of low levels of methylglyoxal: depletion of blood glutathione and adverse effect on glucose tolerance in mice. *Toxicol. Lett.* **109**, 61-67.
- [51]. Pabst, M.J., Habig, W.H. e Jakoby, W.B. (1974) Glutathione S-transferase A. A novel kinetic mechanism in which the major reaction pathway depends on substrate concentration. *J. Biol. Chem.* **249**, 7140-7147.
- [52]. Cook, L.J., Davies, J., Yates, A.P., Elliott, A.C., Lovell, J., Joule, J.A., Pemberton, P., Thornalley, P.J. e Best, L. (1998) Effects of methylglyoxal on rat pancreatic β -cells. *Biochem. Pharmacol.* **55**, 1361-1367.
- [53]. Ammon, H.P.T. e Mark, M. (1985) Thiols and pancreatic β -cell function. *Cell Biochem. Funct.* **3**, 157-171.
- [54]. Murata-Kamiya, N., Kamiya, H., Kaji, H. e Kasai, H. (2000) Methylglyoxal induces G:C to C:G and G:C to T:A transversions in the *supF* gene on a shuttle vector plasmid replicated in mammalian cells. *Mutat. Res.* **468**, 173-182.
- [55]. Ayoub, F.M., Allen, R.E. e Thornalley, P.J. (1993) Inhibition of proliferation of human leukaemia 60 cells by methylglyoxal in vitro. *Leuk. Res.* **17**, 397-401.
- [56]. Biswas, S., Ray, M., Misra, S., Dutta, D.P. e Ray, S. (1997) Selective inhibition of mitochondrial respiration in leukaemic leucocytes by methylglyoxal. *Biochem. J.* **323**, 343-348.
- [57]. Ray, S., Dutta, S., Halder, J. e Ray, M. (1994) Inhibition of electron flow through complex I of the mitochondrial respiratory chain of Ehrlich ascites carcinoma cells by methylglyoxal. *Biochem. J.* **303**, 69-72.
- [58]. Jerzykowski, T., Matuszewski, W., Tarnawski, R., Winter, R., Herman, Z.S. e Sokola, A. (1975) Changes of certain pharmacological and biochemical indices in acute methylglyoxal poisoning. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **23**, 549-560.
- [59]. Monnier, V.M. (1989) Toward a Maillard theory of ageing. In: *The Maillard Reaction in aging, diabetes and nutrition* (Baynes, J.W. e Monnier, V.M., Eds.) pp. 1-22, Alan R. Liss Inc., New York.
- [60]. Westwood, M.E. e Thornalley, P.J. (1995) Molecular characteristics of methylglyoxal-modified bovine and human serum albumins. Comparison with glucose-derived advanced glycation endproduct-modified serum albumins. *J. Protein. Chem.* **14**, 359-372.
- [61]. Westwood, M.E. e Thornalley, P.J. (1995) Cytokine synthesis and secretion induced by methylglyoxal-modified proteins. *Diabet. Med.* **12** (suppl. 2-10), 549.
- [62]. Westwood, M.E., Argirov, O.K., Abordo, E.A. e Thornalley, P.J. (1997) Methylglyoxal-modified arginine residues – a signal for receptor-mediated endocytosis and degradation of proteins by monocytic THP-1 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1356**, 84-94.

- [63]. Lee, C., Yim, M.B., Chock, P.B., Yim, H. e Kang, S. (1998) Oxidation-reduction properties of methylglyoxal-modified protein in relation to free radical generation. *J. Biol. Chem.* **39**, 25272-25278.
- [64]. Lo, T.W.C., Selwood, T. e Thornalley, P.J. (1994) The reaction of methylglyoxal with aminoguanidina under physiological conditions and prevention of methylglyoxal binding to plasma proteins. *Biochem. Pharmacol.* **48**, 1865-1870.
- [65]. Thornalley, P.J., Yurek-George, A. e Arginov, O.K. (2000) Kinetics and mechanism of the reaction of aminoguanidine with the α -oxoaldehydes glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone under physiological conditions. *Biochem. Pharmacol.* **60**, 55-65.
- [66]. Hammes, H.P., Stradter, D., Weiss, A., Bretzel, R.G., Federlin, K. e Brownle, M. (1995) Secondary intervention with aminoguanidine retards the progression of diabetic retinopathy in the rat model. *Diabetologia* **38**, 656-660.
- [67]. Cameron, N.E., Cotter, M.A., Dines, K. e Love, A. (1992) Effects of aminoguanidine on peripheral nerve function and polyol pathway metabolites in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* **35**, 946-950.
- [68]. Sugimoto, K. e Yagihashi, S. (1997) Effects of aminoguanidine on structural alterations of microvessels in peripheral nerve of streptozotocin diabetic rats. *Microvasc. Res.* **53**, 105-112.
- [69]. Soulis-Liparota, T., Cooper, M., Papazoglou, D., Clarke, B. e Jerums, G. (1991) Retardation by aminoguanidine of development of albuminuria, mesangial expansion, and tissue fluorescence in streptozotocin-induced diabetic rat. *Diabetes* **40**, 1328-1334.
- [70]. Allen, R.E., Lo, T.W. e Thornalley, P.J. (1993) A simplified method for the purification of human red blood cell glyoxalase I. Characteristics, immunoblotting, and inhibitor studies. *J. Protein. Chem.* **12**, 111-119.
- [71]. Murray, R.K. (1994) Porfirias e pigmentos biliares. In: *Harper: Bioquímica*, 7ª Ed. (Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A. e Rodwell, V.W. Eds.) pp. 337-345. Atheneu Editora São Paulo, São Paulo.
- [72]. Chilson Jr., J.J. (1971) Lead poisoning. *Sci. Am.* (Washington) **224**, 15-30.
- [73]. Lithner, F. e Wetterberg, L. (1984) Hepatocellular carcinoma in patients with acute intermittent porphyria. *Acta Med. Scand.* **215**, 271-274.
- [74]. Anderson, K.E. (1993) Doenças das porfirinas ou metais. In: *Cecil Tratado de Medicina Interna*, 19ª Ed. (Wyngaarden, J.B., Smith, L.H. e Bennett, J.C. Eds.) vol. 1, pp. 1146-1151. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro.
- [75]. Bechara, E.J.H., Medeiros, M.H.G., Catalani, L.H., Soares, C.H.L., Monteiro, H.P., Abdalla, D.S.P., Cristoff, M., Hermes-Lima, M., Pereira, B., Demasi, M., Nantes, I.L., Costa, C.A., Rocha, M.E.M., Di Mascio, P., Wendel, C.M.A., Onuki, J., Penatti, C.A.A. e Pinto, A.P. (1993) Enolizable carbonyl and imino metabolites may act as endogenous sources of reactive oxygen species. *Ci. Cult.* **47**, 436-357.
- [76]. Bechara, E.J.H., Medeiros, M.H.G., Monteiro, H.P., Hermes-Lima, M., Pereira, B., Demasi, M., Costa, C.A., Abdalla, D.S.P., Onuki, J., Wendel, C.M.A. e Di Mascio, P.

- (1993) A free radical hypothesis of lead poisoning and inborn porphyrias associated with 5-aminolevulinic acid overload. *Quim. Nova* **16**, 385-392.
- [77]. Costa, C.A., Trivelato, G.C., Pinto, A.M.P. e Bechara, E.J.H. (1997) Correlation between plasma 5-aminolevulinic acid concentrations and indicators of oxidative stress in lead-exposed workers. *Clin. Chem.* **43**, 1196-1202.
- [78]. Costa, C.A., Trivelato, G.C., Demasi, M. e Bechara, E.J.H. (1997) Determination of 5-aminolevulinic acid in blood plasma, tissues and cell cultures by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromat. B* **695**, 245-250.
- [79]. Penatti, C.A.A., Bechara, E.J.H. e Demasi, M. (1996) δ -aminolevulinic acid-induced synaptosomal Ca^{2+} uptake and mitochondrial permeabilization. *Arch. Biochem. Biophys.* **335**, 53-60.
- [80]. Fraga, C.G., Onuki, J., Lucesoli, F., Bechara, E.J.H. e Di Mascio, P. (1994) 5-aminolevulinic acid mediates the in vivo and in vitro formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. *Carcinogenesis* **15**, 2241-2244.
- [81]. Timmins, G.S., Liu, K.J., Bechara, E.J.H., Kotake, Y. e Swartz, H.M. (1999) Trapping of free radicals with direct in vivo EPR detection: comparison of 5,5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide and 5-diethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline-*N*-oxide as spin traps for $\cdot\text{OH}$ and $\text{SO}_4^{\cdot-}$. *Free Radic. Biol. Med.* **27**, 329-333.
- [82]. Onuki, J., Medeiros, M.H.G., Bechara, E.J.H. e Di Mascio, P. (1994) 5-Aminolevulinic acid induces single-strand breaks in plasmid pBR322 DNA in the presence of Fe^{2+} ions. *Biochim. Biophys. Acta* **1225**, 259-263.
- [83]. Carvalho, H., Bechara, E.J.H., Meneghini, R. e Demasi, M. (1997) Haem precursor delta-Aminolevulinic acid induces activation of the cytosolic iron regulatory protein 1. *Biochem. J.* **328**, 827-832.
- [84]. Hermes-Lima, M., Castilho, R.F., Valle, V.G.R., Bechara, E.J.H. e Vercesi, A.E. (1992) Calcium-dependent mitochondrial oxidative damage promoted by 5-aminolevulinic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **1180**, 201-206.
- [85]. Oteiza, P. e Bechara, E.J.H. (1993) 5-aminolevulinic acid induces lipid peroxidation in cardiolipin-rich liposomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **305**, 282-287.
- [86]. Demasi, M., Costa, C.A., Pascual, C., Llesuy, S. e Bechara, E.J.H. (1997) Oxidative damage response promoted by 5-aminolevulinic acid promptly induces the increase of plasma antioxidant capacity. *Free Rad. Res.* **26**, 235-243.
- [87]. Rocha, M.E.M., Bandy, B., Costa, C.A., Barros, M.P., Pinto, A.M.P. e Bechara, E.J.H. (2000) Iron mobilization by succinylacetone methyl ester in rats. A model study for hereditary tyrosinemia and porphyries characterized by 5-aminolevulinic acid overload. *Free Rad. Res.* **32**, 343-353.
- [88]. Douki, T., Onuki, J., Medeiros, M.H.G., Bechara, E.J.H., Cadet, J. e Di Mascio, P. (1998) DNA alkylation by 4,5-dioxovaleric acid, the final oxidation product of 5-aminolevulinic acid. *Chem Res. Toxicol.* **11**, 150-157.

-
-
- [89]. Rocha, M.E.M., Ferreira, A.M.D.C. e Bechara, E.J.H. (2000) Roles of phosphate and an enoyl radical in ferritin iron mobilization by 5-aminolevulinic acid. *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 1272-1279.
 - [90]. Hirahu, Y., Sugimoto, J., Yamaguchie, T. e Kawanishi, S. (1999) Oxidative DNA damage induced by aminoacetone, an amino acid metabolite. *Arch. Biochem. Biophys.* **365**, 62-70.
 - [91]. Harrison, P.M. e Arosio, P. (1996) The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim. Biophys. Acta* **1275**, 161-203.
 - [92]. Neilands, J.B. (1983) Siderophores. *Adv. Inorg. Biochem.* **5**, 137-166.
 - [93]. Konijn, A., Glickstein, H., Vaisman, B., Meyron-Holtz, E.G., Slotki, I.N. e Cabantchik, Z.I. (1999) The cellular labile iron pool and intracellular ferritin in K562 cells. *Blood* **94**, 2128-2134.
 - [94]. Kakhlon, O. e Cabantchik, Z.I. (2002) The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes. *Free Radic. Biol. Med.* **33**, 1037-1046.
 - [95]. Espósito, B.P., Epsztejn, S., Breuer, W. e Cabantchik, Z.I. (2002) A review of fluorescence methods for assessing labile iron in cells and biological fluids. *Anal. Biochem.* **304**, 1-18.
 - [96]. Halliwell, B. e Gutteridge, J.M.C. (1984) Oxygen-toxicity, oxygen radicals, transition-metals and disease. *Biochem. J.* **219**, 1-14.
 - [97]. Rogier, E., Feldmann, G. e Weiss, M.C. (1983) Localization, using immunoperoxidase, of 3 plasma-proteins (Albumin, Fibrinogen and Transferrin) in cells in culture providing a hepatoma in the rat. *Biol. Cell* **49**, A17.
 - [98]. Bothwell, T.H., Charlton, R.W., Cook, J.D. e Finch, C.A. (1979) In: *Iron Metabolism in Man*. Blackwell, Oxford, UK.
 - [99]. Skikne, B.S., Whittaker, P., Cooke, A. e Cook, J.D. (1995) Ferritin excretion and iron balance in humans. *Br. J. Haematol.* **90**, 681-687.
 - [100]. Craven, C.M., Alexander, J., Eldridge, M., Kusher, J.P., Bernstein, S. e Kaplan, J. (1987) Tissue distribution and clearance kinetics of non-transferrin bound iron in the hypotransferrinemic mouse – a rodent model for hemochromatosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **4**, 3457-3461.
 - [101]. Santambrogio, P., Levi, S., Cozzi, A., Corsi, B. e Arosio, P. (1996) Evidence that the specificity of iron incorporation into homopolymers of human ferritin L- and H-chains is conferred by the nucleation and ferroxidase centers. *Biochem. J.* **314**, 139-144.
 - [102]. Theil, E.C. (1987) Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 289-315.
 - [103]. Fracanzani, A.L., Fargion, S., Romano, R., Piperno, A., Arosio, P., Ruggeri, G., Ronchi, G. e Fiorelli, G. (1989) Immunohistochemical evidence for a lack of ferritin in duodenal absorptive epithelial-cells in idiopathic-hemochromatosis. *Gastroenterology* **96**, 1071-1078.

-
- [104]. Ford, G.C., Harrison, P.M., Rice, D.W., Smith, J.M.A., Treffry, A., White, J.L. e Yariv, J. (1984) Ferritin-design and formation of an iron-storage molecule. *Phil. Trans. R. Soc. B - Biological Science* **304**, 551-565.
- [105]. Harrison, P.M., Andrews, S.C., Artymiuk, P.J., Ford, G.C., Guest, J.R., Hirzmann, J., Lawson, D.M., Livingstone, J.C., Smith, J.M.A., Treffry, A. e Yewdall, S.J. (1991) Probing structure-function relations in ferritin and bacterioferritin. *Adv. Inorg. Chem.* **36**, 449-486.
- [106]. Arosio, P., Adelman, T.G. e Drysdale, J.W. (1978) Ferritin heterogeneity - further evidence for heteropolymers. *J. Biol. Chem.* **253**, 4451-4458.
- [107]. Levi, S., Salfeld, J., Franceschinelli, F., Cozzi, A., Dörner, M.H. e Arosio, P. (1989) Expression and structural and functional properties of human ferritin L-chain from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **28**, 5179-5184.
- [108]. Towe, K.M. (1981) Structural distinction between ferritin and iron-dextran - an electron-diffraction comparison. *J. Biol. Chem.* **256**, 9377-9378.
- [109]. Rohrer, J.S., Islam, Q.T., Watt, G.D., Sayers, D.E. e Theil, E.C. (1990) Ferritin and superoxide-dependent lipid-peroxidation. *Biochemistry* **29**, 259-264.
- [110]. Islam, Q.T., Sayers, D.E., Goran, S.M. e Theil, E.C. (1989) A comparison of an undecairon(III) complex with the ferritin iron core. *J. Inorg. Biochem.* **36**, 51-62.
- [111]. Mackle, P., Garner, C.D., Ward, R.J. e Peters, T.L. (1991) Iron K-edge absorption spectroscopic investigations of the cores of ferritin and haemosiderins. *Biochim. Biophys. Acta* **1115**, 145-150.
- [112]. Bauminger, E.R., Treffry, A., Hudson, A.J., Hechel, D., Hodson, N.W., Andrews, S.C., Levi, S., Nowik, I., Arosio, P., Guest, J.R. e Harrison, P.M. (1994) Iron incorporation into ferritins - Evidence for the transfer of monomeric Fe(III) between ferritin molecules and for the formation of an unusual mineral in the ferritin of *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **302**, 813-820.
- [113]. Treffry, A. e Harrison, P.M. (1978) Incorporation and release of inorganic phosphate in horse spleen ferritin. *Biochem. J.* **171**, 313-320.
- [114]. Silva, D., Guo, J. e Aust, S.D. (1993) Relationship between iron and phosphate in mammalian ferritins. *Arch. Biochem. Biophys.* **303**, 451-455.
- [115]. Johnson, J.L., Cannon, M., Watt, R.K., Frankel, R.B. e Watt, G.D. (1999) Forming the phosphate layer in reconstituted horse spleen ferritin and the role of phosphate in promoting core surface redox reactions. *Biochemistry* **38**, 6706-6713.
- [116]. Treffry, A., Bauminger, E.R., Hechel, D., Hodson, N.W., Nowik, I., Yendall, S.J. e Harrison, P.M. (1993) Defining the roles of the threefold channels in iron uptake, iron oxidation and iron-core formation in ferritin - A study aided by site-directed mutagenesis. *Biochem. J.* **296**, 721-728.
- [117]. Bauminger, E.R., Harrison, P.M., Hechel, D., Nowik, I. e Treffry, A. (1991) Mossbauer spectroscopic investigation of structure-function relations in ferritins. *Biochim. Biophys. Acta* **1118**, 48-58.

- [118]. Orino, K., Lehman, L., Tsuji, Y., Ayaki, H., Torti, S.V. e Torti, F.M. (2001) Ferritin and the response to oxidative stress. *Biochem. J.* **357**, 241-247.
- [119]. Santambrogio, P., Levi, S., Cozzi, A., Rovida, E., Albertini, A. e Arosio, P. (1993) Production and characterization of recombinant heteropolymers of human ferritin H and L chains. *J. Biol. Chem.* **268**, 12744-12748.
- [120]. Bolann, B.J. e Ulvik, R.J. (1987) Release of iron from ferritin by xanthine-oxidase – Role of the superoxide radical. *Biochem. J.* **243**, 55-59.
- [121]. Thomas, C.D., Morehouse, L.A. e Aust, S.D. (1985) Ferritin and superoxide-dependent lipid-peroxidation. *J. Biol. Chem.* **260**, 3275-3280.
- [122]. Sirivech, S., Frieden, E. e Osaki, S. (1974) Release of iron from horse spleen ferritin by reduced flavins. *Biochem. J.* **143**, 311-315.
- [123]. Funk, F., Lenders, J.P., Crichton, R.R. e Schneider, W. (1985) Reductive mobilization of ferritin iron. *Eur. J. Biochem.* **152**, 167-172.
- [124]. Monteiro, H.P. e Winterbourn, C.C. (1988) The superoxide-dependent transfer of iron from ferritin to transferrin and lactoferrin. *Biochem. J.* **256**, 923-928.
- [125]. Topham, R., Goger, M., Pearce, K. e Schultz, P. (1989) The mobilization of ferritin iron liver cytosol – A comparison of xanthine and NADH as reducing substrates. *Biochem. J.* **261**, 137-143.
- [126]. Rocha, M.E., Dutra, F., Bandy, B., Baldini, R.L., Gomes, S.L., Faljoni-Alario, A., Liria, C.W., Miranda M.T. e Bechara, E.J. (2003) Oxidative damage to ferritin by 5-aminolevulinic acid. *Arch. Biochem. Biophys.* **409**, 349-356.
- [127]. Lee, M.H. e Means, R.T. Jr. (1995) Extremely elevated serum ferritin levels in a university hospital: associated diseases and clinical significance. *Am. J. Med.* **98**, 566-571.
- [128]. Abdalla, D.S.P., Campa, A. e Monteiro, H.P. (1992) Low density lipoprotein oxidation by stimulated neutrophils and ferritin. *Atherosclerosis* **97**, 149-159.
- [129]. Abdalla, D.S.P., Costa-Rosa, L.F.B.P., Monteiro, H.P., Campa, A. e Curi, R. (1994) Human macrophage metabolism of low density lipoprotein oxidized by stimulated neutrophils and ferritin. *Atherosclerosis* **107**, 157-163.
- [130]. Linder, M.C. (1991) Nutrition and metabolism of the trace elements. In: *Nutritional Biochemistry and Metabolism* (Linder, M.C., Ed.) pp. 120-154, Elsevier, Amsterdam.
- [131]. Ferns, G.A.A., Lamb, D.J. e Taylor, A. (1997) The possible role of copper ions in atherogenesis: the blue Janus. *Atherosclerosis* **133**, 139-152.
- [132]. Van Campen, D.R. e Scaife, P.U. (1967) Zinc interference with copper absorption in rats. *J. Nutr.* **91**, 473-476.
- [133]. Hartz, J.W., Funakoshi, S. e Deutsch, H.F. (1973) The levels of superoxide dismutase and catalase in human tissues as determined immunochemically. *Clin. Chim. Acta* **46**, 125-131.
- [134]. Owen, L.A. (1981) The response of serum ceruloplasmin to injection of walker 256 tumor-cells or turpentine in rats. *Biol. Trace Elem. Res.* **3**, 217-224.

-
- [135]. Fox, P.L., Mazunder, B., Ehrenwald, E. e Mukhopadhyay, C.K. (2000) Ceruloplasmin and cardiovascular disease. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 1735-1744.
 - [136]. Lindley, P., Zaitseva, I., Zaitsev, V., Ralph, A. e Card, G. (1997) The structure of human ceruloplasmin at 3.0 Å resolution: a putative role of the protein as a ferroxidase in the plasma. *J. Inorg. Biochem.* **67**, 40.
 - [137]. Stevens, M.D., DiSilvestro, R.A. e Harris, E.D. (1984) Specific receptor for ceruloplasmin in membrane-fragments from aortic and heart tissues. *Biochemistry* **23**, 261-266.
 - [138]. Huber, C.T. e Frieden, E. (1970) Substrate activation and the kinetics of ferroxidase. *J. Biol. Chem.* **245**, 3973-3978.
 - [139]. Frieden, E. (1979) Ceruloplasmin: The serum copper transport protein with oxidase activity. In: *Copper in the Environment, Part II* (Nriagu, J.O., Ed.) pp 241-284, John Wiley, New York.
 - [140]. Akaike, T. (2000) Mechanism of biological S-nitrosation and its measurement. *Free Rad. Res.* **33**, 461-469
 - [141]. Gutteridge, J.M.C. (1983) Antioxidant properties of ceruloplasmin towards iron-dependent and copper-dependent oxygen radical formation. *FEBS Lett.* **157**, 37-40.
 - [142]. Scheinberg, I.H. e Gitlin, D. (1952) Deficiency of ceruloplasmin in patients with hepatolenticular degeneration (Wilson's disease). *Science* **116**, 484-485.
 - [143]. Floris, G., Medda, R., Padiglia, A. e Musci, G. (2000) The physiopathological significance of ceruloplasmin. *Biochem. Pharmacol.* **60**, 1735-1741.
 - [144]. Wooten, L., Shulze, R.A., Lancey, R.W., Lietzow, M. e Linder M.C. (1996) Ceruloplasmin is found in milk and amniotic fluid and may have a nutritional role. *J. Nutr. Biochem.* **7**, 632-639.
 - [145]. Boyer, R.F. e Schori, B.E. (1983) The incorporation of iron into apoferritin as mediated by ceruloplasmin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **116**, 244-250.
 - [146]. Inoue, K., Akaike, T., Okamoto, T., Sawa, T., Otargiri, M., Suzuki, S., Yishimura, T. e Maeda, H. (1999) Nitrosothiol formation catalyzed by ceruloplasmin. Implication for cytoprotection mechanism *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **274**, 27069-27075.
 - [147]. Medda, R., Calabrese, L., Musci, G., Padiglia, A. e Floris, G. (1996) Effect of ceruloplasmin on 6-hidroxydopamine oxidation. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **38**, 721-728.
 - [148]. Bustamante, J., Martin Mateo, M.C., Fernandez, J., de Quiros, B. e Ortiz Machado, O. (1976) Zinc, copper and ceruloplasmin in arteriosclerosis. *Biomedicine* **25**, 244-245.
 - [149]. Powell, J.T., Muller, B.R. e Greenhalgh, R.M. (1987) Acute phase proteins in patients with abdominal aortic aneurysms. *J. Cardiovasc. Surg.* **28**, 528-530.
 - [150]. Belch, J.J., Chopra, M., Hutchison, S., Lorimer, R., Sturrock, R.D., Forbes, C.D. e Smith, W.E. (1989) Free radical pathology in chronic arterial disease. *Free Radic. Biol. Med.* **6**, 375-378.
 - [151]. Daimon, M., Sugiyama, K., Saitoh, T., Yamaguchi, H., Hirata, A., Ohnuma, H., Igarashi, M., Eguchi, H., Manaka, H., Hama, K., Kimura, M. e Kato T. (2000) Increase

- in serum ceruloplasmin levels is correlated with a decrease of serum nitric oxide levels in type 2 diabetes. *Diabetes Care* **23**, 559-560.
- [152]. Kaplan, J. e O'Halloran, T.V. (1996) Iron metabolism in eukaryotes: Mars and Venus at it again. *Science* **271**, 1510-1512.
- [153]. DeSilva, D.M. e Aust, S.D. (1993) Ferritin and ceruloplasmin in oxidative damage: review and recent findings. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **71**, 715-720.
- [154]. Reilly, C.A. e Aust, S.D. (1993) Stimulation of the ferroxidase activity of ceruloplasmin during iron loading into ferritin. *Arch. Biochem. Biophys.* **347**, 242-248.
- [155]. Juan, S.H., Guo, J.H. e Aust, S.D. (1997) Loading of iron into recombinant rat liver ferritin heteropolymers by ceruloplasmin. *Arch. Biochem. Biophys.* **341**, 280-286.
- [156]. Guo, J.H., Abedi, M. e Aust, S.D. (1996) Expression and loading of recombinant heavy and light chain homopolymers of rat liver ferritin. *Arch. Biochem. Biophys.* **335**, 197-204.
- [157]. Van Eden, M.E. e Aust, S.D. (2000) Intact human ceruloplasmin is required for the incorporation of iron into human ferritin. *Arch. Biochem. Biophys.* **381**, 119-126.
- [158]. Juan, S.H. e Aust, S.D. (1998) Studies on the interaction between ferritin and ceruloplasmin. *Arch. Biochem. Biophys.* **355**, 56-62.
- [159]. Reilly, C.A., Sorlie, M. e Aust, S.D. (1998) Evidence for a protein-protein complex during iron loading into ferritin by ceruloplasmin. *Arch. Biochem. Biophys.* **354**, 165-171.
- [160]. Welch, K.D., Van Eden, M.E. e Aust, S.D. (2001) Modification of ferritin during iron loading. *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 999-1006.
- [161]. Puchkova, L.V., Denezhkina, V.V., Zakharova, E.T., Gaitskhoki, V.S. e Neifakh, S.A. (1990) Biosynthesis of ceruloplasmin in various rat organs. *Biokhimiya* **55**, 2095-2102.
- [162]. Ryan, T.P., Grover, T.A. e Aust, S.D. (1992) Rat ceruloplasmin: resistance to proteolysis and kinetic comparison with human ceruloplasmin. *Arch. Biochem. Biophys.* **293**, 1-8.
- [163]. Harris, Z.L., Morita, H. e Gitlin, J.D. (1997) The biology of human ceruloplasmin. In: *Multi-copper Oxidases* (Messerschmidt, A., Ed.), pp. 264-306. World Scientific Pub. Co., Singapore.
- [164]. Mollgard, K., Dziegielewska, K.M., Saunders, N.R., Zakut, H. e Soreq, H. (1988) Synthesis and localization of plasma proteins in the developing human brain. Integrity of the fetal blood-brain barrier to endogenous proteins of hepatic origin. *Dev. Biol.* **128**, 207-221.
- [165]. Yang, F.M., Friedrichs, W.E., Cupples, R.L., Bonifacio, M.J., Sanford, J.A., Horton, W.A. e Bowman, B.H. (1990) Human ceruloplasmin. Tissue-specific expression of transcripts produced by alternative splicing. *J. Biol. Chem.* **265**, 10780-10785.
- [166]. Patel, B.N. e David, S. (1997) A novel glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin is expressed by mammalian astrocytes. *J. Biol. Chem.* **272**, 20185-20190.

- [167]. Armarego, W.L.F. e Perrin, D.D. (1998) In: *Purification of laboratory chemicals*, 4th Ed. Butterworth Hernemann, London.
- [168]. Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- [169]. Hepworth, J.D. (1976) Aminoacetone semicarbazone hydrochloride. *Org. Synth.* **45**, 1-3.
- [170]. McLellan, A.C. e Thornalley, P.J. (1992) Synthesis and chromatography of 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzene, 6,7-dimethoxy-2-methylquinoxaline and 6,7-dimethoxy-2,3-dimethylquinoxalina for use in a liquid chromatographic fluorimetric assay of methylglyoxal. *Anal. Chim. Acta* **263**, 137-142.
- [171]. Yu, P.H. e Deng, Y. (1999) Assessment of the deamination of aminoacetone, an endogenous substrate for semicarbazide-sensitive amine oxidase. *Anal. Biochem.* **270**, 97-102.
- [172]. Augusto, O. e Cilento G. (1975) The effect of diphenols upon the autoxidation of oxyhemoglobin and oximyoglobin. *Arch. Biochem. Biophys.* **168**, 549-556.
- [173]. Oteiza, P.I., Kleinman, C.G., Demasi, M. e Bechara, E.J.H. (1995) 5-Aminolevulinic acid induces iron release from ferritin. *Arch. Biochem. Biophys.* **316**, 607-611.
- [174]. Gelvan, D., Fibach, E., Meyron-Holtz, E.G. e Konijn, A.M. (1996) Ferritin uptake by human erythroid precursors is a regulated iron uptake pathway. *Blood* **88**, 3200-3207.
- [175]. Silva, D., Miller, D.M., Reif, D.W. e Aust, S.D. (1992) *In Vitro* loading of apoferritin. *Arch. Biochem. Biophys.* **293**, 409-415
- [176]. Castilho, R.F., Kowaltowski, A.J. e Vercesi, A.E. (1996) The irreversibility of inner mitochondrial membrane permeabilization by Ca^{2+} plus prooxidants is determined by the extent of membrane protein thiol cross-linking. *J. Bioenerg. Biomembr.* **28**, 523-529.
- [177]. Levi, S., Luzzago, A., Cesareni, G., Cozzi, A., Franceschinelli, F., Albertini, A. e Arosio, P. (1988) Mechanism of ferritin iron uptake: Activity of the H-chain and deletion mapping of the ferro-oxidase site. *J. Biol. Chem.* **263**, 18086-18092.
- [178]. Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F., Grijalba, M.T., Bechara, E.J.H. e Vercesi, A.E. (1996) Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alterations mediated by Ca^{2+} ions. *J. Biol. Chem.* **271**, 2929-2934.
- [179]. Musci, G., Bonaccorsi, M.C., Fagiolo, U. e Calabrese, L. (1993) Age-related changes in human ceruloplasmin. Evidence for oxidative modifications. *J. Biol. Chem.* **268**, 13388-13395.
- [180]. Kang, J.H., Kim, K.S., Choi, S.Y., Kwon, H.Y. e Won, M.H. (2001) Oxidative modification of human ceruloplasmin by peroxy radicals. *Biochim Biophys. Acta.* **1568**, 30-36.
- [181]. Robinson, J. e Cooper, J.M. (1970) Method of determining oxygen concentrations in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode. *Anal. Biochem.* **33**, 390-399.

-
-
- [182]. Miller, D.M., Buettner, G.R. e Aust, S.D. (1990) Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic. Biol. Med.* **8**, 95-108.
 - [183]. Bruice, P. Y. (1990) Role of the acidity of the ketone in determining the mechanism of enolization via proton abstraction from ketone, carbinolamine, or imine. Catalysis of the enolization of 2,4-pentanedione and 3-methyl-2,4-pentanedione by oxyanions and by primary, secondary, and tertiary amines. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 7361-7368.
 - [184]. Halliwell, B. e Gutteridge, J.M.C (1999) In: *Free radicals in biology and medicine*. 4rd Ed. Oxford University Press, Oxford, UK.
 - [185]. Comporti, M., Signorini, C., Buonocore, G. e Ciccoli, L. (2002) Iron release, oxidative stress and erythrocyte ageing. *Free Radic. Biol. Med.* **32**, 568-576.
 - [186]. Mashino, T. e Fridovich, I. (1987) Superoxide radical initiates the autoxidation of dihydroxyacetone. *Arch. Biochem. Biophys.* **254**, 547-551
 - [187]. Buettner, G.R. (1987) Spin trapping: ESR parameters of spin adducts. *Free Radic. Biol. Med.* **3**, 259-303.
 - [188]. Kohno, M., Yamada, M., Mitsuta, K., Mizuta, Y., Yoshikawa, T.(1991) Spin-trapping studies on the reaction of iron complexes with peroxides and effects of water-soluble antioxidants. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **64**, 1447-53.
 - [189]. Monteiro, H.P., Abdalla, D.S.P., Augusto, O., e Bechara, E.J.H. (1989) Free radical generation during δ -aminolevulinic acid autoxidation: induction by hemoglobin and connections with porphyriopathies. *Arch. Biochem. Biophys.* **271**, 206-216.
 - [190]. Monteiro, H.P., Vile, G.F. e Winterbourn, C.C. (1989) Release of iron from ferritin by semiquinone, anthracycline, bipyridyl, and nitroaromatic radicals. *Free Radic. Biol. Med.* **6**, 587-591.
 - [191]. Wallace, W.J., Houtchens, R.A., Maxwell, J.C. e Caughey, W.S. (1982) Mechanism of autooxidation for hemoglobins and myoglobins. *J. Biol. Chem.* **257**, 4966-4977
 - [192]. Wallace, W.J., Houtchens, R.A., Maxwell, J.C. e Caughey, W.S. (1982) Mechanism of autooxidation for hemoglobins and myoglobins. *J. Biol. Chem.* **257**, 4966-4977.
 - [193]. Monteiro, H.P., Abdalla, D.S.P., Faljoni-Alario, A. e Bechara, E.J.H. (1986) Generation of active oxygen species during coupled autoxidation of oxyhemoglobin and δ -aminolevulinic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **881**, 100-106.
 - [194]. Ryter, S.W. e Tyrrell, R.M. (2000) The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 289-309.
 - [195]. Mann, S, Bannister, J.V. e Williams, R.J.P. (1986) Structure and composition of ferritin cores isolated from human spleen, limpet (*Patella vulgata*) hemolymph and bacterial (*Pseudomonas aeruginosa*) cells. *J. Mol. Biol.* **188**, 225-235.
 - [196]. Watt, G.D., Frankel, R.B. e Papaefthymiou, G.C. (1985) Reduction of mammalian ferritin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 3640-3643.

- [197]. Watt, G.D., Jacobs, D. e Frankel, R.B. (1988) Redox reactivity of bacterial and mammalian ferritin: is reductant entry into the ferritin interior a necessary step for iron release? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **85**, 7457-7461.
- [198]. Jacobs, D., Watt, G.D., Frankel, R.B. e Papaefthymiou, G.C. (1989) Fe²⁺ binding to apo and holo mammalian ferritin. *Biochemistry* **28**, 9216-9221.
- [199]. Rohrer, J.S., Islam, Q.T., Watt, G.D., Sayers, D.E. e Theil, E.C. (1990) Iron, environment in ferritin with large amounts of phosphate, from *Azotobacter vinelandii* and horse spleen, analyzed using extended X-ray absorption fine structure (EXAFS). *Biochemistry* **29**, 259-264.
- [200]. Bruyce, C.F.A. e Crichton, R.R. (1973) The catalytic activity of horse spleen apoferritin. *Biochem. J.* **133**, 301-309.
- [201]. Bomford, A., Conlon-Hollingshead, C. e Munro, H.N. (1981) Adaptative responses of rat tissue isoferritins to iron administration. *J. Biol. Chem.* **256**, 948-955.
- [202]. Kohgo, Y., Yokota, M. e Drysdale, J.W. (1980) Differential turnover of rat liver isoferritins. *J. Biol. Chem.* **255**, 5195-5200.
- [203]. Wagstaff, M., Worwood, M. e Jacobs, A. (1978) Properties of human tissue isoferritins. *Biochem. J.* **173**, 969-977.
- [204]. Jones, T., Spencer, R. e Walsh, C. (1978) Mechanism and kinetics of iron release from ferritin by dihydroflavins and dihydroflavin analogues. *Biochemistry* **17**, 4011-4017.
- [205]. Johnson, J.L., Norcross, D.C., Arioso, P., Frankel, R.B. e Watt, G.D. (1999) Redox reactivity of animal apoferritins and apoheteropolymers assembled from recombinant heavy and light human chain ferritins. *Biochemistry* **38**, 4089-4096.
- [206]. Hall, J.C., Sordahl, L.A. e Stefko, P.L. (1960) The effect of insulin on oxidative phosphorylation in normal and diabetic mitochondria. *J. Biol. Chem.* **235**, 1536-1539.
- [207]. Harano, Y., DePalma, R.G., Lavine, L. e Miller, M. (1972) Fatty acid oxidation, oxidative phosphorylation and ultrastructure of mitochondria in the diabetic rat liver. Hepatic factors in diabetic ketosis. *Diabetes* **21**, 257-270.
- [208]. Sakai, K., Matsumoto, K., Nishikawa, T., Suefuji, M., Nakamaru, K., Hirashima, Y., Kawashima, J., Shirotani, T., Ichinose, K., Brownlee, M. e Araki, E. (2003) Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic beta-cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**, 216-222.
- [209]. Gerbitz, K.D., van den Ouweland, J.M., Maassen, J.A. e Jaksch, M. (1995) Mitochondrial diabetes mellitus: a review. *Biochim. Biophys. Acta.* **1271**, 253-260.
- [210]. Bedetti, C.D., Montero, G.A. e Stoppani, A.O. (1987) Effect of diabetes, adrenalectomy and hypophysectomy on D-3-hydroxybutyrate dehydrogenase activity and substrate oxidation by rat mitochondria. *Biochem. Int.* **14**, 45-54.
- [211]. Churchill, P., McIntyre, J.O., Vidal, J.C. e Fleischer, S. (1983) Basis for decreased D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase activity in liver mitochondria from diabetic rats. *Arch. Biochem. Biophys.* **224**, 659-670.

- [212]. Kristal, B.S., Jackson, C.T., Chung, H.Y., Matsuda, M., Nguyen, H.D. e Yu. B.P. (1997) Defects at center P underlie diabetes-associated mitochondrial dysfunction. *Free Radic. Biol. Med.* **22**, 823-833.
- [213]. Yakes, F.M. e Van Houten, B. (1997) Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 514-519.
- [214]. Zastawny, T.H., Dabrowska, M., Jaskolski, T., Klimarczyk, M., Kulinski, L., Koszela, A., Szczesniewicz, M., Sliwinska, M., Witkowski, P. e Olinski, R. (1998) Comparison of oxidative base damage in mitochondrial and nuclear DNA. *Free Radic. Biol. Med.* **24**, 722-725.
- [215]. Eaton, J.W. e Qian, M. (2002) Molecular bases of cellular iron toxicity. *Free Radic. Biol. Med.* **32**, 833-840.
- [216]. Vercesi, A.E., Castilho, R.F., Meinicke, A.R., Valle, V.G.R., Hermes-Lima, M. e Bechara, E.J.H. (1994) Oxidative damage of mitochondria by 5-aminolevulinic acid: role of Ca^{2+} and membrane protein thiols. *Biochim. Biophys. Acta* **1188**, 86-92.
- [217]. Hermes-Lima, M. (1995) How do Ca^{2+} and 5-aminolevulinic acid-derived oxyradicals promote injury to isolated mitochondria? *Free Radic. Biol. Med.* **19**, 381-390.
- [218]. Crompton, M., Ellinger, H. e Costi, A. (1988) Inhibition by cyclosporin A of a Ca^{2+} -dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem. J.* **255**, 357-360.
- [219]. Szabo, I. e Zoratti, M. (1991) The giant channel of the inner mitochondrial membrane is inhibited by cyclosporin A. *J. Biol. Chem.* **266**, 3376-3379.
- [220]. Fagian, M.M., Pereira-da-Silva, L., Martins, I.S. e Vercesi, A.E. (1990) Membrane protein thiol cross-linking associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} plus prooxidants. *J. Biol. Chem.* **265**, 19955-19960.
- [221]. Bernardi, P., Vassanelli, S., Veronese, P., Colonna, R., Szabo, I. e Zoratti, M. (1992) Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations. *J. Biol. Chem.* **267**, 2934-2939.
- [222]. Gunter, T.E., Gunter, K.K., Sheu, S.S. e Gavin, C.E. (1994) Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. *Am. J. Physiol.* **267**, C313-C339.
- [223]. Niki, E., Kawakami, A., Saito, M., Yamamoto, Y., Tsuchiya, J. e Kamiya, Y. (1985) Effect of phytyl side chain of vitamin E on its antioxidant activity. *J. Biol. Chem.* **260**, 2191-2196.
- [224]. Musci, G., Bonaccorsi, M.C.P. e Calabrese, L. (1995) Modulation of the redox state of the copper sites of human ceruloplasmin by chloride. *J. Protein Chem.* **14**, 611-617.
- [225]. Calabrese, L., Carbonaro, M. e Musci, G. (1988) Chicken ceruloplasmin. Evidence in support of a trinuclear cluster involving type 2 and 3 copper centers. *J. Biol. Chem.* **263**, 6480-6483.

-
- [226]. Calabrese, L. e Musci, G. (1997) Molecular properties of ceruloplasmin from different species. In: *Multi-copper Oxidases* (Messerschmidt, A., Ed.), pp. 307-354. World Scientific Pub. Co., Singapore.
- [227]. Calabrese, L., Carbonaro, M. e Musci, G. (1989) Presence of coupled trinuclear copper cluster in mammalian ceruloplasmin is essential for efficient electron transfer to oxygen. *J. Biol. Chem.* **264**, 6183-6187.
- [228]. Lo, T.W.C., Westwood, M.E., Mclellan, A.C., Selwood, T. e Thornalley, P.J. (1994) Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. *J. Biol. Chem.* **269**, 32299-32305.
- [229]. Niederau, C. (1999) Diabetes mellitus in hemochromatosis. *Z. Gastroenterol. suppl.* **1**, 22-32.
- [230]. Nickander, K.K., McPhee, B.R., Low, P.A. e Tritschler, H. (1996) *Alpha*-lipoic acid: antioxidant potency against lipid peroxidation of neural tissues in vitro and implications for diabetic neuropathy. *Free Radic. Biol. Med.*, **21**, 631-639.
- [231]. Young, I.S., Tate, S., Lightbody, J. H., McMaster, D. e Trimble, E.R. (1995) The effects of desferrioxamine and ascorbate on oxidative stress in the streptozotocin diabetic rat. *Free Radic. Biol. Med.*, **18**, 833-840.
- [232]. Brittenham, G.M. e Badman, D.G. (2003) Noninvasive measurement of iron: report of an NIDDK workshop. *Blood*, **101**, 15-19.