



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

“Ferro Lábil: Propriedades Fundamentais e Reatividade com Peroxinitrito no modelo celular RAW 264.7”.

André Luís Condeles

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP

2023

ANDRÉ LUÍS CONDELES

Ferro lábil: Propriedades fundamentais e reatividade com peroxinitrito no modelo celular RAW 264.7

VERSÃO CORRIGIDA

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área: Química

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Toledo Junior

RIBEIRÃO PRETO -SP

2023

Autorizo a divulgação e reprodução total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Condeles, André Luís

Ferro lábil: Propriedades fundamentais e reatividade com peroxinitrito no modelo celular RAW 264.7.

Ribeirão Preto, 2023.

108 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.

Orientador: Toledo Junior, José Carlos.

1. Ferro lábil. 2. Peroxinitrito. 3. Quantificação. 4. Propriedades termodinâmicas.

Nome: CONDELES, André Luís

Título: “Ferro lábil: Propriedades fundamentais e reatividade com peroxinitrito no modelo celular RAW 264.7”

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

*Dedico este trabalho à minha família,
e aos meus amigos, e a todos que
sempre me deram força para chegar a
este momento.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Carlos Toledo Junior, primeiramente pela oportunidade, pelos ensinamentos, paciência, e por contribuir com meu crescimento profissional e pessoal.

À minha família, por todo o apoio durante todos esses anos.

Aos meus colegas Angélica, Gabriel, Gisdélia, Alexia, Yuri, Gustavo, Rafael e Maria Beatriz (Bia) por todo apoio e ajuda que deram durante a execução deste trabalho.

Aos colegas Fernanda, Caroline, Dayane, Cristina, Jacques e Bianca, pela amizade, por todos os momentos alegres e descontraídos.

À professora Dr.^a Maria Lúcia Arruda de Moura Campos por todo apoio e carinho, pela amizade e conselhos.

A todos os docentes, técnicos e funcionários do Departamento de Química.

Aos docentes e colegas do CEPID-Redoxoma pelo apoio e discussões.

À FAPESP pelo financiamento do projeto de pesquisa.

À CAPES e CNPQ pela bolsa concedida.

À Universidade de São Paulo

RESUMO

CONDELES, A. L. **Ferro lábil: Propriedades fundamentais e reatividade com peroxinitrito no modelo celular RAW 264.7.** 2023. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

O Ferro Lábil (LIP) representa uma fonte celular universal, regulável e fundamental de ferro (II) usada para incorporação como o cofator de apo-ferro proteínas nascentes. Apesar dessa alegada função de chaperona de ferro, a identidade de LIP ainda é desconhecida, sendo sua existência baseada na propriedade de ser complexado por quelantes de elevada afinidade por Fe(II), o que distingue LIP do ferro ligado a grupos heme e clusters de enxofre. Essa propriedade também tem sido explorada para estudar suas reações químicas e propriedades biológicas. Recentemente, em investigações da oxidação dependente de peroxinitrito em células RAW 264.7, observamos que a quelação de LIP aumenta a oxidação de um indicador fluorescente e concluímos que LIP interage com peroxinitrito (ou derivados radiculares de peroxinitrito) e diminui seu poder oxidante. O presente estudo é dividido em dois capítulos. No primeiro, nós abordamos propriedades fundamentais da reação entre LIP e peroxinitrito usando a mesma metodologia de fluorescência e modelo celular e constatamos que a reação entre LIP e peroxinitrito é provavelmente direta, rápida (constante de velocidade na faixa entre 10^6 - 10^7 $M^{-1}s^{-1}$) e com características catalíticas. Reunidas, essas informações sugerem que LIP representa um sistema peroxinitrito redutase em células RAW 264.7. No segundo capítulo, nós criamos um modelo de que LIP esteja ligado a um constituinte celular C na forma de um complexo genérico CLIP e modificamos metodologia originalmente usada para quantificação de LIP para acessar a constante termodinâmica de afinidade entre LIP e C (K_d) bem como a concentração total de C. Os resultados sugerem que as concentrações totais de LIP e de seu ligante (C) não ultrapassem 3 μM em células RAW 264.7 e que estejam ligados fortemente ($K_d \approx 10^{-2}$ μM), existindo predominantemente como CLIP. Essas informações confrontam as hipóteses existentes de que LIP seja o complexo hexaaqua Fe(II) ou um complexo com Glutathiona (GSFe) e podem ajudar na identificação de LIP.

Palavras-chave: Ferro lábil. Peroxinitrito. Propriedades termodinâmica. Cinética.

ABSTRACT

CONDELES, A. L. **Labile iron pool: Fundamental properties and reactivity with peroxyxynitrite in the RAW 264.7 cell model.** 2023. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

The Labile Iron pool (LIP) represents a universal, regulated, and fundamental cellular source of iron(II) used for incorporation as the cofactor of nascent apo-iron proteins. Despite this alleged iron chaperone function, the identity of LIP is still unknown, and its existence is based on the property of being complexed by chelators with high affinity for Fe(II), which distinguishes LIP from heme- and sulfur-clusters iron. This property has also been exploited to study its chemical reactions and biological properties. Recently, in investigations of peroxyxynitrite-dependent oxidation in RAW 264.7 cells, we observed that LIP chelation increases the oxidation of a fluorescent indicator and concluded that LIP interacts with peroxyxynitrite (or peroxyxynitrite derived radicals) and decreases its oxidizing power. This study is divided into two chapters. In the first, we addressed fundamental properties of the reaction between LIP and peroxyxynitrite using the same fluorescence methodology and cell model and found that the reaction between LIP and peroxyxynitrite is probably direct, fast (rate constant within 10^6 - 10^7 M⁻¹s⁻¹) and with catalytic characteristics. Together, these observations suggest that the LIP represents a constitutive peroxyxynitrite reductase system in RAW 264.7 cells. In the second chapter, we model that LIP is linked to a cellular constituent C in the form of a generic CLIP complex and modify a methodology originally used for LIP quantification to assess both the thermodynamic affinity constant between LIP and C (Kd) as well as the total concentration of C. The results suggest that the total concentrations of LIP and its ligand (C) do not exceed 3 μ M in RAW 264.7 cells and that they are tightly bound together (Kd $\approx 10^{-2}$ μ M), existing predominantly as CLIP. This information confronts the existing hypotheses that LIP is the hexaaqua Fe(II) complex or a complex with Glutathione (GSFe) and can help the identification of LIP.

Keywords: Labile iron pool. Peroxyxynitrite. Thermodynamic properties. Kinetics.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACO2	–	Aconitase mitocondrial
ALAS2	–	Delta aminolevulinato sintase 2
ASC ⁻	–	Ascorbato
Bipy	–	Bipiridina
CA	–	Calceína
CA-AM	–	Calceína aceto metoxi
CBA	–	Ácido borônico de cumarina
CC	–	Constituintes celulares
CO ₂	–	Dióxido de Carbono
COH	–	7-hidroxi cumarina
CO ₃ ^{•-}	–	Ânion radical carbonato
CuZn-SOD	–	Superóxido dismutase de cobre e zinco
DAF2	–	4,5 diamino fluoresceína
DAF2	–	4,5 diamino fluoresceína triazol
DCF	–	Diclorodihidrofluoresceína
DCFH•	–	Radical diclorofluoresceína hidrato
Dcytb	–	Citocromo b duodenal
DMSO	–	Dimetil sulfóxido
DMT1	–	Proteína transportadora de metal divalente
DNA	–	Ácido desoxirribonucleico
DNIC	–	Complexos de ferro dinitrosilo
DOOH	–	Deoxihipusina hidroxilase
DTPA	–	Ácido etilenotriamino penta acético
ERO	–	Espécie reativa de oxigênio
FBXL5	–	Proteína de ubiquitinação
FCN	–	Hexacianoferrato
FPN	–	Ferroportina
Ft	–	Ferritina

FTH1	–	Cadeia densa da ferritina
FTL	–	Cadeia leve da ferritina
GLRX3	–	Glutaredoxina 3
GSH	–	Glutathiona
H ₂ DCF	–	2,7-diclorodihidrofluoresceína
H ₂ DCF-DA	–	2,7-diclorodihidrofluoresceína diacetato
H ₂ O ₂	–	Peróxido de hidrogênio
HCP1	–	Proteína transportadora de heme
HIF2a	–	Fator induzível de hipóxia
HO	–	Heme-oxigenases
HRG1	–	Proteína importadora de grupos ferro-heme
HRP	–	Peroxidase de rábano (<i>hourse radish peroxidase</i>)
IRE	–	Elemento responsivo a ferro
IRP	–	Proteína regulatória do ferro
LIP	–	Ferro lábil (<i>Labile iron pool</i>)
LOOH	–	Hidroperóxidos lipídicos
Mn-SOD	–	Superóxido dismutase de manganês
NADH	–	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	–	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NO	–	Óxido nítrico
NO ₂	–	Dióxido de nitrogênio
NO ₂ ⁻	–	Nitrito
O ₂	–	Oxigênio
O ₂ ^{•-}	–	Ânion radical superóxido
•OH	–	Radical hidroxila
ONOO ⁻	–	Peroxinitrito
ONOOCO ₂ ⁻	–	Peroxinitrosocarbonato
ONOOH	–	Ácido peroxinitroso
oxTP	–	Tiol peroxidase oxidado
PBS	–	Tampão fosfato salino

PCBP1	–	Proteína de ligação a região poli(C) de RNAs 1
PCBP2	–	Proteína de ligação a região poli(C) de RNAs 2
PHD	–	Prolil hidroxilase
PQ	–	Paraquat
PTIO	–	2-fenil-4,4,5,5,-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido
R•	–	Radicais derivados de peroxinitrito
RBP	–	Proteína de ligação ao RNA
RNS	–	Espécie reativa de nitrogênio
ROS	–	Espécie reativa de oxigênio (<i>reactive oxygen species</i>)
RPE	–	Ressonância paramagnética de elétrons
SIH	–	Salicilaldeído isonicotinoil hidrazona
STEAP	–	Proteína transmembrana metaloredutase
TBI	–	Transferrina ligada a ferro
TFR	–	Receptor de transferrina
TP	–	Tiol peroxidase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Funções fisiológicas do ferro.....	14
Figura 2 – Sistema regulatório IRP/IRE.....	18
Figura 3 – Fatores responsáveis por desencadear a regulação por IRPs.....	19
Figura 4 – Esquema das possíveis reações de ferro lábil (LIP) com peroxinitrito e seus derivados radicalares.....	27
Figura 5 – Quantificação de H ₂ DCF intracelular.....	34
Figura 6 – Determinação da concentração de LIP em RAW 264,7.....	36
Figura 7 – Estudo da nitrosilação de DAF2 e oxidação de H ₂ DCF por NO ₂ [•] dependente de PTIO.....	41
Figura 8 – Perfis de oxidação do H ₂ DCF intracelular por fluxos de dióxido de nitrogênio na presença de ASC ⁻ ou FCN.....	42
Figura 9 – Perfil de oxidação do H ₂ DCF por fluxos de dióxido de nitrogênio em suspensão celular.....	43
Figura 10 – Formação de peroxinitrito intracelular detectada com CBA em RAW 264,7 na presença de fluxos de NO [•] e O ₂ ^{•-}	45
Figura 11 – Bloqueio do LIP por quelantes em células RAW 264,7 aumenta a oxidação de H ₂ DCF dependente de peroxinitrito.....	46
Figura 12 – Perfil de formação do DCF em função do tempo de adição do SIH.....	48
Figura 13 – Quociente (q) calculado a partir dos valores de taxa de aumento de fluorescência na presença e ausência de SIH nos seus diferentes tempos de adição.....	53
Figura 14 – Determinação da constante de dissociação de calceína em solução de Ferro (II).....	62
Figura 15 – Concentração de calceína livre em função da calceína ligado ao ferro do ferro lábil.....	63
Figura 16 – Curva de ajuste da concentração de CA em função da concentração de CALIP.....	68

SUMÁRIO

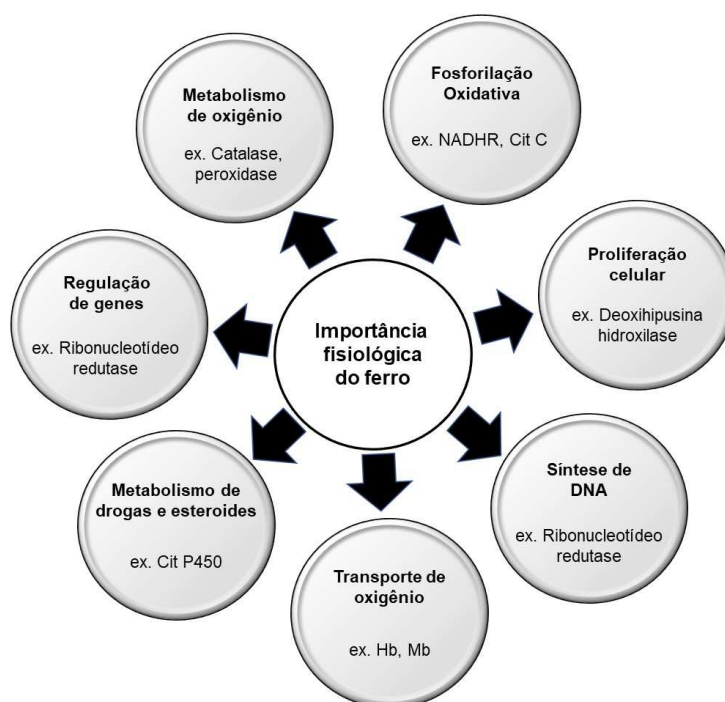
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 O FERRO CELULAR.....	15
1.1.1 Aquisição de ferro em células de mamíferos.....	15
1.1.2 Homeostase do ferro celular.....	16
1.1.3 Ferro celular é armazenado na ferritina.....	19
1.2 FERRO LÁBIL: O QUE SABEMOS, E O QUE ESPECULAM.....	20
1.3 O PAPEL DO FERRO LÁBIL EM CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS E ADVERSAS.....	22
1.3.1 Peróxido de Hidrogênio e LIP: combinação pró-oxidante.....	24
1.3.2 LIP e Peroxinitrito. LIP como agente antioxidante.....	25
2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA	28
OBJETIVO GERAL	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES.....	31
3.2 CULTURA DE CÉLULAS.....	31
3.3 TRATAMENTO DAS CÉLULAS COM 2,7DICLORO DIHIDRO FLUORESCÉINA DIACETATO (H ₂ DCF-DA)	32
3.4 FLUORESCÊNCIA DAS AMOSTRAS DE CÉLULAS TRATADAS COM H ₂ DCF-DA.....	32
3.5 TRATAMENTO DAS CÉLULAS COM CALCEÍNA-AM (CA-AM)	33
3.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE H ₂ DCF E DA SUA FORMA OXIDADA DCF EM CÉLULAS RAW 264,7	33
3.6.1 Quantificação de H ₂ DCF após tratamento das células com H ₂ DCF-DA	33
3.6.2 Quantificação de DCF acumulado em células RAW 264,7 após exposição a fluxo de peroxinitrito utilizando paraquat e doador de NO [•] (PQ/NO [•]).	
34	
3.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FERRO LÁBIL (LIP) EM RAW 264,7.....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 CAPÍTULO I: FERRO LÁBIL – LIP REAGE DIRETAMENTE, RAPIDAMENTE E CATALICAMENTE COM PEROXINITRITO.....	38

4.1.1	Modelo de geração de fluxos do radical NO_2^\bullet	39
4.1.2	Oxidação do H_2DCF dependente de NO_2^\bullet no modelo hipotético de reação LIP/radical.....	41
4.1.3	LIP possivelmente não interage com radicais.	42
4.1.4	Produção intracelular de peroxinitrito pela combinação de paraquat e doador de NO.	43
4.1.5	Efeito da adição do quelante SIH em células expostas a peroxinitrito é atemporal.....	45
4.1.6	Propriedade catalítica da reação entre peroxinitrito e ferro lábil.....	46
4.1.7	Constante de velocidade da reação entre peroxinitrito e ferro lábil.....	47
4.1.8	Discussão – Capítulo I.....	51
4.2	CAPÍTULO II: PROPRIEDADES TERMODINÂMICAS DO FERRO LÁBIL EM RAW 264,7.	56
4.2.1	Determinação da constante de formação K_{CA} do complexo de calceína e ferro(II).57	
4.2.2	Construção da curva de CALIP versus CA.....	60
4.2.3	Ensaio com calceína para a quantificação de LIP_T em células.....	60
4.2.4	Hipótese de LIP como um complexo aquoso em células.	61
4.2.5	Desenvolvimento matemático da equação de equilíbrio para determinação dos parâmetros termodinâmicos do ferro lábil em células.	62
4.2.6	Determinação dos parâmetros termodinâmicos do LIP e da concentração do ligante de LIP em RAW 264,7.	64
4.2.7	Discussão – Capítulo II.....	65
5.	CONCLUSÕES.....	70
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
	APÊNDICES.....	82
	APÊNDICE A - MODELO DE REAÇÕES PARA A OXIDAÇÃO DE H_2DCF POR RADICAIS OXIDANTES DERIVADOS DE PEROXINITRITO EM CÉLULAS.	83
	APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO COM OS RESULTADOS DO CAPÍTULO I.	88

1. Introdução

O ferro está onipresente em todo e qualquer tipo celular e organismo vivo. Em humanos, de 65-75% do ferro total do organismo encontra-se nos eritrócitos, responsável pelo transporte e distribuição de oxigênio¹. Em células do tecido, entretanto, ferro é crucial para uma variedade de outros importantes aspectos fisiológicos como sinalização biológica e respiração celular. É considerado um cofator em proteínas e desempenha funções vitais no metabolismo celular (Figura 1). Nos compartimentos celulares de células de mamíferos o ferro está quase sempre ligado a proteínas, seja como grupos prostéticos Heme, cluster de ferro e enxofre, mineralizado como óxidos sólidos em estruturas proteicas (ferritina) ou diretamente, através de resíduos de aminoácidos².

Figura 1 – Funções fisiológicas do ferro.



Fonte: adaptado de Raza, M. *et. al.*³.

Existe ainda uma classe de ferro que é encontrada solubilizada no citosol celular denominado como ferro lábil (*labile iron pool*, LIP). Essa última, ainda pouco caracterizada, gera discussões acerca de seu papel em processos fisiológicos, patofisiológicos e farmacológicos celulares, por isso é objeto de muitos estudos que tentam caracterizar esses processos em que esta espécie de ferro está direta ou indiretamente envolvido, assim como sua composição celular. Alguns autores dividem

o ferro lábil em citosólico e organelar, aqui neste trabalho e assim como muitos outros autores, o definimos como sendo exclusivamente citosólico.

De maneira genérica as proteínas que contém ferro estão envolvidas em processos redox, seja oxidando outros componentes celulares (transdução de sinais eletroquímicos), produzindo espécies radicalares (radicais livres), que podem tanto atuar como oxidantes (abstração de elétrons) ou redutores (adição a moléculas orgânicas), ou na redução de espécies oxidantes. Há também proteínas especializadas que contem centros catalíticos ferrosos que atuam no transporte e armazenagem (hemoglobina e mioglobina) de espécies inertes a estes centros como o oxigênio molecular e o dióxido de carbono.

1.1 O ferro celular

1.1.1 Aquisição de ferro em células de mamíferos.

A absorção de ferro da dieta pelas células da parede duodenal (enterócitos) é facilitada pela proteína transportadora de metal divalente (*divalent metal transporter 1*, DMT1). O ferro inorgânico (Fe^{3+}) proveniente da dieta é reduzido a Fe^{2+} por uma proteína ferri-redutase (*Duodenal cytochromo b reductase*, Dcytb) na superfície celular e transportado por DMT1 para o citosol celular. Grupos ferro-heme provenientes da dieta entram nos enterócitos por intermédio da proteína transportadora do heme-1 (HCP1)⁴.

Nas células de mamíferos o transporte de ferro para o interior celular (citosol) depende do tipo celular, mas de maneira geral podemos citar as principais formas. i) Por intermédio da transferrina ligada a ferro (*Tf-bound iron* – TBI). Essa glicoproteína extracelular apresenta em sua estrutura dois sítios de ligação de alta afinidade para ferro (III) (Tf- Fe_2). Ela garante uma biodisponibilidade de ferro ao organismo através da circulação, ao mesmo tempo que limita a disponibilidade a organismo patogênicos que notadamente necessitam de ferro para virulência, assim como impede a formação de espécies radicalares que tenham como origem reações redox com o ferro. A Tf- Fe_2 associasse ao seu clássico receptor na superfície celular, o receptor de transferrina (*Tf receptor*, TFR) e o complexo Tf- Fe_2 /TFR sofre endocitose. O ambiente ácido do endossomo favorece a liberação do ferro da transferrina, que então é reduzido ao estado de oxidação ferroso (Fe^{2+}) por uma das proteínas transmembrana

da família de metaloredutases, (*six-transmembrane epithelial antigen of prostate*, STEAP). O Fe^{2+} é então transportado para o citosol celular por outra proteína transmembrana supracitada DMT1 e ganha a definição de LIP. Também, ferro pode acessar o interior celular por ii) pinocitose de ferritina extracelular ou iii) por endocitose de grupos ferro-heme e hemoglobina, provenientes de hemólise, através dos receptores CD91 e CD163 em macrófagos, e em eritrócitos, por meio de proteína importadora de grupos ferro-heme (*Heme-Responsive Gene 1*, HRG1)⁵.

Assim como o ferro tem a entrada facilitada nas células, sua saída ou extrusão é realizada por transportador especializado, a ferroportina (FPN). O papel das FPN's será melhor discutido quando falarmos da regulação do ferro pelas células.

1.1.2 Homeostase do ferro celular

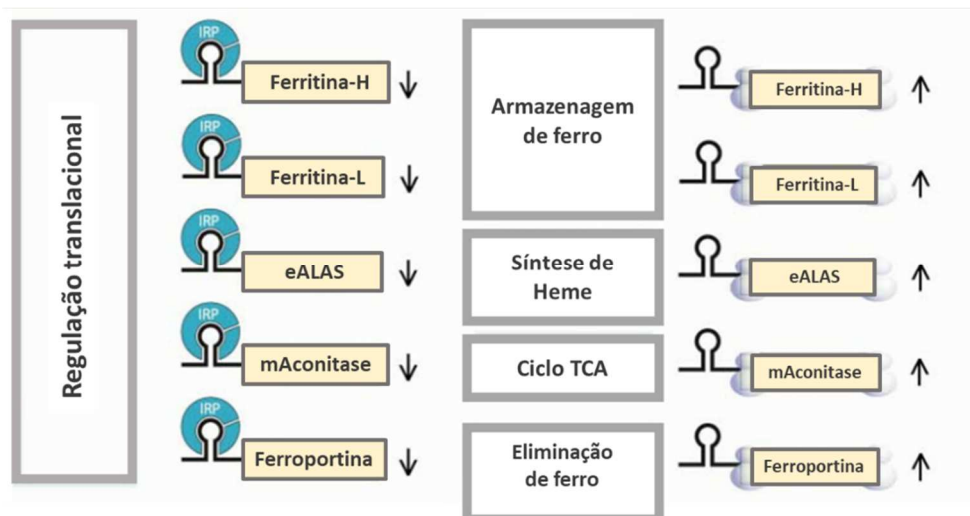
A homeostase de ferro celular em mamíferos acontece em dois níveis, celular e sistêmico. Para melhor entendimento vamos trata-los separadamente, e sem aprofundarmos muito, mas sabemos que esses dois sistemas não operam separadamente, e que o estado regulatório de um interfere no outro sistema regulatório. Vale ressaltar ainda que a homeostase de ferro é controlada com base na disponibilidade, demanda e estoque de ferro celular.

Começamos pela homeostase sistêmica. Esse controle age principalmente no efluxo de ferro celular para o plasma. Em qualquer célula de mamífero a saída de ferro inorgânico (Fe^{2+}) se dá pelo transportador FPN. Esse transportador é regulado negativamente, neste nível, por um hormônio secretado pelo fígado, a hepcidina ^{1;3}. Hepcidina é um peptídeo circulante que se liga a FPN na superfície celular, sinalizando sua internalização e conseguinte degradação. No duodeno, onde há a absorção de ferro da dieta, esse processo impede a saída do ferro absorvido pelos enterócitos para a distribuição plasmática a outros tecidos. Em macrófagos, que são células de defesa e onde há grande quantidade de ferro armazenado, a hepcidina bloqueia a liberação de ferro como uma resposta a processos patológicos, dificultando a aquisição de ferro pelo patógeno, com isso diminuindo sua proliferação e contribuindo para a resposta imunológica inata. Em processos inflamatórios, como supracitado, a expressão de hepcidina é modulada pela interleucina-6 (IL-6), uma citocina produzida em condições patológicas. A hepcidina também é liberada na urina e é considerada um agente

antimicrobiana natural. Também em nível sistêmico há enzimas especializadas na reconstituição/homeostase do ferro de grupos heme, provenientes da degradação de células vermelhas do sangue, como as heme-oxigenases (HO).

Em nível celular (citoplasmático), a homeostase de ferro é regulada de maneira pós-transcricional. Proteínas de ligação ao RNA (*RNA-binding proteins*, RBP's) conhecidas como proteínas regulatórias do ferro (iron regulatory proteins, IRP's) IRP1 e IRP2 se ligam a estruturas do tipo *hairpin* conhecidas como IRE's (*iron-responsive elements*) localizados na porção 5' de regiões não traduzidas de mRNAs (*untranslated region*, UTR) recém-transcritos e que codificam importantes proteínas do metabolismo de ferro (Figura 2) ³. No caso de excesso de LIP citosólico, as IRPs se associam a porção 5' UTR do mRNA e inibem a tradução desses mRNAs as respectivas proteínas com diferentes funções biológicas: i) na armazenagem do ferro, ferritina; cadeia densa (*heavy-ferritin chain 1*, FTH1) e leve (*light-ferritin*, FTL), ii) secreção, FPN e iii) utilização, primeira e principal enzima da biogênese de grupos heme nos eritrócitos (*Delta-aminolevulinatase synthase 2*, ALAS2) e aconitase mitocondrial (ACO2, faz a interconversão citrato a isocitrato no ciclo do ácido cítrico (Figura 2) ^{6; 7; 8; 9}. A HIF2 α (*Hypoxia inducible factor 2 α*), um importante fator de transcrição que modula a produção de células vermelhas com base na biodisponibilidade de ferro, tem sua tradução reprimida por IRP1, impedindo que as fontes de ferro celular se esgotem e que células vermelhas sem ferro (defeituosas) sejam produzidas quando os níveis de ferro estão baixos¹⁰. Por outro lado, no caso de falta de LIP citosólico, IRPs se ligam a IRE da porção 3' UTR de mRNAs proporcionando estabilização do mRNA (inibindo sua degradação) e levando a um aumento de expressão da proteína codificada. Isso é observado para o mRNA que codifica a proteína DMT1, responsável pela entrada de ferro inorgânico (Fe²⁺) nas células.

Figura 2 – Sistema regulatório IRP/IRE.



Fonte: Adaptado de Hentze et al.¹¹

Outros agentes e condições contribuem com a atividade das IRPs, como óxido nítrico (nitric oxide, NO) (IRP1 e IRP2), peróxido de hidrogênio H₂O₂ (IRP1) e hipóxia (IRP2) (Figura 3). Apesar da atividade de ligação de uma IRP ao sítio IRE ser uma resposta a flutuações do LIP citosólico, IRP não é sensibilizada diretamente por ferro. O sensor de ferro que modera toda esta cascata de inativação e regulação é uma proteína de ubiquitinação (*f-box and leucine-rich repeat protein 5*, FBXL5) que se associa a IRP quando a concentração de LIP citosólico está elevada. O complexo formado por IRP-FBXL5 recruta a proteína E3 ligase que ubiquitina a IRP, sinalizando ambas proteínas IRP1 e IRP2 para degradação. A IRP1 também é inativada por incorporação de cluster ferro-enxofre (4Fe•4S), que passa ter a função de uma enzima citosólica com atividade aconitase¹². Este processo leva a uma diminuição na disponibilidade de IRPs, ocasionando menor repressão da tradução de proteínas do metabolismo de ferro, permitindo maior utilização, estocagem ou eliminação de ferro. No caso da DMT1, como vimos anteriormente, o efeito será contrário e ocasionará uma menor expressão dessa proteína, levando a diminuição na absorção de ferro. Somados os efeitos, esses dois mecanismos complementares levam ao reestabelecimento dos níveis normais de ferro celular. Na figura 3 é mostrado como os níveis de ferro celular e algumas moléculas interferem na atividade dessas proteínas regulatórias.

Figura 3 – Fatores responsáveis por desencadear a regulação por IRPs.



Fonte: Adaptado de Hentze et.al.¹¹

1.1.3 Ferro celular é armazenado na ferritina.

Uma vez dentro da célula LIP tem três destinos. Um deles é a utilização pela própria célula na biossíntese de metaloproteínas, com a incorporação do ferro a apo ferro-proteínas nascentes, incluindo protoporfirinas IX ou clusters ferro-enxofre. Outro caminho é a eliminação para a circulação distribuindo-o as demais células do organismo. O terceiro caminho acontece quando a disponibilidade de LIP é maior que a utilização. Nesse caso, as células armazenam LIP em excesso na ferritina com duas finalidades, i) manter um estoque de ferro para situações de pouca disponibilidade, ii) tentativamente baixar os níveis de ferro citosólico e circulante disponível, uma vez que o ferro em excesso pode desencadear reações redox potencialmente danosa as células e propiciar a proliferação de microrganismos patogênicos.

O ferro celular é armazenado mineralizado (óxido) na ferritina. Ferritina é uma estrutura proteica polimérica, encontrada normalmente no citosol celular, composta por 24 unidades constituídas de duas cadeias, uma densa e enzimaticamente ativa (ferroxidase) FTH1 (cadeia H), onde o ferro no estado ferroso é oxidado e mineralizado na forma de um óxido, e outra menos densa ou leve FTL (cadeia L), tendo como principal função o transporte de elétrons através da “crosta” proteica do polímero. Cada unidade de ferritina (Ft) comporta até 4500 átomos de ferro e é onipresente, com variações na proporção de cadeias H e L¹³. A ferritina também tem sua expressão controlada por IRPs.

A bem pouco tempo conhecíamos somente como o ferro era adquirido pelas células, onde é utilizado, como é secretado e onde é armazenado (reserva), assim como, sua regulação pós-translacional e pós-transcricional. Também, que parte do ferro constituía uma espécie solubilizada no citosol celular, denominada ferro lábil ou quelatável (*Labile iron pool*, LIP), mas pouco, do processo e etapas envolvidas e que interligam essas rotas metabólicas do ferro celular. Recentemente estudos mostram evidências de que a interação entre certas proteínas e a atividade delas é intermediada por ferro, ou melhor, pelo ferro presente na estrutura destas proteínas.

1.2 Ferro Lábil: O que sabemos, e o que especulam.

Definição: LIP é definido com uma fonte de ferro celular permutável. Na nomenclatura de Química de Coordenação, LIP é uma fonte celular de ferro lábil, isto é, seus ligantes são substituídos rapidamente. Essa propriedade distingue LIP das demais classes de ferro celular, notadamente ferro-proteínas, ferro-heme e clusters de enxofre, e são coerentes com a função de LIP como fonte celular para incorporação de ferro em apo ferro-proteínas. Já em estudos farmacológicos podemos dizer que o LIP é quelatável, ou seja, pode ser removido por complexação com certa facilidade utilizando quelantes metálicos^{14; 15}.

Estado redox: Numerosos argumentos bioquímicos sugerem que o LIP está predominantemente no estado redox Fe(II). Pelas características fisiológicas do citosol de células de mamíferos como pH (próximo de neutro) e o alto potencial redox redutivo¹, entende-se que LIP encontre-se quase que exclusivamente na sua forma ferrosa (Fe^{2+})^{14; 15}. Egyed e Saltman demonstraram que mais de 90% do LIP em eritrócitos está no estado de oxidação $2+$ ¹⁴. Breuer et al. usando calceína (CA) como o indicador fluorescente de LIP, mostrou que mais de 80% do LIP é Fe(II) em células K562¹⁵. Petrat et al. usando um outro indicador chegou a resultados semelhantes em hepatócitos¹⁶.

Concentração: A concentração fisiológica do LIP celular varia com o tipo celular e ainda está em debate na literatura. Diferentes métodos relatam

¹ Níveis de glutatona (GSH) e fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADPH) em relação a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH): GSH-NADPH/NADH.

concentrações significativamente diferentes. A concentração de LIP citosólico medida com o indicador calceína indica que LIP esteja numa faixa estreita entre décimos de μM a baixos μM (0.1 – 10 μM).¹⁷

Identidade: Alguns grupos de pesquisa acreditam que o ferro lábil seja formado por uma miríade de compostos de coordenação com ligantes de baixa massa molecular (fosfatos de Inositol, glutationa, citrato, e ácido 2,5-dihidroxibenzóico). Essa hipótese talvez seja baseada na abundância intracelular e basicidade de Lewis desses constituintes, mas é questionável e não encontra suporte experimental concreto ¹⁸. Exceto glutationa, que está presente em elevada concentração em células (entre 2-10 mM), os demais ligantes hipotéticos de LIP ligam-se preferencialmente ao ferro no estado férrico (Fe^{3+}) ¹⁹. Misturas de íons de Fe^{3+} ou Fe^{2+} em solução aquosa com estes ligantes são na verdade constituídas de múltiplas espécies ^{20; 21; 22; 23}, enquanto LIP celular parece ser uma população única e com propriedades químicas definidas ²⁴. Outros grupos sugerem que LIP esteja ligado a proteínas. Estudos recentes sugerem que LIP está ligado a proteínas de ligação a região poli(C) de RNAs 1 e 2 (*Polyr(C)-binding protein 1 e 2*, PCBP1 e PCBP2) e possivelmente, também outros membros dessa família de proteínas ^{25; 26}.

A homeostase do LIP: LIP parece ser a fonte celular sentida por células para acionar os mecanismos homeostáticos de ferro discutidos brevemente acima. Portanto, LIP é mantido por um complexo e altamente regulado processo de sensibilização e transdução dos níveis de ferro (extra)celular, e.g. modulando cascatas de sinalização que desencadeiam processos para aumentar ou diminuir a concentração de LIP. No primeiro caso, o sistema homeostático aumenta aquisição de ferro extracelular (aumento da expressão de transferrina-Tf/receptor de transferrina -TFR) e mobilização do ferro intracelular armazenado na ferritina (Ft) (degradação fagocítica controlada).

Estudos mostram que o LIP pode ser modulado negativamente de maneira independente de IRPs, pela ausência de ferro no meio de cultura (*starvation*), superexpressão de ferritina, e desordens mitocondriais que provocam acúmulo de ferro nessa organela ou simplesmente complexação com quelantes. Linhagens de células humanas K562 expostas a crescentes concentrações de transferrina ligada a

ferro (TBI), exibem proporcional aumento nos níveis de ferro lábil, tanto citosólico (LIP) quanto mitocondrial²⁷.

Atualmente podemos dividir os estudos do LIP em três frentes; i) a primeira busca elucidar com quais constituintes celulares o LIP interage e procura responder quais os efeitos dessas interações a nível celular e sistêmico; ii) a segunda procura caracterizar a identidade celular do LIP, que ainda é desconhecida, iii) e por último há estudos que procuram elucidar quais reações (redox) que o LIP está envolvido, incluindo características cinéticas destas reações, assim como suas implicações no ambiente celular.

1.3 O papel do ferro lábil em condições fisiológicas e adversas.

Como discutido acima, LIP é importante na manutenção da homeostase de ferro. Estudos mostram que a manipulação da concentração intracelular de LIP por quelantes ativa mecanismos de sinalização envolvendo IRPs que visam a regulação e o reestabelecimento dos níveis normais de LIP. Portanto, existe um consenso de que as células precisam de LIP e mantem seu nível celular via ação complementar e orquestrada de IRPs. A atual concepção é que LIP é necessário para rápida incorporação de Ferro em ferro-proteínas nascentes^{28; 29; 30}.

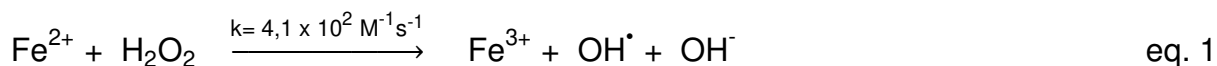
Como qualquer classe de Fe(II), LIP reage com ligantes. Talvez a reação de LIP mais importante seja com óxido nítrico (NO[•]). Estudos relativamente recentes mostram que LIP reage quantitativamente com óxido nítrico (NO[•]) formando complexos dinitrosilo de ferro (*dinitrosyl iron complexes*, DNICs). DNICs são complexos de ferro(II) (LIP) formados a partir de ligantes de baixo peso molecular contendo tióis (glutathiona³¹ e cisteína³²) ou proteínas tiólicas. DNIC celular contém dois ligantes nitrosilo e dois ligantes ainda desconhecidos e são paramagnéticos, podendo ser identificados e quantificados pelo seu característico sinal de ressonância paramagnética de elétrons (RPE). DNIC celulares são de alta massa molecular, possivelmente ligado a proteínas^{33; 34; 35; 36; 37}, sugerindo que LIP pode estar ligado diretamente a proteínas ou mesmo ser de constituição proteica. DNIC são estáveis e acumulam em células cronicamente expostas a NO[•] até tornarem-se os derivados de

NO[•] mais abundantes, mesmo comparado com s-nitrosotióis. São encontrados em células, tecidos e in vivo e podem ter diferentes propriedades de importância fisiológica e farmacológica: i) DNIC tem sido considerados reservas de NO[•]; ii) podem estar envolvidos na formação de s-nitrosoproteínas por um mecanismo conhecido como trans-nitrosação. Assim, pode ter papel de destaque e iniciador de processos de sinalização celular via s-nitrosação de proteínas; iii) A formação de DNIC inibe a suposta reação entre LIP e H₂O₂ que produz oxidantes fortes, portanto, pode ter papel anti oxidante. Vários estudos indicam diversas funções biológicas. Por exemplo, DNICs podem inibir a agregação plaquetária ³⁸, induzir a vasodilatação ³⁹ e acelerar processos de cicatrização de feridas ⁴⁰.

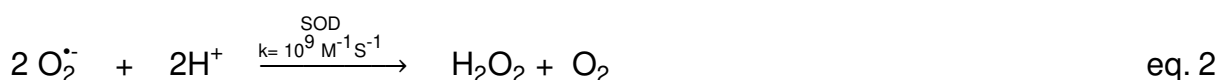
O LIP aliado às novas drogas também pode ajudar no combate ao câncer promovendo a morte de células cancerígenas pelo processo de ferroptose ⁴¹. É conhecido que alguns tipos de células primárias cancerígenas (câncer de mama CD44/CD24 e glioblastomas) apresentam níveis elevados de ferro intracelular e atividade aumentada de moléculas que controlam (aumentam) a disponibilidade de ferro, algo que parece ser compartilhado por outras patologias ^{42; 43; 44}. Os mecanismos da ferroptose vem sendo estudados como uma nova estratégia terapêutica anticâncer utilizando drogas que ativam fenótipos desse tipo de morte celular ⁴⁵. Yang, W.S. e Yagoda et. al. mostraram que a partir da modulação nos níveis de ferro lábil celular utilizando quelantes ou a inibição genética da captura de ferro celular, é possível diminuir ou mesmo inibir a morte celular induzida por drogas anticâncer. A morte celular por essas drogas tem características semelhantes a aquele conferido a ferroptose ^{46; 47}, ou seja, o LIP pode se tornar um importante aliado terapêutico no combate ao câncer. Ainda, estudos mostram que o aporte descontrolado de ferro no ambiente celular está relacionado a diversos processos patológicos humanos, como processos inflamatórios, doenças neurodegenerativas (Parkinson, Huntington, Alzheimer, entre outras), câncer e envelhecimento precoce⁴⁸ e também a resposta a tratamentos com fármacos.

1.3.1 Peróxido de Hidrogênio e LIP: combinação pró-oxidante

A reação entre LIP e H₂O₂ supracitada é bem conhecida como reação de Fenton (equação 1)^{49; 50}.



Nessa reação há produção do radical hidroxila (OH[•]) catalisada por Fe²⁺ a partir de peróxido de hidrogênio. O radical hidroxila é uma espécie reativa de oxigênio (ERO) (*reactive oxygen species*, ROS) que reage rapidamente ($k > 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) com quase todo tipo de composto orgânico, levando ao rompimento de ligações químicas, oxidação, hidroxilação e formação de radicais derivados de tais compostos orgânicos^{19; 51}. A formação de radical hidroxila ocorre por processos naturais, no meio ambiente (foto-fenton atmosférico e em águas naturais) e em células (patologias e metabolismo) ou por atividade humana em condições controladas (laboratório/indústria)⁵². No caso da formação em células, LIP é frequentemente associado a fonte celular de ferro da equação 1. A formação do radical hidroxila em células acontece e não podemos evitar. Células em geral naturalmente produzem peróxido de hidrogênio pela dismutação catalisada do ânion radical superóxido (O₂^{•-}) por superóxido dismutase de manganês (Mn-SOD) na mitocôndria ou superóxido dismutase de cobre e zinco (CuZn-SOD) no citosol com constantes cinéticas elevadas ($\sim 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (equação 2). Superóxido por sua vez é formado continuamente pela redução parcial de oxigênio molecular na cadeia respiratória mitocondrial, mais precisamente pelos complexos I e III, portanto, está intrinsecamente relacionado a respiração celular e é inevitável. Estima-se que pelo menos 1% do O₂ disponível seja reduzido a O₂^{•-} nas mitocôndrias⁵³.



A reatividade dessa classe de ferro já foi amplamente estudada com relação ao estresse oxidativo promovido por H₂O₂. Vários estudos sugerem que há uma conexão entre o LIP, principalmente quando em excesso, e a produção de espécies oxidantes (OH[•]) derivados de H₂O₂ e a danos causados pela oxidação de lipídeos, proteínas e do DNA.

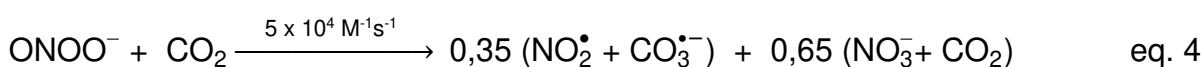
A Ferroptose, um processo de morte celular não-apoptótica e que ainda não é muito bem compreendida, é reconhecidamente dependente de ferro intracelular ⁴²; ⁴⁵. A participação de LIP nesse processo de morte celular também não está clara, mas sugere-se que LIP esteja envolvido na iniciação da cascata de reações radicalares que caracteriza a Ferroptose. Estes radicais produzem danos a estrutura de membranas celulares, constatada pela formação de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) ⁴¹; ⁵⁴. Ainda, estudos relatam a reação de LOOH com Fe²⁺/Fe³⁺ levando a formação de aldeídos e hidroxi- lipídios ⁵⁵.

Diversas propostas aparecem como alternativa para contornar os danos causados pela combinação H₂O₂/LIP, principalmente, em condições em que há uma produção elevada de H₂O₂ (processos inflamatórios). A opção mais investigada é a “remoção” por complexação dessa classe de ferro utilizando quelantes. Para tal, são utilizados quelantes com grande seletividade e afinidade por ferro ⁵⁶ e que alteram o potencial redox do par Fe³⁺/Fe²⁺ de forma que evite a reação redox com H₂O₂. Esse conceito é conhecido como terapia de quelantes. Com isso surgem também questionamentos quanto aos danos colaterais dessa técnica ao promover a “remoção” desse ferro das células, uma vez que LIP é necessário para células e seus níveis são controlados homeostaticamente.

1.3.2 LIP e Peroxinitrito. LIP como agente antioxidante.

Recentemente, nosso grupo mostrou que o LIP reage com um peróxido biologicamente relevante, o peroxinitrito (ONOO⁻). Peroxinitrito é formado em células pela rápida recombinação ($k = 1,9 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)⁵⁷ entre os radicais O₂^{-•} e NO[•], seja este produzido endogenamente (macrófagos, células endoteliais e neuronais) ou de fonte exógena. Peroxinitrito é um oxidante moderado que ataca resíduos de cisteínas de proteínas e metais de transição diretamente⁵⁸. Entretanto, ONOO⁻ sofre homólise de sua ligação peróxido catalisada por protonação ou reação com CO₂, gerando espécies radicalares ainda mais reativas e oxidantes. Em pH fisiológico ele encontra-se em equilíbrio com o ácido peroxinitroso (ONOOH, pKa = 6,9)⁵⁹, o qual sofre quebra homolítica da ligação O-O produzindo 1/3 de dióxido de nitrogênio (NO₂[•]) e •OH (equação 3). Peroxinitrito também reage com dióxido de carbono (CO₂), formando o

intermediário peroxinitrosocarbonato (ONOOCO_2^-), o qual também se decompõe muito rapidamente por quebra homolítica gerando até 1/3 de ânion radical carbonato ($\text{CO}_3^{\bullet-}$) e NO_2^\bullet , os outros 2/3 são nitrato e dióxido de carbono produzidos pelo rearranjo seguido de quebra do intermediário ONOOCO_2^- (equação 4)^{60; 61; 62; 63; 64}. Suspeita-se que esse seja o mecanismo principal de decomposição de peroxinitrito devido as elevadas concentrações de $\text{CO}_2:\text{HCO}_3^-$ (1 : 25 mM) na maioria dos sistemas biológicos¹⁹.

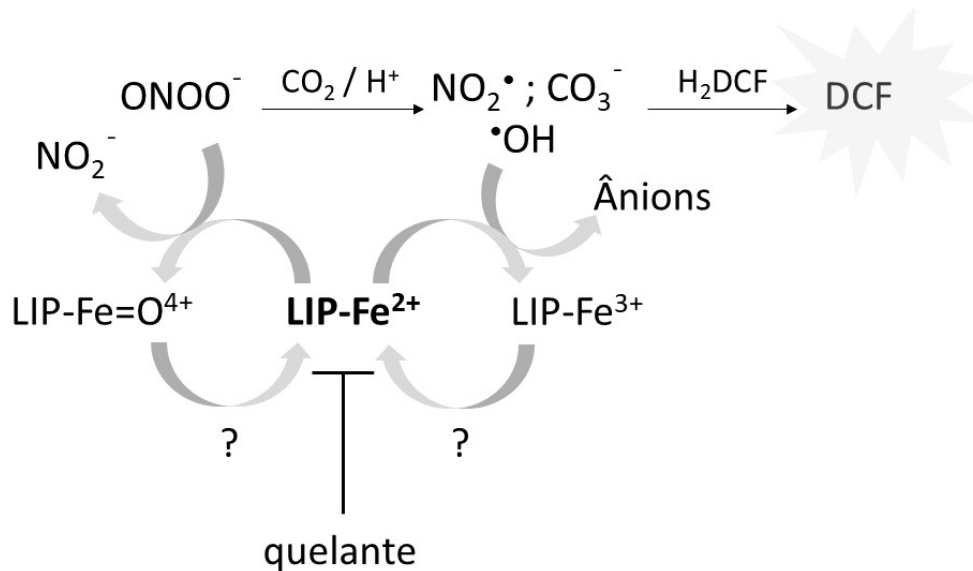


No estudo realizado pelo grupo de pesquisa mostramos que o ferro lábil diminui a oxidação intracelular dependente de peroxinitrito⁶⁵ em clones de macrófagos de rato (Células RAW 264,7) em suspensão. Experimentalmente, quelantes metálicos que reconhecidamente complexam LIP [salicilaldeído isonicotinoil hidrazona (SIH) (*Salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone*, SIH); e 2',2'-bipiridina, Bipy] aumentam a oxidação do indicador fluorescente intracelular 2,7-diclorodihidrofluoresceína (H_2DCF)⁶⁵. Esses resultados foram interpretados como uma reação entre LIP e peroxinitrito ou entre LIP e os radicais derivados de peroxinitrito e que resultam em produtos não-oxidantes. Isto é, LIP atua como uma espécie celular natural e antioxidante contra peroxinitrito. LIP possivelmente contribui para a diminuição, da disponibilidade biológica de peroxinitrito ou seus radicais e de danos celulares associados à formação dessas espécies que podem ocasionar diversas patologias humanas, dentre as quais, doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, processos inflamatórios e outras decorrentes de danos ao DNA^{60; 66}.

Esta descoberta representa uma mudança de paradigma das propriedades de LIP e levanta várias questões sobre a interação entre LIP e peroxinitrito. Quimicamente, não está claro se LIP reage diretamente com peroxinitrito ou com os oxidantes radiculares derivados de peroxinitrito (Figura 4). Tampouco se estas reações são rápidas o suficiente para competir com outros alvos celulares destes oxidantes ou se os processos são estequiométricos ou catalíticos. Em âmbito mais geral, propriedades termodinâmicas dos complexos celulares de LIP não são conhecidos. Isto é, não se sabe bem sua localização intracelular, sua concentração,

seus ligantes, e constante de equilíbrio de LIP e seus ligantes celulares. Algumas dessas incertezas são investigadas nesse trabalho.

Figura 4 – Esquema das possíveis reações de ferro lábil (LIP) com peroxinitrito e seus derivados radiculares.



Uma vez formado peroxinitrito se decompõe por quebra homolítica da ligação peróxido catalisada por conjugação com CO_2 ou protonação, dando origem a derivados radiculares que podem ser detectados com o indicador fluorescente H_2DCF . Peroxinitrito reage com LIP-Fe^{2+} produzindo nitrito e LIP-Fe=O^{4+} (especulativo). Os radicais derivados de peroxinitrito reagem com LIP-Fe^{2+} formando seus respectivos ânions e LIP-Fe^{3+} (especulativo). Ambas formas oxidadas de LIP retornariam ao estado de oxidação ferroso (LIP-Fe^{2+}) por mecanismo desconhecido. A adição de quelantes metálicos (SIH ou Bipy) inibe as reações de LIP-Fe^{2+} com peroxinitrito ou radicais derivados de peroxinitrito. Fonte: Próprio autor.

2. Objetivos e justificativa

Objetivo Geral

Investigar propriedades termodinâmicas de LIP e a reatividade de LIP com peroxinitrito.

Objetivos Específicos

- 1) Investigar se LIP reage com peroxinitrito diretamente (braço esquerdo, figura 3) ou com radicais oxidantes derivados da decomposição de peroxinitrito (braço direito, figura 3). LIP ferroso pode reagir diretamente com peroxinitrito possivelmente produzindo íons NO_2^- . Por outro lado, LIP ferroso pode reagir e reduzir os radicais derivados de peroxinitrito. A inibição dessas reações por quelantes de LIP poderia aumentar a disponibilidade de peroxinitrito e seus derivados oxidantes e assim a oxidação de indicadores fluorescentes oxidáveis. Experimentos preliminares sugerem que LIP reage diretamente com peroxinitrito.
- 2) Estimar propriedades cinéticas da interação do peroxinitrito com o LIP.
- 3) Estimar a concentração e propriedades termodinâmicas dos complexos de LIP em células.

3. Materiais e métodos

3.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados neste estudo foram adquiridos no seu maior teor de pureza e são da marca Sigma-Aldrich, exceto quando especificado, e foram usados seguindo a recomendação do fabricante.

Salicilaldeído isonicotinoil hidrazona (SIH) é sintetizado no nosso laboratório a partir da reação de condensação entre as bases de Schiff 2-hidroxibenzaldeído e hidrazida isonicotínica como descrito na literatura⁶⁷. A solução estoque de SIH foi preparada imediatamente antes do experimento em concentrações típicas de 0,0125 ou 0,15 mol L⁻¹ em dimetil sulfóxido (DMSO).

O tampão de trabalho empregado no estudo foi o fosfato salino (PBS/DTPA) pH 7,4 que apresenta composição em mmol L⁻¹ a seguir: Fosfato: 10 mmol L⁻¹, NaCl: 137 mmol L⁻¹, KCl: 2,7 mmol L⁻¹, DTPA (ácido etilenotriamino penta acético): 0,1 mmol L⁻¹.

3.2 Cultura de células

Foram utilizados no estudo células derivadas de macrófagos de rato do tipo RAW 264,7 adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC) e cultivadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) conforme recomendação. Os estoques criogênicos de passagens 4 e/ou 6 foram mantidos em freezer -80°C. As culturas celulares foram feitas em frascos de 175 cm² em incubadora umidificada, a 37°C e com atmosfera de CO₂ de 5% até atingirem confluência entre 80-90%. Para a coleta de células foi utilizado tampão fosfato salino (PBS) suplementado com 250 µM de DTPA. Após a coleta foi realizado a contagem de células por hemocitometria utilizando uma câmara de Neubauer e a verificação da viabilidade celular usando o método da exclusão com azul de tripano. Os experimentos foram realizados com culturas celulares que apresentaram viabilidade superior a 85%. Após a contagem as células foram mantidas suspensas em meio de cultura e em banho de gelo até utilização.

3.3 Tratamento das células com 2,7dicloro dihidro fluoresceína diacetato (H₂DCF-DA)

Suspensões de 60 milhões de células RAW 264,7 em 1mL de tampão de trabalho, foram tratadas com H₂DCF-DA 10 µM por 30 minutos em banho a 37°C sob agitação. Em seguida, as células foram lavadas por dois ciclos de suspensão e centrifugação com tampão para a remoção do excesso de H₂DCF-DA extracelular. As células foram utilizadas em experimentos imediatamente após essa lavagem, exceto quando citado no corpo do texto. Uma vez no citoplasma das células, os grupos diacetatos (DA) do H₂DCF-DA são clivados por enzimas esterases, formando o composto H₂DCF, que apresenta pouca fluorescência nas condições empregadas. O H₂DCF não é permeável a membrana plasmática acumulando-se no interior celular.

3.4 Fluorescência das amostras de células tratadas com H₂DCF-DA

Os experimentos de fluorescência foram conduzidos em leitora de placas Molecular Device SpectraMax i3x. As células RAW 264,7 tratadas com H₂DCF-DA e centrifugadas para a remoção do excesso extracelular do indicador foram transferidas para placas de fluorescência de 96 poços a 3 x 10⁶ células por poço (volume total de 250 µL/poço). Os demais reagentes foram adicionados em pequenos volumes, tipicamente 2 – 5 µL, para evitar o aumento do volume de trabalho e a exposição das células a grandes quantidades de solventes orgânicos quando utilizados. Os parâmetros de aquisição utilizados foram os seguintes: os comprimentos de onda de excitação e emissão em 498 e 523 nm, respectivamente, e aberturas de fenda de excitação e emissão de 9 e 15 nm, respectivamente. Toda a aquisição de dados foi realizada em temperatura constante a 37°C (circulação de ar interna controlada pelo equipamento) e em sala climatizada. Os dados foram adquiridos a cada intervalo regular que variaram de 30s a 1 minuto e com tempo total de duração de cada experimento de cerca de 60-70 minutos.

3.5 Tratamento das células com calceína-AM (CA-AM)

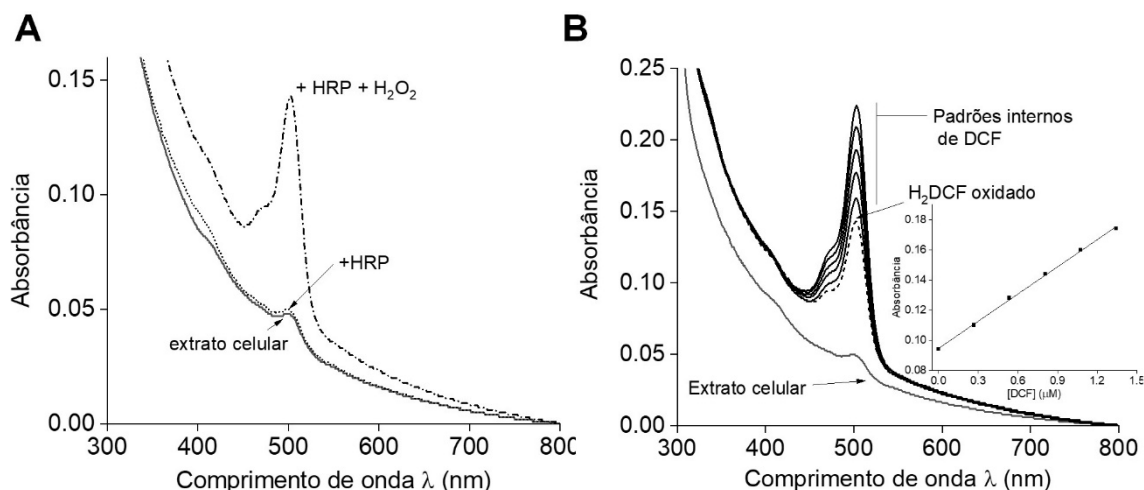
Suspensões de células RAW 264,7 em tampão de trabalho (45×10^6 células / mL) foram tratadas com Calceína derivatizada com grupo aceto-metoxi (CA-AM) (0,1 – 3 μM) em constante agitação a 37°C por 20 minutos. Após o tratamento, estas células foram lavadas para remoção da CA-AM extracelular com dois ciclos de centrifugação e resuspensão no tampão de trabalho, e por fim, mantidas em suspensão em banho de gelo até o experimento ser realizado. Uma vez no citoplasma das células, os grupos aceto-metoxi da CA-AM são clivados por enzimas esterases, formando o composto fluorescente calceína (CA). A Calceína não é permeável a membrana plasmática acumulando-se no interior celular.

3.6 Determinação da concentração de H_2DCF e da sua forma oxidada DCF em células RAW 264,7

3.6.1 Quantificação de H_2DCF após tratamento das células com $\text{H}_2\text{DCF-DA}$

Uma suspensão de células RAW 264,7 (60×10^6 células/mL) em tampão PBS/DTPA foram tratadas com $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ (30 μM) como descrito no item 3.3. Após a lavagem as células foram lisadas em um sonicador do tipo ponteira com três ciclos de 20 segundos com intervalos de 20 segundos entre ciclos, em seguida, foram centrifugadas a $20000g$ por 15 minutos para sedimentação da fração insolúvel do lisado celular. O sobrenadante (cerca de 3 mL) foi mantido em banho de gelo para posterior quantificação do H_2DCF . Em seguida, uma alíquota de 200 μL do sobrenadante foi diluída no tampão de trabalho (volume final de 1 mL) e o espectro de absorção visível desta solução foi medido em um espectrofotômetro (Shimadzo UV-VIS 1800). Houve baixa absorção na região de 502 nm (Figura 5A, extrato celular), indicando baixa formação do composto DCF após tratamento e lise celular. A adição de HRP (*horse radish peroxidase*) apenas, não eleva a absorção em 502nm (espectro +HRP). A completa oxidação do H_2DCF foi realizada com a adição sucessiva de três alíquotas de H_2O_2 (2 μM), evidenciado pelo aumento da absorção em 502 nm (espectro +HRP + H_2O_2) característico do DCF logo na primeira adição de H_2O_2 . As demais adições não resultaram em aumento da absorção, indicando oxidação quantitativa do H_2DCF .

Figura 5 – Quantificação de H_2DCF intracelular.



A) Espectros de absorção antes e depois da oxidação do H₂DCF. B) Adição de padrão interno DCF na amostra de H₂DCF oxidado. Uma solução de padrão de DCF (0,27 μ M) foi sucessivamente adicionada à solução de H₂DCF oxidado. Fonte: Produção do próprio autor.

A concentração de DCF na solução resultante foi determinada por dois métodos: i) pela equação de Lambert-beer e a diferença das absorbâncias em 502 nm dos espectros final (espectro +HRP +H₂O₂) e inicial (espectro +HRP); ii) utilizando uma curva de padrão interno de DCF (Figura 5B e inserção) e assumindo que todo o H₂DCF foi oxidado a DCF. A concentração total de DCF e por conseguinte H₂DCF em solução foi a mesma pelos dois métodos, cerca de 1,6 μ M. A concentração intracelular de H₂DCF foi determinada em cerca de 400 μ M pela conversão a seguir: [H₂DCF] (solução) \times V_e (volume total no experimento) / V_c (volume celular total que correspondem aos 200 μ L de amostra inicialmente utilizados). Para estes cálculos foi considerado um diâmetro para as células RAW 264,7 de 7 μ m.

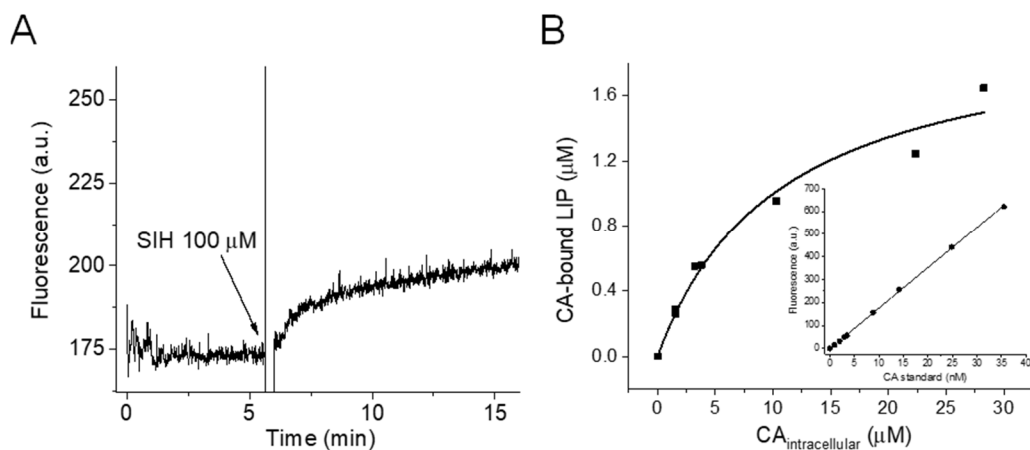
3.6.2 Quantificação de DCF acumulado em células RAW 264,7 após exposição a fluxo de peroxinitrito utilizando paraquat e doador de NO[•] (PQ/NO[•]).

Foi estimada a concentração de DCF formado em células RAW 264,7 tratadas com H₂DCF-DA após exposição a peroxinitrito pela adição de Paraquat e doador de NO[•] durante 60 minutos em condições idênticas à da Figura 9. Os experimentos foram conduzidos em placas de 96 poços como descrito no experimento da Figura 9, utilizando como controle células RAW 264,7 sem tratamento com o indicador fluorescente H₂DCF-DA expostas a crescentes concentrações do padrão de DCF. Decorrido os 60 minutos de exposição, foi traçada uma curva padrão com os valores de fluorescência do padrão de DCF, e a partir desta curva foi possível estimar a

concentração de DCF em solução nas amostras, tanto na presença quanto ausência do quelante SIH. Utilizando-se da mesma estratégia de conversão de concentração descrita no subitem acima, determinamos que a concentração de DCF acumulado no final de 60 minutos na ausência e presença do SIH é de 30 e 50 μM , respectivamente.

3.7 Determinação da concentração de ferro lábil (LIP) em RAW 264,7.

Uma suspensão de células RAW 264,7 tratadas com Calceína-AM (0,25, 0,50, 1,0, 2,0 e 3,0 μM), como descrito no item 2.5, foi diluída no tampão de trabalho (15×10^6 células/ 3 mL, 37°C), transferida para uma cubeta e colocada em um fluorímetro convencional (sob agitação com barra magnética e temperatura constante de 37°C do alojamento da cubeta, controlado por um banho termostaticado com refrigeração e circulação) e iniciada a aquisição dos dados de fluorescência. Após um breve tempo (3 minutos), o sinal de fluorescência de CA ficou constante. Essa fluorescência inicial é proporcional a concentração de CA livre intracelular (Figura 6A). Em seguida, foi adicionado o SIH (100 μM), quelante que apresenta alta afinidade para ferro e permeabilidade a membrana plasmática. A adição do quelante resultou em aumento de fluorescência devido a liberação de CA que estava ligada ao LIP (CA-LIP) imediatamente antes da adição do quelante. A diferença do sinal de fluorescência (ΔF , final – inicial) é proporcional a concentração de CA-LIP. As concentrações de CA livre e CA-LIP foram determinadas usando uma curva analítica padrão (fluorescência x [calceína]) (Figura 6B, inserto) construída em uma suspensão de células controle (sem tratamento com CA-AM) na presença de SIH.



A) Fluorescência de células RAW 264,7 tratadas com Calceína-AM (CA-AM) e expostas a SIH. Suspensão de células (15×10^6 células / 3mL) tratadas com CA-AM (0,25; 0,5; 1,0; 2,0 e 3,0 μM) a 37°C por 20 minutos. Após estabilização da fluorescência foi adicionado o quelante SIH (100 μM). Condições experimentais: Tampão PBS/DTPA, pH 7,4, 37°C , $\lambda_{\text{exc}} = 498 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 516\text{nm}$, fendas de excitação e emissão de 3nm em um espectrofluorímetro convencional (Shimadzu RF-5301pc). B) Concentração intracelular de calceína ligada a LIP (CA-LIP) em função da concentração de calceína livre (CA ou CA_{livre}) calculados como descrito no item 3.6.1. A concentração de LIP foi assumida com sendo a concentração limite máximo de CA-LIP, o valor foi calculado ajustando os dados com uma equação hiperbólica usando o software Origin 2019 (v. Acadêmico), Origin Lab Corporation, Northampton, MA, USA. As concentrações de CA e CA-LIP foram determinadas a partir de uma curva padrão de CA (Figura 5B, inserto) em suspensões celulares não tratadas com CA-AM e na presença de SIH (100 μM). Fonte: próprio autor.

4. Resultados e discussão

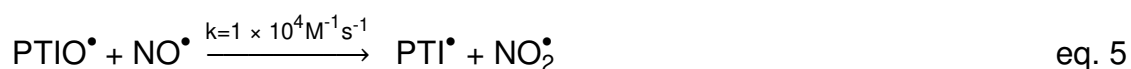
4.1 Capítulo I: Ferro lábil – LIP reage diretamente, rapidamente e cataliticamente com peroxinitrito.

Em estudo publicado anteriormente pelo grupo de pesquisa, foi constatado que a manipulação da concentração de LIP no modelo celular RAW 264,7, utilizando quelantes metálicos permeáveis a membrana celular, e.g. Salicilaldeído isonicotinoil hidrazona, SIH ou 2,2'-bipiridina, Bipy, altera consideravelmente a disponibilidade de espécies reativas derivadas de peroxinitrito no meio intracelular.⁶⁵ As observações foram possíveis utilizando indicadores fluorescentes intracelulares sensíveis a espécies reativas de oxigênio (ERO, do inglês ROS) e nitrogênio (*reactive nitrogen species*, RNS). Sucintamente, em células desafiadas com fluxos de peroxinitrito, a remoção do LIP por um quelante (SIH ou Bipy) leva a uma maior nitroação/oxidação de indicadores fluorescentes. Deste trabalho, pôde-se concluir que LIP diminui a oxidação dependente de peroxinitrito em células. Essa observação sugere que LIP pode exercer papel anti oxidante contra peroxinitrito ou seus derivados, contrastando frontalmente com seu papel na reação com H₂O₂. Se por um lado essa observação mudou a concepção pró-oxidante tradicional de LIP, por outro levantou uma série de questões e dúvidas não resolvidas. LIP reage diretamente com peroxinitrito, produzindo espécies não oxidantes? LIP reage com radicais derivados de peroxinitrito? A reação de LIP com peroxinitrito ou seus derivados oxidantes é rápida? Será uma reação catalítica ou estequiométrica? Essas são questões importantes para definir se essa reação é relevante biologicamente.

Para responder a primeira questão, foi pensado um modelo de radical oxidante representativo dos radicais derivados de peroxinitrito e que permitiria sua manipulação no meio intracelular. A escolha baseou-se nos prós e contras relativos à produção/entrega deste radical no meio (intra)celular, reatividade no ambiente celular, detecção com indicadores fluorescentes de oxidação e confiabilidade nos resultados obtidos. O radical escolhido foi o dióxido de nitrogênio (NO₂[•]) devido, principalmente, à possibilidade de geração de fluxos deste radical nas nossas condições experimentais e ter reatividade menos indiscriminada do que os outros radicais derivados de peroxinitrito como [•]OH e CO₃^{•-}. Dessa forma, seria possível investigar se LIP reage com NO₂[•] em experimentos paralelos na ausência e na presença de quelante usando H₂DCF como indicador oxidável.

4.1.1 Modelo de geração de fluxos do radical NO₂[•]

O modelo de geração de NO₂[•] adotado foi descrito inicialmente por Akaike et al.⁶⁸, adaptado às nossas condições experimentais e detalhado abaixo. O modelo baseia-se na oxidação de NO[•] a NO₂[•] por compostos do tipo nitronil nitróxidos, gerando como sub-produto imino nitróxidos, este último inerte ao modelo experimental (equação 5).

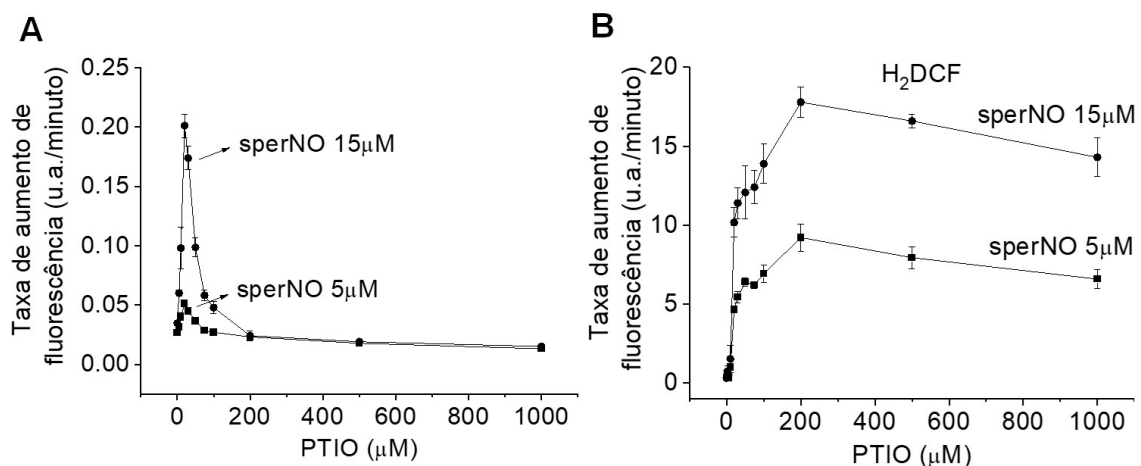


O composto utilizado para essa finalidade foi o 2-fenil-4,4,5,5,-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido (PTIO). A estequiometria da reação entre PTIO e NO[•] é de 1:1 (equação 5). Para garantir oxidação quantitativa de NO[•] a NO₂[•] inicialmente foi realizado um estudo de oxidação de H₂DCF e nitrosilação de DAF2 intracelulares com crescentes concentrações de PTIO. Essa abordagem é importante para otimizar a concentração de PTIO desejável para o estudo da reação entre LIP e NO₂[•]. O uso de DAF2 foi particularmente importante para esse objetivo inicial. Espey et al.⁶⁹ mostraram que a formação do composto fluorescente DAFT ocorre por um processo radicalar de duas etapas conhecido como nitrosilação oxidativa. Na primeira etapa há a oxidação do indicador ao radical DAF2[•] por NO₂[•] (equação 6) que, em seguida, recombina-se com NO[•] rapidamente produzindo água e o produto triazol fluorescente DAFT (equação 7). Consistentemente com esse mecanismo, baixas concentrações de PTIO aceleram a nitrosilação de DAF2 a DAFT devido aumento da produção de NO₂[•] (equação 5) necessário para reação 6, mas deixando suficiente NO[•] para que a segunda etapa aconteça (equação 7). Por outro lado, elevadas concentrações de PTIO diminui a formação de DAFT porque esgota o NO[•] necessário para a reação 7. Para nosso propósito, essa é a situação desejável, onde teríamos um fluxo de NO₂[•] praticamente livre de NO[•].



Os resultados celulares de nitrosilação do DAF2 foram consistentes com a interpretação descrita acima (Figura 7A). De fato, a taxa² de nitrosilação de DAF2 intracelular aumenta inicialmente e depois diminui até níveis de controle (ausência de NO[•]) acima de 200 μ M de PTIO, mostrando que uma concentração de PTIO igual ou superior a 200 μ M é suficiente para garantir fluxo contínuo de NO₂[•] livre de NO[•], (Figura 7A). Por outro lado, a taxa com que H₂DCF é oxidado aumenta e alcança um patamar máximo (Figura 7B) praticamente na mesma faixa de concentração de PTIO necessária para trazer a nitrosilação de DAF2 para níveis de controle. Isso é esperado porque a oxidação de H₂DCF por NO₂[•] é processo de uma única etapa que não envolve NO[•]. Assim, a taxa de oxidação de H₂DCF aumenta com crescentes concentrações de PTIO até que o ponto onde praticamente todo NO[•] é oxidado para NO₂[•]. A concentração mínima de PTIO na qual a nitrosilação de DAF2 é mínima e a oxidação de H₂DCF é máxima coincide para diferentes concentrações de doador de NO[•] (Sper/NO) utilizadas. Ainda, com base nos perfis das curvas obtidas com DAF2 e H₂DCF podemos argumentar que fomos capazes de produzir diferentes fluxos de NO₂[•] apenas alterando a concentração inicial do doador de NO[•] mantendo constante a concentração de PTIO (Figuras 7A e 7B).

Figura 7 – Estudo da nitrosilação de DAF2 e oxidação de H₂DCF por NO₂[•] dependente de PTIO.



A) Taxa de nitrosilação de DAF2 intracelular. **B)** Taxa de oxidação de H₂DCF intracelular. Uma suspensão de células RAW 264,7 ($1,2 \times 10^7$ células/mL) previamente tratadas com DAF2 (A) ou H₂DCF (B) foram transferidas para uma placa de 96 poços. Em seguida foram expostas a uma combinação de Sper/NO (5 ou 15 μ M) e concentrações crescentes de PTIO (indicados na figura). As medidas de fluorescência foram iniciadas imediatamente após a adição de

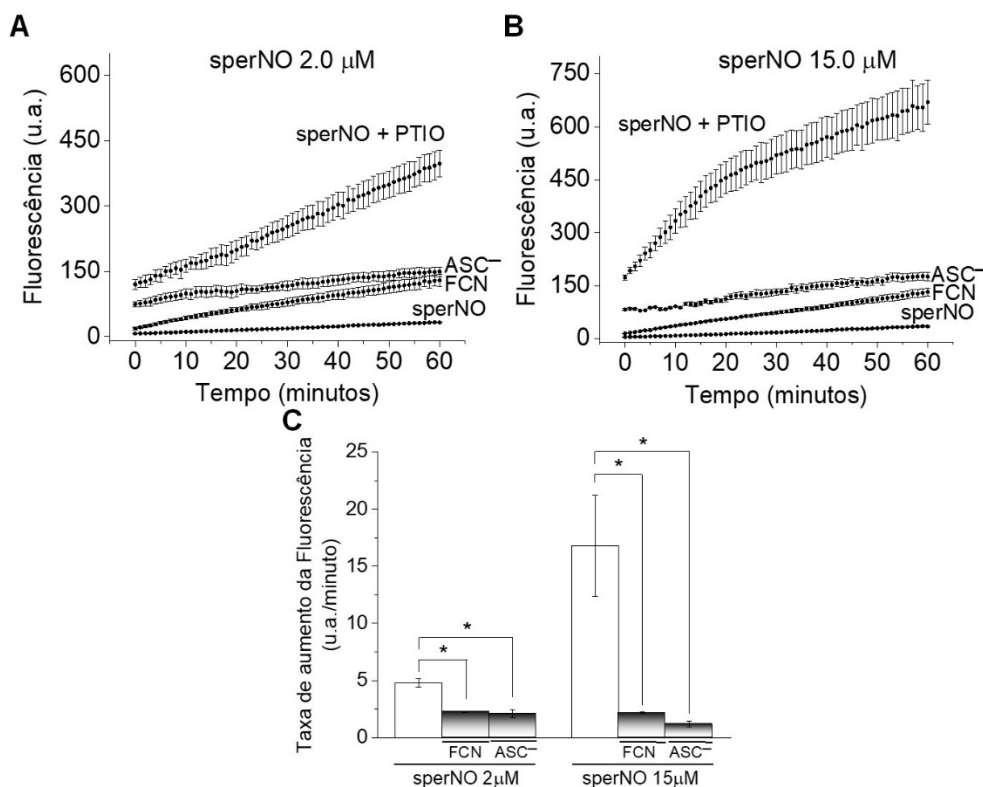
² O termo taxa ou taxa de aumento de fluorescência de DAFT, DCF ou COH foi determinado pela análise da regressão linear das curvas de dados de fluorescência (inclinação da curva).

Sper/NO e realizadas a cada minuto por cerca de 60 minutos. Os valores de taxa foram determinados como sendo a inclinação da curva de fluorescência nos primeiros 10 minutos de análise. Condições experimentais: tampão de trabalho PBS/DTPA, pH 7,4, 37°C; H₂DCF: $\lambda_{ex} = 498$, $\lambda_{em} = 516$ nm; DAF2: $\lambda_{ex} = 495$, $\lambda_{em} = 520$ nm. Os dados representam a média de 4 experimentos independentes \pm DP. Fonte: próprio autor.

4.1.2 Oxidação do H₂DCF dependente de NO₂[•] no modelo hipotético de reação LIP/radical

Para confirmar que a oxidação do indicador H₂DCF em células RAW 264.7 era dependente de NO₂[•] descritas acima, foram realizados experimentos de oxidação de H₂DCF nas condições experimentais (doador de NO[•] + PTIO) na presença os redutores (scavengers) de NO₂[•] ascobato (ASC⁻) e hexacianoferrato (FCN). Ambos reagem com NO₂[•] com elevadas constantes de velocidade de $3 - 6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e $3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente ^{70; 71}. Na presença desses dois redutores, a oxidação de H₂DCF diminui consideravelmente para as duas condições de fluxos de NO₂[•] testadas (Figura 8A e 8B).

Figura 8 – Perfis de oxidação do H₂DCF intracelular por fluxos de dióxido de nitrogênio na presença de ASC⁻ ou FCN.



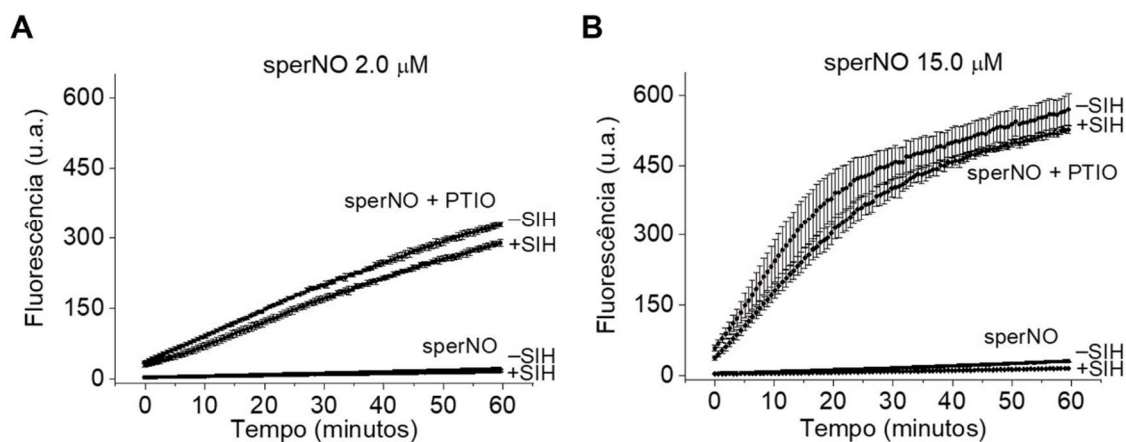
Oxidação de H₂DCF intracelular por dióxido de nitrogênio gerado pela combinação de PTIO (250 µM) e Sper/NO **(A)** 2,0 µM ou **(B)** 15,0 µM na presença ou não dos removedores de NO₂[•] Ascorbato (ASC⁻) ou Hexacianoferrato de potássio (II) (100 µM). **(C)** Taxa de oxidação do H₂DCF intracelular mostrados em (A) e (B). Condições experimentais: tampão de trabalho PBS/DTPA, em pH 7,4, a 37°C com os seguintes parâmetros de aquisição de fluorescência; λ_{ex} = 498, λ_{em} = 523 nm, abertura de fendas de excitação e emissão de 9 e 15 nm, respectivamente. Os dados representam a média de 3 experimentos individuais ± DP. Fonte: próprio autor.

4.1.3 LIP possivelmente não interage com radicais.

Para testar a hipótese de que LIP reage com radicais derivados de peroxinitrito, suspensões de células RAW 264,7 previamente tratadas com o indicador fluorescente H₂DCF-DA na presença de PTIO foram expostas a fluxos de NO₂[•] (vide Materiais e métodos) na ausência e presença do quelante SIH. Foram utilizadas duas condições de fluxo de NO₂[•], variando concentração do doador de NO[•] (SperNO). Ficou nítido no experimento que na ausência de PTIO a oxidação do H₂DCF é discreta, mostrando que a produção de NO₂[•] aumenta significativamente na presença de PTIO e doador de NO[•] (Figura 9, curvas designadas como SperNO). Isso sugere também que a produção de NO₂[•] via oxidação de NO[•] por O₂ é pequena nas condições do estudo. Mais importante, os resultados mostram que SIH não afeta a velocidade de oxidação do indicador fluorescente H₂DCF de forma significativa (Figura 9A e 9B). A partir dessa informação é possível inferir que LIP não reage com NO₂[•]. Nessa reação hipotética LIP reduziria NO₂[•] para NO₂⁻, portanto, na presença do quelante a oxidação de H₂DCF promovida por NO[•] e PTIO aumentaria. Pelo contrário, foi observada uma diminuição discreta da taxa de oxidação de H₂DCF na presença SIH, provavelmente devido a um consumo de parte do NO₂[•] por SIH.

Dessa forma, o aumento da taxa de oxidação de H₂DCF observada em células expostas a NO[•] na presença de quelantes provavelmente é devido a uma reação direta de LIP com peroxinitrito. Hipoteticamente, essa reação gera produtos que não oxidam H₂DCF.

Figura 9 – Perfil de oxidação do H₂DCF por fluxos de dióxido de nitrogênio em suspensão celular.



Oxidação de H₂DCF intracelular por NO₂[•]gerado pela combinação de PTIO (250 μM) e Sper/NO **(A)** 2,0 μM ou **(B)** 15,0 μM e na presença de SIH (100 μM). Condições experimentais: tampão de trabalho PBS/DTPA, em pH 7,4, a 37°C com os seguintes parâmetros de aquisição de fluorescência; λ_{ex} = 498, λ_{em} = 523 nm, abertura de fendas de excitação e emissão de 9 e 15 nm, respectivamente. Os dados representam a média de 3 experimentos individuais ± DP. Fonte: próprio autor.

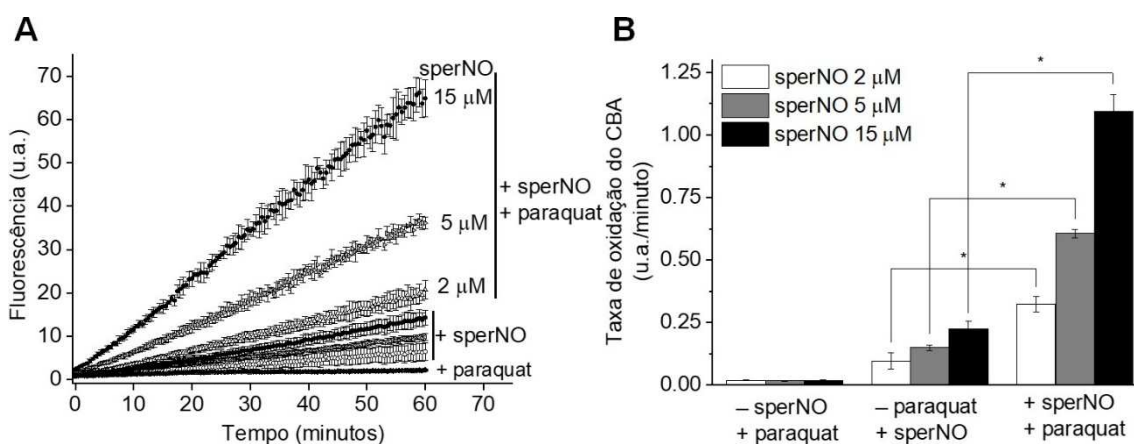
4.1.4 Produção intracelular de peroxinitrito pela combinação de paraquat e doador de NO.

Antes de estudar a hipótese de que LIP reage diretamente com peroxinitrito e as propriedades catalíticas ou estequiométrica dessa reação, primeiramente foi necessário confirmar e otimizar a produção de fluxos de peroxinitrito no sistema celular do estudo. A produção de peroxinitrito intracelular foi gerada a partir da concomitante produção de fluxos de NO[•] e ânion radical superóxido (O₂^{•-}) de acordo com o esquema 1 do artigo (Apêndice B)⁷². Essa estratégia foi utilizada durante todo o estudo para a produção de peroxinitrito em RAW 264,7. Suspensões de células RAW 264,7 em tampão trabalho foram transferidas para placas de múltiplos poços (96 poços). Em seguida, foram adicionados o doador de NO (sper/NO) e o ciclador redox paraquat (PQ), que produz O₂^{•-} cataliticamente sacrificando agentes redutores celulares, notadamente espécies reduzidas de Nicotinamida Adenosina Dinucleotídeo (NADH)⁷³.

A formação de peroxinitrito foi acompanhada em tempo real com o uso de um indicador da classe dos boronatos, o ácido borônico de cumarina (CBA). O CBA reage

preferencialmente com peroxinitrito com constante de velocidade da ordem de $1,1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ produzindo o composto fluorescente 7-hidroxi cumarina (COH). Os resultados na Figura 9 mostram um acúmulo linear do produto COH, indicando uma produção de peroxinitrito pelo tratamento combinado das células com sper/NO e paraquat. A formação de COH foi linear durante uma hora, demonstrando que a produção de peroxinitrito foi constante e que o indicador CBA não foi esgotado no período observacional (Figura 10A). O comportamento foi semelhante para as três concentrações de sper/NO testadas, indicando também que não há esgotamento de O_2^\bullet oriundo de PQ. Como esperado, a taxa de formação de peroxinitrito aumenta com a concentração de sper/NO (Figuras 10A e 10B).

Figura 10 – Formação de peroxinitrito intracelular detectada com CBA em RAW 264,7 na presença de fluxos de NO^\bullet e O_2^\bullet .



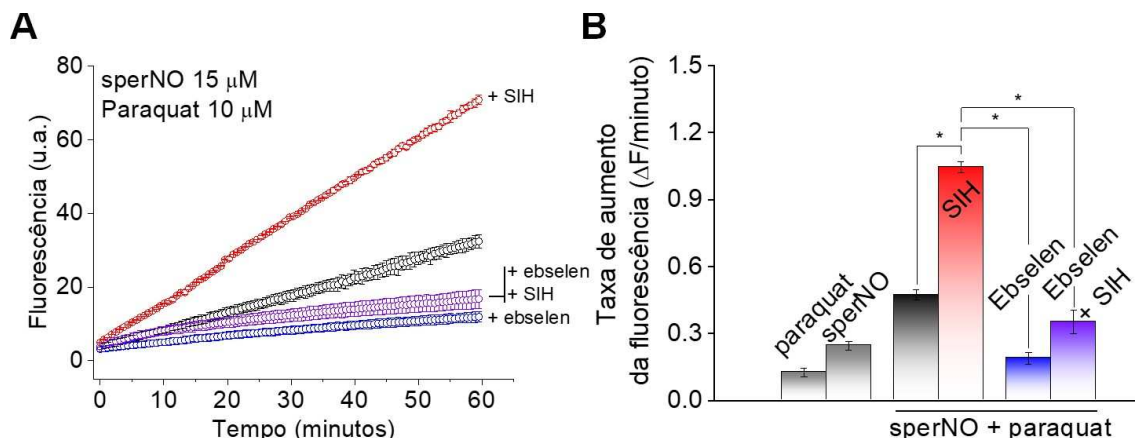
Uma suspensão de células RAW 264,7 foi transferida para uma placa de 96 poços ($1,2 \times 10^7$ células/ mL), em seguida, CBA ($10 \mu\text{M}$), paraquat ($10 \mu\text{M}$) e sper/NO ($2, 5$ ou $15 \mu\text{M}$) foram adicionados na ordem apresentada e individualmente. **(A)** Fluorescência de COH (CBA oxidado) em função do tempo. A aquisição dos dados de fluorescência iniciou-se imediatamente após adição de sper/NO e foi realizada por 60 minutos. **(B)** Taxa de aumento da fluorescência do COH. A taxa foi determinada como sendo a regressão linear dos primeiros 10 minutos das curvas de fluorescência em (A). Os dados representam a média de 4 experimentos individuais \pm DP e são estatisticamente significantes em um intervalo de confiança de 95% relativo a células controle (teste t-student, $p < 0,05$) *. Condições experimentais: tampão de trabalho PBS/DTPA, em pH 7,4, a 37°C com os seguintes parâmetros de aquisição de fluorescência; $\lambda_{\text{ex}} = 332$, $\lambda_{\text{em}} = 456$ nm, abertura de fendas de excitação e emissão de 9 e 15 nm, respectivamente. Fonte: próprio autor.

4.1.5 Efeito da adição do quelante SIH em células expostas a peroxinitrito é atemporal.

Trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa [Damasceno et al. e Lopes, (dissertação)] mostraram que a oxidação do indicador fluorescente H₂DCF ao composto florescente DCF em condições em que há a formação intracelular de peroxinitrito (ONOO⁻/ONOOH) aumentava na presença de quelantes metálicos^{65; 74; 75}. Também foi mostrado que a taxa intracelular em que o DCF é formado permanecia constante durante os ensaios experimentais, mesmo nas condições de maior formação de peroxinitrito. Essa observação sugere que a concentração de LIP não diminuiu consideravelmente no intervalo observacional (aproximadamente 60 minutos). Essa observação sugere que LIP reage com peroxinitrito cataliticamente. Isso é importante pois LIP hipoteticamente poderia atuar como uma peroxinitrito redutase, inibindo a oxidação de alvos biológicos desse oxidante.

A figura 11 abaixo é representativa do que foi observado anteriormente e das diversas vezes em que foi testada no presente trabalho. Como pode ser observado na figura, SIH (curva superior na cor vermelha) aumenta consideravelmente a formação de DCF comparada a condição controle sem SIH (curva sem indicação na cor preta). O redutor de peroxinitrito Ebselen foi utilizado para confirmar que a oxidação de H₂DCF pela combinação de sper/NO e PQ é dependente de peroxinitrito tanto na ausência quanto na presença de SIH. Ebselen reage rapidamente com peroxinitrito produzindo íons nitrito e óxido de ebselen; nenhum é oxidante. Como pode ser observado Ebselen inibe a oxidação de H₂DCF pela combinação sper/NO e PQ nas duas condições, com e sem SIH, curva de cor violeta e azul, respectivamente. Os níveis de oxidação do H₂DCF na presença de Ebselen remete aos níveis da situação controle onde um dos precursores adicionados para a formação de peroxinitrito está ausente (Figura 11B).

Figura 11 – Bloqueio do LIP por quelantes em células RAW 264,7 aumenta a oxidação de H₂DCF dependente de peroxinitrito.



(A) Curvas de fluorescência da formação de DCF dependente de peroxinitrito pela combinação de paraquat e doador de NO^{*} em células RAW 264,7 na presença ou ausência de Ebselen. Células RAW 264,7 tratadas com H₂DCF-DA foram transferidas para uma placa de 96 poços, em seguida, paraquat (10 μ M), SIH (100 μ M) e Ebselen (50 μ M) foram adicionados nesta ordem em poços selecionados. O doador de NO^{*} (sper/NO 15 μ M) foi adicionado imediatamente antes do início da aquisição da fluorescência. **(B)** A taxa de aumento da curva de fluorescência do DCF. Os dados representam a média de 4 experimentos individuais \pm DP e são estatisticamente significantes em um intervalo de confiança de 95% relativo a células controle (teste t-student, $p < 0,05$) *. Condições experimentais: tampão de trabalho PBS/DTPA, em pH 7,4, a 37°C com os seguintes parâmetros de aquisição de fluorescência; $\lambda_{ex} = 332$, $\lambda_{em} = 456$ nm, abertura de fendas de excitação e emissão de 9 e 15 nm, respectivamente. Fonte: próprio autor.

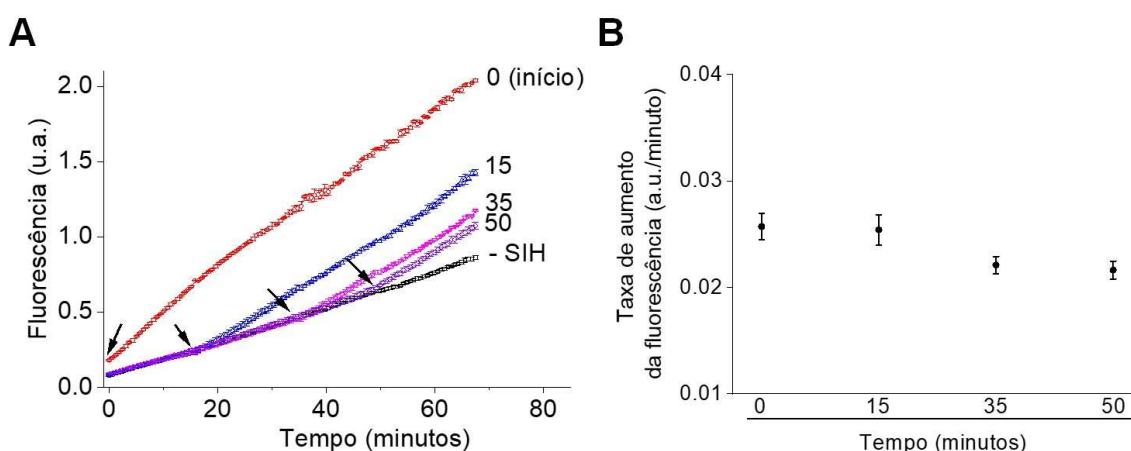
4.1.6 Propriedade catalítica da reação entre peroxinitrito e ferro lábil.

Como mencionado acima, durante os estudos anteriores desenvolvidos no grupo de pesquisa e no atual estudo, não foram observados qualquer mudança da taxa de oxidação do H₂DCF durante o intervalo de tempo observacional de uma hora. Essa observação permitiu considerarmos a possibilidade de que a reação hipotética entre LIP e peroxinitrito seja catalítica.

Com a finalidade de confirmar essa expectativa, os experimentos descritos acima foram realizados novamente e os resultados permitiram extrair um importante parâmetro para a determinação da constante cinética da reação. O experimento foi conduzido da mesma forma que os anteriores, expondo as células RAW 264,7 a um fluxo de peroxinitrito por aproximadamente 60 minutos. No entanto, o quelante SIH foi introduzido em diferentes tempos do ensaio experimental. A Figura 12A mostra a fluorescência, indicativo da formação do composto DCF pelos derivados radicalares

da decomposição do peroxinitrito. As setas indicam o momento em que foi adicionado o quelante SIH, sendo início (tempo 0), 15, 35 e 50 minutos após início da exposição de células a sper/NO e PQ. Tomando os últimos 5 minutos do tempo de exposição para cada condição, foi determinado a taxa com que a fluorescência do DCF aumenta (ou Taxa de aumento da fluorescência), Figura 12B, para cada adição de SIH. Os resultados mostram que os valores de taxa permanecem praticamente inalterados a despeito do momento em que o SIH foi adicionado. Isso sugere que a concentração de LIP que reage com peroxinitrito não diminui nesse intervalo de tempo.

Figura 12 – Perfil de formação do DCF em função do tempo de adição do SIH.



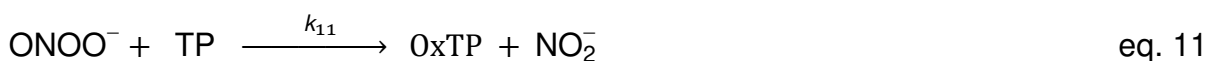
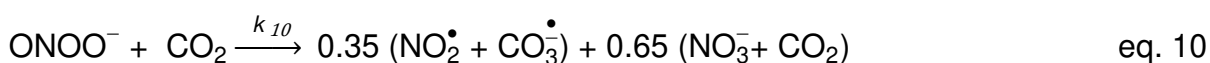
(A) Curvas de fluorescência da formação de DCF em RAW 264,7. O experimento foi realizado como descrito anteriormente (figura 3.1.5) usando o doador de NO[•] o 2,2'-(hidroxi-nitroso-hidrazona)bis-etanimina (Deta/NO). As adições de SIH foram no início e/ou em tempos específicos após o início da aquisição da fluorescência como anotados na figura por setas. **(B)** Taxa de aumento da fluorescência após a adição de SIH. A taxa foi determinada pela regressão linear nos últimos 5 minutos de cada curva. Os dados representam a média de 4 experimentos individuais \pm DP e são estatisticamente significantes em um intervalo de confiança de 95% relativo a células controle (teste t-student, $p < 0,05$) *. Condições experimentais: tampão de trabalho PBS/DTPA, em pH 7,4, a 37°C com os seguintes parâmetros de aquisição de fluorescência; $\lambda_{ex} = 332$, $\lambda_{em} = 456$ nm, abertura de fendas de excitação e emissão de 9 e 15 nm, respectivamente. Fonte: próprio autor.

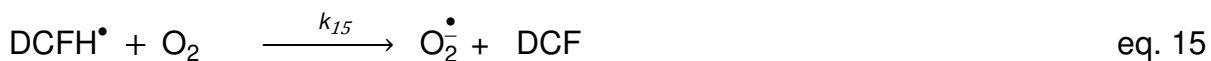
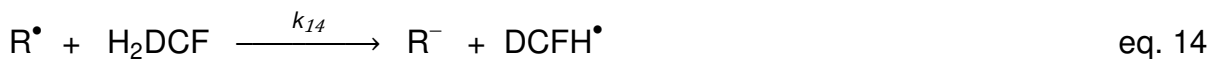
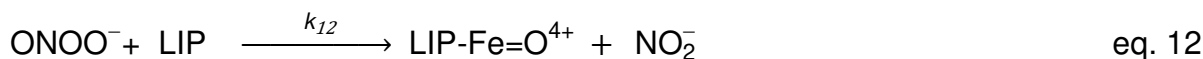
4.1.7 Constante de velocidade da reação entre peroxinitrito e ferro lábil

A partir dos resultados obtidos neste trabalho e todo o conhecimento e hipóteses testadas anteriormente pelo grupo de pesquisa, acreditamos na possibilidade de uma reação entre peroxinitrito e LIP, e que poderíamos determinar a constante de velocidade dessa reação. Isso foi abordado, utilizando um modelo de reações simplificado para a taxa de formação do DCF (taxa de oxidação do H₂DCF)

dependente de peroxinitrito (equações 8-15). Essa grandeza foi avaliada pela regressão linear da fluorescência de DCF em função do tempo na presença de doador de NO e PQ.

No modelo apresentado, apesar de simples, consideramos as principais espécies químicas e biológicas relevantes para o estudo. De acordo com o nosso modelo, o O_2^\bullet é consumido por superóxido dismutases (SOD), simplificada e representada pela reação do tipo superóxido-oxidase (equação 8), e também pela reação com NO^\bullet , formando peroxinitrito (equação 9). Devido a elevada reatividade de peroxinitrito e seus derivados radicalares, eles interagem com diversos alvos celulares, e de acordo com o nosso modelo, todas as reações diretas com peroxinitrito, excludentes a com CO_2 (equação 10, $k_{10} = 3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) e com LIP (equação 12) e todas as reações com os radicais derivados de peroxinitrito diferentes da reação com o H_2DCF (equação 14), são representadas genericamente pelas equações 11 e 13, respectivamente. Na equação 11 abaixo, TP representa o conjunto das proteínas tiol(ferro)peroxidases, onde a sua forma oxidada é representado por oxTP; a sua constante (k_{11}) é ponderada pela concentração da proteína e sua reatividade com peroxinitrito, que varia dependendo do tipo celular, e neste estudo assumimos valores entre 1×10^5 e $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. O termo CC (equação 13) representa todas os constituintes celulares, como por exemplo GSH, que reagem com os radicais derivados de peroxinitrito representados por R^\bullet e que são reduzidos a seus respectivos ânions R^- (equação 13). A oxidação do indicador H_2DCF por radicais derivados do peroxinitrito acontece em duas etapas monoeletrônicas, na primeira, um radical R^\bullet abstrai um elétron do H_2DCF produzindo o radical DCFH^\bullet (equação 14), que em seguida é oxidado por um elétron pelo O_2 dissolvido, produzindo O_2^\bullet e DCF (equação 15).





O nosso modelo foi construído assumindo que as concentrações de peroxinitrito e de todas as espécies reativas intermediárias estão na condição de estado estacionário. Assim, pode-se demonstrar que a velocidade de formação de DCF intracelular na ausência de quelante (por exemplo, SIH ou bipy) é dada pela equação 16 abaixo.³

$$\frac{d[\text{DCF}]}{dt} = \frac{2/3 k_9 k_{10} k_{14} [\text{NO}^\bullet][\text{O}_2^\bullet][\text{CO}_2] [\text{H}_2\text{DCF}]}{(k_{10} [\text{CO}_2] + k_{11} [\text{TP}] + k_{12} [\text{LIP}]) (k_{13} [\text{CC}] + k_{15} [\text{H}_2\text{DCF}])} \quad \text{eq. 16}$$

Analisando a equação 16 observamos que a taxa de formação do DCF depende diretamente das concentrações de NO^\bullet e O_2^\bullet , o que é observado experimentalmente, e inversamente proporcional a TP e CC. Por outro lado, a taxa de formação de DCF apresenta uma relação mais complexa com as concentrações de CO_2 e H_2DCF . Na presença do quelante (e.g. SIH), o termo $k_{12}[\text{LIP}]$ é abolido da equação 16 (assumindo que o quelante complexa LIP e inibe a reação ilustrada pela equação 12), e a velocidade de formação de DCF simplifica para a equação 17 abaixo.

$$\frac{d[\text{DCF}]}{dt} = \frac{2/3 k_9 k_{10} k_{14} [\text{NO}^\bullet][\text{O}_2^\bullet][\text{CO}_2] [\text{H}_2\text{DCF}]}{(k_{10} [\text{CO}_2] + k_{11} [\text{TP}]) (k_{13} [\text{CC}] + k_{15} [\text{H}_2\text{DCF}])} \quad \text{eq. 17}$$

A razão das taxas de formação de DCF intracelular na presença e na ausência de SIH é obtida pela divisão da equação 17 pela equação 16, fornece o parâmetro adimensional (q), que é necessariamente maior que 1. Rearranjada, essa divisão fornece a equação 18. Conhecendo os demais parâmetros (q, k_{10} , $[\text{CO}_2]$, k_{11} , $[\text{TP}]$ e

³ A dedução completa da equação pode ser consultada no Apêndice A.

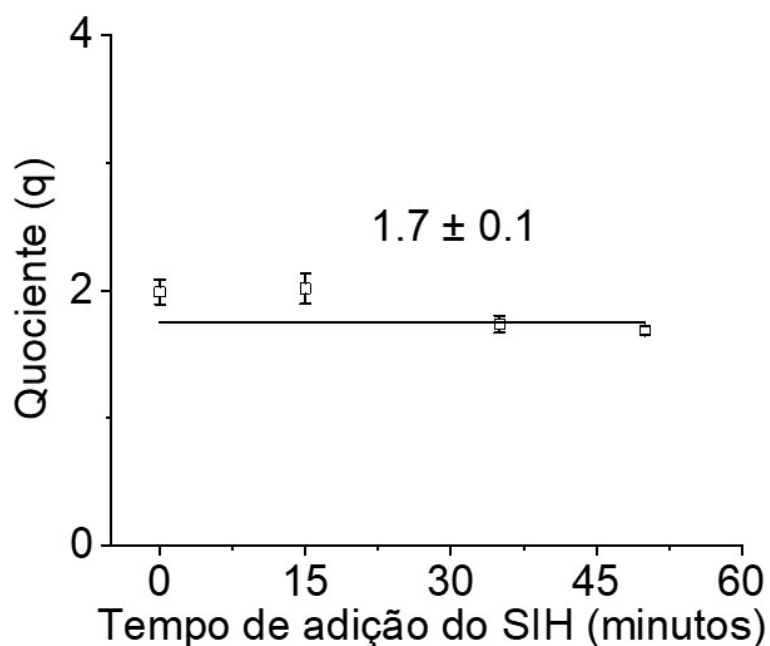
[LIP]) essa expressão pode ser usada para estimativas da constante de velocidade da reação hipotética entre peroxinitrito e ferro lábil (LIP).

$$k_{12} = (q - 1) \frac{k_{10} [\text{CO}_2] + k_{11} [\text{TP}]}{[\text{LIP}]} \quad \text{eq. 18}$$

A partir dos dados da Figura 12A foi determinado um valor médio para q de 1,7 (Figura 13). Os demais parâmetros da equação 18 foram assim considerados. Por se tratarem de famílias de proteínas e apresentarem uma distribuição não uniforme pelos compartimentos celulares, a concentração de TP foi estimada pela família de proteínas mais abundante nesse grupo, as tiol peroxidases. De acordo com Wang et.al.⁷⁶ cálculos realizados em várias linhagens celulares de mamíferos, incluindo a de *Mus musculus* RAW 264,7, podemos assumir um valor próximo de 10 μM para TP com limites inferior e superior para k_{11} ($10^6 - 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). A concentração de ferro lábil na linhagem RAW 264,7 foi determinada, no subitem 3.7 Figura 6, sendo este valor $2,0 \pm 0,2 \mu\text{M}$. A concentração de CO_2 não foi medida nas nossas condições experimentais. Mas, suspensões celulares em condições similares, utilizando solução tampão livre de bicarbonato e aberta para a atmosfera e em escala de tempo experimental próxima, sugerem uma concentração de CO_2 na ordem de uma centena de micromolar⁷⁷. Assumindo todos estes valores, estimamos que a constante de velocidade para a reação hipotética entre peroxinitrito e ferro lábil esteja entre 4 a $40 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ na linhagem de células RAW 264,7. Dado a natureza simplificada e as incertezas inerentes do modelo reacional e experimental, a quantificação de CO_2 e TP no modelo celular do estudo não aumentaria a confiabilidade das estimativas. Finalmente, essa estimativa assume que a formação de NO^\bullet , O_2^\bullet e peroxinitrito, e as concentrações de TP, CO_2 , SOD e CC sejam as mesmas na ausência e na presença do quelante SIH. Todos os parâmetros e simplificações adotadas no nosso modelo são justificáveis, mas reconhecemos que há limitações e incertezas no nosso modelo. Nós assumimos que os processos que podem levar a oxidação do indicador H_2DCF , que não seja pelo nosso modelo (radicais derivados de peroxinitrito), contribuem igualmente na ausência ou presença do quelante (e.g SIH). Tais processos oxidativos que poderiam ocorrer são, principalmente, decorrentes da reação de H_2O_2 com metaloperoxidases e proteínas que contem ferro. Não houve oxidação significativa de DCF na ausência de NO^\bullet mesmo na presença de PQ, condição na qual a

concentração de H_2O_2 seria maior, sugerindo que oxidação de H_2DCF dependente de H_2O_2 é irrelevante nas condições do estudo. Além disso, ebselen traz a oxidação de H_2DCF por sper/NO e PQ para níveis do controle, tanto na presença quanto na ausência do quelante SIH, indicando que a formação de DCF é, quase em sua totalidade, dependente de peroxinitrito. Da mesma forma, os processos de consumo de O_2^\bullet (SODs) e óxido nítrico NO^\bullet (autooxidação e consumo celular) são considerados constantes e iguais na ausência e presença do quelante.

Figura 13 – Quociente (q) calculado a partir dos valores de taxa de aumento de fluorescência na presença e ausência de SIH nos seus diferentes tempos de adição.



O quociente (q) foi calculado dividindo-se as taxas de aumento de fluorescência da figura 11 na presença do quelante SIH pela taxa na ausência de SIH. Fonte: próprio autor.

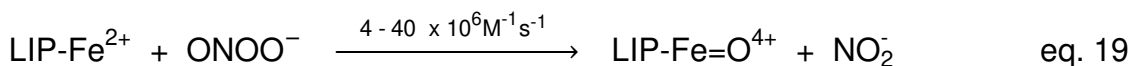
4.1.8 Discussão – Capítulo I

A constituição do LIP ferroso (LIP-Fe^{2+}) ainda é uma incerteza, mas é formalmente aceito como complexos de ferro de baixo peso molecular. A partir de dados de concentração e constantes termodinâmicas disponíveis, de todos os menores ligantes celulares moleculares biodisponíveis, somente GSH tem potencial para ser um ligante para LIP-Fe^{2+} em células^{21; 78}. A reação de íons Fe(II) ou Fe(III) na faixa de pH de 3 a 7 produz apenas o complexo Fe(II)-GS (no caso de Fe(III) , já que o excesso de GSH reduz o ferro do estado férrico para ferroso). Evidências

empíricas amparam a formação de complexos Fe(II)-GS no citosol celular ^{21; 78}. Por vezes nos tenhamos lançado a hipótese de que LIP esteja ligado/associado a proteínas, essas funcionando como verdadeiros quelantes metálicos e formando espécies muito mais estáveis termodinamicamente, com constante de afinidade provavelmente maior que com o clássico ligante GSH ³⁷. Isso seria possível uma vez que proteínas podem oferecer não apenas um, mais vários ligantes em sua estrutura. Contribui para esta hipótese o fato de algumas proteínas que apresentam centros de ferro mononuclear, que não são do grupo heme, como na família das prolil hidroxilases (PHDs), serem quelatáveis ⁷⁹. No mesmo caminho, estudos com proteínas inicialmente caracterizadas como uma proteína de ligação de RNA, com função na atividade regulatória pos transcricional, apontam que suas isoformas em células humanas, conhecidas como proteínas de ligação a região poli(C) de RNAs 1 e 2 (*Polyr(C)-binding protein 1 e 2*, PCBP1 e PCBP2), estão ligadas ao LIP, assim como, muito provavelmente os demais membros desta família de proteínas ^{25; 26}. Ambas proteínas PCBP1 e PCBP2 são apontadas, como responsáveis por ligarem-se e transferirem ferro para ferritina, proteína conhecida por armazenar ferro em células ⁸⁰, pela entrega de ferro a não-heme mono e dinucleares apoproteínas citosólica como a supracitada prolil hidroxilase e a deoxihipusina hidroxilase (DOHH) ^{10; 81}, bem como, associar-se a proteína Bola2 (proteína citosólica que atua como fator de inserção de cluster Fe-S) conjuntamente com glutaredoxina 3 (GLRX3), onde a tríade formada apresenta função de chaperona de ferro do tipo [2Fe-2S] ²⁶.

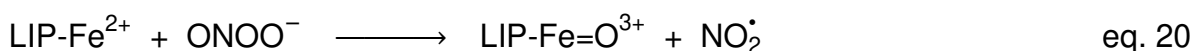
As proteínas PCBP1 e PCBP2 tem sido extensivamente proposta como a principal chaperona de ferro citosólica responsável pelo transporte seguro de ferro intracelular. Estruturalmente, essas proteínas apresentam 3 domínios bem parecidos, chamados de domínios KH, sendo que apenas um apresenta sítio de ligação com ferro, o domínio KH3 ⁸². Estudo mutagênico com o domínio KH3, revelam que os resíduos de glutamato e cisteína conservados em sua estrutura são necessários para a coordenação de ferro na PCBP1 ²⁶, e o mais importante, que o domínio recombinante purificado liga Fe(II) com constante de dissociação de 0,8 e 4,2 μM na presença e ausência de GSH 5 mM, respectivamente ²⁶. Essa evidência sugere que GSH completa a esfera de coordenação do ferro nas PCBPs, reforçando seu papel e importância na ligação do LIP em células.

Nesta primeira parte do estudo focamos nas propriedades fundamentais da reação entre LIP e peroxinitrito em células RAW 264,7. Os resultados indicam uma reação direta entre peroxinitrito e LIP, e não de LIP com radicais derivados de peroxinitrito. A estimativa para constante de velocidade para a reação hipotética entre LIP e peroxinitrito sugere uma reação rápida e com características catalíticas. A partir dos resultados apresentados neste estudo, informações de estudos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa, assim como as recentes evidências apresentadas na literatura, presumimos de forma hipotética que o LIP-Fe²⁺ reduz o peroxinitrito a nitrito (NO₂⁻), espécie pouco reativa ou inerte, enquanto que o LIP seria oxidado a LIP-Fe=O⁴⁺ (equação 19). Presumidamente, a reação levaria à diminuição da oxidação direta e indireta de alvos celulares por peroxinitrito e seus derivados radicais. A forma LIP-Fe=O⁴⁺ é certamente um oxidante, mas talvez menos reativo e que possivelmente seria neutralizado mais facilmente que peroxinitrito e seus derivados radicalares. A redução da espécie de LIP oxidado (LIP-Fe=O⁴⁺) novamente ao estado ferroso LIP-Fe²⁺ faria sentido para um processo catalítico de redução de peroxinitrito por LIP, e isso parece acontecer.



Os mecanismos responsáveis por esse processo de redução, o agente redutor e a cinética dessas reações permanecem obscuras, mas considerando a possível natureza PCBP1-GSH do LIP, a glutathiona (GSH) seria um candidato plausível para a redução da espécie LIP-Fe=O⁴⁺. Contribui para esta hipótese o fato de estudos anteriores mostrarem que a inibição da biossíntese de GSH aumenta a oxidação de H₂DCF em células RAW 264,7 expostas a peroxinitrito⁸³. Contudo, esse efeito poderia ser explicado pelo consumo de radicais derivados de peroxinitrito por GSH. Considerando que o LIP seja a espécie PCBP1-Fe²⁺, a diminuição nos níveis de GSH poderia alterar o equilíbrio de ligação, e por ocasião a reatividade de LIP. Ainda considerando a possível natureza PCBP1 do LIP, um segundo candidato a agente redutor da espécie LIP-Fe=O⁴⁺ seria os próprios resíduos de aminoácidos presentes na proteína. A possibilidade de reação monoelétrica entre LIP-Fe²⁺ e peroxinitrito formando LIP férrico e NO₂[•] não é descartada por completo (equação 20). Segundo esse mecanismo LIP poderia consumir o ânion peroxinitrito ao mesmo tempo

que direciona seu poder oxidante a um radical que poderia em tese ser mais eficientemente eliminado por redutores celulares como GSH.



As características catalíticas associada a elevada constante cinética estimada para a reação entre LIP e peroxinitrito, da ordem de $4\text{-}40 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ em células RAW 264,7, sugerem que LIP possa ser um relevante sistema com atividade peroxinitrito redutase. Como comparação, o valor determinado está na mesma ordem de magnitude de constantes de velocidade para reações similares de oxidação por 2 elétrons de centros ferrosos por peroxinitrito de mieloperoxidase⁸⁴ e deoximioglobina⁸⁵. Inclusive, nossa proposta (equação 19) foi inspirada por essas reações entre ferro-heme proteínas e peroxinitrito. Vale ressaltar que a relevância da atividade detoxificadora de peroxinitrito por LIP em células é dependente da concentração de outros sistemas com atividade peroxinitrito redutase, como peroxirredoxinas e glutathione peroxidases. Racionalmente, quanto maior for a concentração e/ou atividade desse sistema, menor será a relevância do LIP. Isso muito provavelmente irá refletir em diferenças na atividade peroxinitrito redutase de LIP dependendo do tipo celular e do estado redox celular.

Os achados e discussões apresentado pelo grupo de pesquisa nos últimos anos de que o LIP é um atenuante de oxidações dependente de peroxinitrito contradiz o que é documentando e pressuposto pelas propriedades pro-oxidativas de LIP em células ⁶⁵. Essa aparente contradição vem sendo discutida e pontuado em nossas observações como uma propriedade específica das reações entre LIP e peróxido de hidrogênio ou peroxinitrito. Portanto, a toxicidade redox de LIP é discutida em termos da sua reação com peróxido de hidrogênio, onde a cascata de processos oxidativos decorrentes dessa reação sequer é compartilhada por outros (hidro)peróxidos conhecidos. Vale ressaltar ainda que LIP pode apresentar propriedades químicas e reatividades distintas (cinéticas e termodinâmicas) com peróxido de hidrogênio e peroxinitrito do ferro tóxico geralmente associado a patologias como hemocromatose, Talassemia Maior, traumas ou desordens cerebrais. Todas essas doenças ou condições apresentam acúmulo de ferro quelatável oriundo de descontrole do metabolismo de ferro. Entretanto, não há uma relação direta entre LIP observado em condições normais e controladas desse ferro acumulado. Interessante, em um

trabalho com células K562, onde os níveis de LIP foram propositalmente aumentados, a oxidação de proteínas dependente de H₂O₂ e LIP se mostrou aumentada somente quando LIP atingiu pelo menos 2,6 vezes seu nível basal, sugerindo que, quando associado a seu ligante celular natural, LIP não é um oxidante. Contudo, seu ligante celular aparentemente apresenta uma capacidade tamponante limitada para ferro ⁸⁶, pelo menos na escala de tempo do estudo.

Toledo et al.³⁷ e outros³⁶ mostraram anteriormente que LIP reage rapidamente com NO• formando DNIC, sugerindo que NO• e peroxinitrito competem por LIP. Não é surpresa que essas duas espécies competem por LIP, uma vez que a natureza desta reação que é compartilhada por outros compostos de ferro e ferro-proteínas. Por outro lado, devido essa competição a relevância da reação entre LIP e peroxinitrito pode ser questionada. Foi discutido que a reação de LIP com NO• ou peroxinitrito depende necessariamente da disponibilidade de O₂[•]. Assim, a formação de DNIC a partir da reação entre LIP e NO• é favorecida em condições normais, e a reação de LIP com peroxinitrito torna-se relevante com o aumento nos níveis de O₂[•], onde este gradativamente compete melhor por NO• com LIP, formando peroxinitrito. Essas condições podem ser relevantes em algumas células fagocíticas e durante processos inflamatórios. Embora a formação de DNIC pela reação entre LIP e NO• seja rápida, este é um processo complexo que envolve várias etapas, sendo, duas etapas de ligação reversível com NO• e uma redução de Fe(II) para Fe(I)^{32; 87}, que podem ser fatores limitantes na formação de DNICs. Ainda, a formação de DNICs previne a oxidação de H₂DCF dependente da reação entre LIP e H₂O₂ em células RAW 264,7 ³⁶. Portanto, LIP demonstra ter atividade antioxidante complementar tanto em condições normais (NO•) quanto de estresse oxidativo (peroxinitrito), embora esses processos ocorram por mecanismos químicos distintos.

4.2 Capítulo II: Propriedades termodinâmicas do ferro lábil em RAW 264,7.

Como a identidade celular de LIP ainda é desconhecida, os estudos de LIP são indissociáveis do ambiente celular. Não foi ou não é possível obter com segurança LIP através de processos de separação ou purificação a partir de extratos celulares, principalmente considerando sua característica lábil e ausência de parâmetro analítico para sua identificação em frações. Mesmo que LIP pudesse ser identificado por alguma de suas reações (como com NO^*), procedimentos típicos de purificação pode simplesmente remover LIP de seu ligante celular e assim direcionar sua identificação incorretamente. Tomar a hipótese mais simplista de que LIP seja simplesmente Fe(II) aquoso ignora a presença de múltiplos possíveis ligantes de íons de metais de transição no ambiente citosólico e sobretudo confronta propriedades de Fe(II) como elevada densidade de carga e energia de estabilização do campo cristalino bem como conceitos básicos de Química de Coordenação. Diferentemente de íons de metais alcalinos, Fe(II) forma complexos termodinamicamente estáveis em meio aquoso. Existem hipóteses de que LIP seja complexos de Fe(II) com constituintes celulares como GSH ou com proteínas, mas todas essas possibilidades são questionáveis e especulativas com o conjunto de informações reunidas sobre LIP até o momento.

Pensando nisso, desenvolvemos uma abordagem experimental utilizando a metodologia já existente de CA de quantificação de LIP citosólico para acessar informações de LIP ainda indisponíveis em células. A abordagem é baseada em dois modelos para a natureza celular de LIP e suas interações com CA. Esses modelos são algebricamente solucionáveis. As soluções levaram a equações de CALIP em função de CA que são testáveis experimentalmente. A abordagem experimental é simples e consiste basicamente na quantificação das concentrações intracelulares de CALIP e CA em condições de equilíbrio e ajuste dos dados às equações dos modelos. Como resultado a abordagem fornece a constante termodinâmica de afinidade entre LIP e seu ligante celular (designado coletivamente como C), qualquer que seja sua natureza, e as concentrações de LIP total e C total. Essas informações não identificam LIP citosólico, mas são valiosas nesse sentido e permitem confrontar as hipóteses existentes.

CA é restrito ao espaço citosólico. Inicialmente, o estudo focou em LIP citosólico porque esse é provavelmente o mais relevante. O LIP citosólico é o único que é reconhecidamente mantido e regulado pelos processos homeostáticos canônicos de ferro. Outras fontes de LIP, como os encontrados em lisossomos e endossomos, podem ser classificados de ferro mobilizado e em trânsito do ou para o espaço citosólico. Existe alguma evidência de LIP mitocondrial, mas nenhuma indicação de sistema regulatório de LIP nessa organela, sugerindo que o LIP mitocondrial represente ferro em demanda e em trânsito do espaço citosólico.

O indicador fluorescente CA apresenta vantagens de ser facilmente quantificado, apresenta alta seletividade para ferro, ótima relação linear entre concentração e fluorescência nas condições experimentais empregadas no estudo, além de apresentar alta sensibilidade. Também é pouco invasivo e permite quantificações rápidas. Isso é importante porque manipulações mais energéticas e mais longas com quelantes interfere no sistema homeostático celular de Ferro, que pode mobilizar ferro de ferritina e do espaço extracelular e gerando consequentemente resultados enganosamente elevados para a concentração de LIP, o que racionalmente também afeta medidas de suas propriedades termodinâmicas.

Esse estudo foi realizado de forma exploratória em células RAW 264.7 pela quantidade elevada de LIP, relevância de macrófagos na regulação sistêmica de ferro e pelo conhecimento acumulado sobre LIP nesse modelo celular. Entretanto, a concepção já foi testada em outros modelos celulares incluindo clones de hepatócitos e os resultados parecem convergentes.

4.2.1 Determinação da constante de formação K_{CA} do complexo de calceína e ferro(II).

Inicialmente, foi determinada a constante de formação do complexo CALIP a partir de Fe(II) e CA em solução aquosa. Calceína (CA) é um derivado de fluoresceína altamente fluorescente que apresenta estruturas quelantes substituintes que ligam Fe(II) em estequiometria 1:1 formando complexos de CA e Fe(II) com constante de equilíbrio conhecida K_{CA} (Equação 21). Por conveniência, nos referimos ao Fe(II) e ao complexo de CA e Fe(II) como LIP e CALIP, respectivamente, no texto e equação 21.

O complexo CALIP não é fluorescente. Contudo, quelantes metálicos de alta afinidade podem deslocar CA do complexo CALIP, liberando CA e aumentando a fluorescência, que é proporcional a concentração de CALIP imediatamente antes da adição do quelante. Esta propriedade permitiu que utilizássemos CA como um método baseado no aumento de fluorescência (*turn on*) para a quantificação de LIP em solução e em células por meio da expressão de equilíbrio da equação 22.



$$K_{\text{CA}} = \frac{[\text{CALIP}]}{[\text{CA}][\text{LIP}]} \quad \text{eq. 22}$$

As equações de balanço de massas para LIP e CA são descritas pelas equações 23 e 24, respectivamente, onde LIP_T e CA_T representam a concentração total de LIP e CA.

$$[\text{LIP}_T] = [\text{LIP}] + [\text{CALIP}] \quad \text{eq. 23}$$

$$[\text{CA}_T] = [\text{CA}] + [\text{CALIP}] \quad \text{eq. 24}$$

Resolvendo as duas equações acima para LIP e CA, e substituindo o resultado na equação 22, obtemos uma equação quadrática para a concentração de CALIP (Equação 25). A única solução de Bhaskara aceitável do ponto de vista físico e químico dá origem a equação 26. A equação 26 foi utilizada para determinar o valor de K_{CA} em solução e também testar a hipótese de que o LIP celular seria simplesmente um complexo hexaaquo de Fe(II) (íon complexo $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$). Para este propósito foi determinado as concentrações de LIP e CA nas condições de equilíbrio em solução (*cell free*) e em experimentos com células.

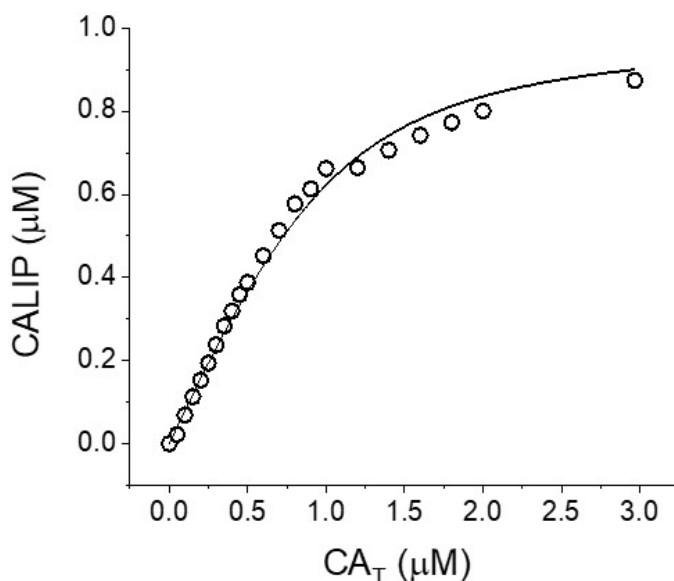
$$[\text{CALIP}]^2 - (K_{\text{CA}}^{-1} + \text{CA}_T + \text{LIP}_T) [\text{CALIP}] + [\text{CA}_T][\text{LIP}_T] = 0 \quad \text{eq. 25}$$

$$[\text{CALIP}] = \frac{(K_{\text{CA}}^{-1} + \text{CA}_T + \text{LIP}_T) - \sqrt{(K_{\text{CA}}^{-1} + \text{CA}_T + \text{LIP}_T)^2 - 4\text{CA}_T\text{LIP}_T}}{2} \quad \text{eq. 26}$$

Experimentalmente, em uma cubeta com septo foi adicionado o tampão (PBS/sem DTPA) para um volume total de 3 mL e o mesmo desaerado com fluxo de argônio 5.0 por 15 minutos. Após, uma alíquota de uma solução de Fe(II) previamente preparada em um frasco vial selado em HCl (0,01M) e desaerado por 5 minutos com

argônio 5.0 foi adicionada a cubeta utilizando uma seringa Hamilton, a concentração final de Fe(II) adicionado a cubeta foi de 1 μM . Em seguida, foram realizadas sucessivas adições de CA (0,05 – 3 μM) e a fluorescência da calceína livre medida após estabilização da linha base. Utilizando uma curva padrão de CA foram determinadas as concentrações de CA livre e calculada a concentração de CALIP com a equação 24. Esses dados foram plotados em uma curva da concentração CALIP em função da concentração de CA total adicionado (CA_T) (Figura 13). Os dados da figura 14 foram ajustados com a equação 26 usando o software Origin 2019. O ajuste retornou o valor de K_{CA} ($4,4 \pm 0,2 \mu\text{M}^{-1}$), para LIP (1,0 μM), pH 7,4 e 37°C. A constante de dissociação K_d ($0,23 \pm 0,02 \mu\text{M}$) foi determinada como o recíproco da constante K_{CA} . O valor de K_d calculado nas nossas condições experimentais difere pouco do valor encontrado na literatura(ref).

Figura 14 – Determinação da constante de dissociação de calceína em solução de Ferro (II).

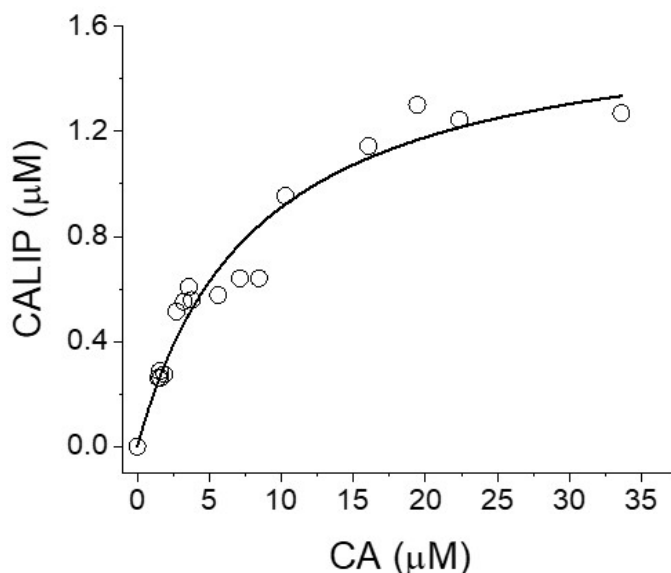


Valores de calceína ligada ferro(II) (CALIP) plotados em função da concentração de calceína total (CA_T) de uma solução de Fe(II) (1 μM / 3mL) em tampão PBS (sem DTPA) tratadas com sucessivas adições de calceína (0,05; a 3,0 μM). Todo o experimento foi realizado na ausência de oxigênio (desaeração com argônio 5.0), inclusive as soluções estoque de ferro(II) e calceína utilizadas. Condições experimentais: Tampão PBS/semDTPA, pH 7,4, 37°C, $\text{Lex} = 495 \text{ nm}$, $\text{Lem} = 516 \text{ nm}$, fendas de excitação e emissão de 3nm em um espectrofluorímetro convencional (Shimadzu RF-5301pc). Os dados experimentais foram ajustados usando o software Origin 2019 (v. Acadêmico), Origin Lab Corporation, Northampton, MA, USA.

4.2.2 Construção da curva de CALIP versus CA.

Para a determinação dos parâmetros termodinâmicos do LIP em células RAW 264,7 foram realizados alguns experimentos prévios a fim de estabelecer uma curva experimental da concentração total do indicador calceína (CA) em função da concentração de calceína ligada ao ferro (CALIP). Os experimentos foram conduzidos como descrito no item 3.7 (Materiais e métodos), sendo os resultados compilados na figura 15 abaixo. A Figura mostra os dados compilados após realização dos cálculos (como descrito no subitem 3.7) para determinarmos as concentrações de CALIP e CA.

Figura 15 – Concentração de calceína livre em função da calceína ligado ao ferro do ferro labil.



Valores de calceína ligada ferro(II) (CALIP) plotados em função da concentração de calceína total (CA_T) em suspensões de células RAW 264,7 em tampão de trabalho (45×10^6 células / mL) tratadas com Calceína derivatizada com grupo aceto-metoxi (CA-AM) (0,1 – 3 µM) em constante agitação a 37°C por 20 minutos. Condições experimentais: Tampão PBS/semDTPA, pH 7,4, 37°C, $\lambda_{ex} = 495$ nm, $\lambda_{em} = 516$ nm, fendas de excitação e emissão de 3 nm em um espectrofluorímetro convencional (Shimadzu RF-5301pc). Os dados experimentais foram ajustados com uma equação assintótica usando o software Origin 2019 (v. Acadêmico), Origin Lab Corporation, Northampton, MA, USA.

4.2.3 Ensaio com calceína para a quantificação de LIP_T em células.

Intracelularmente, LIP se liga a calceína (CA) para formar o complexo de calceína e LIP (CALIP). A quantificação de LIP celular usando CA é predita pela

expressão de equilíbrio da equação 22 e a lei de ação de massas da equação 23. Notadamente, sobre condição de equilíbrio, as concentrações intracelulares das espécies CALIP e CA podem ser determinadas experimentalmente por espectroscopia de fluorescência usando uma curva de padrão analítica de fluorescência em função da concentração de CA livre em células controle. Posteriormente, a concentração de LIP poderia ter sido determinada usando a expressão de equilíbrio (Equação 22) e LIP_T finalmente determinado pelo somatório de CALIP e LIP. Nos utilizamos uma aproximação diferente para estimar a concentração de LIP_T células. Resolvemos a equação 23 para a [LIP] e substituímos o resultado na expressão de equilíbrio (Equação 22) levando a equação 27. Esta equação mostra que em concentrações elevadas e limitantes de CA, o termo $K_{CA}[CA]$ se torna muito maior que 1 ($K_{CA}[CA] \gg 1$) e o valor de [CALIP] se aproxima do valor de LIP_T .

$$[CALIP] = [LIP_T] \frac{K_{CA}[CA]}{K_{CA}[CA] + 1} \quad \text{eq. 27}$$

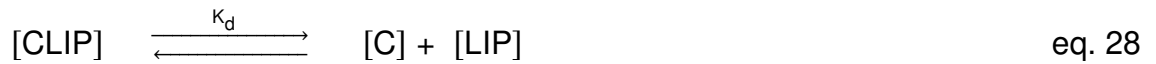
A figura 14 mostra a curva das concentrações intracelulares de CALIP e CA_T em RAW 264,7. O perfil da curva era esperado (equação 27), com a concentração de CALIP atingindo um patamar superior (*plateau*) para altas concentrações de CA. O ajuste dos dados plotados com uma equação assintótica permitiu a determinação do LIP_T como a concentração de CALIP limitante (máxima).

4.2.4 Hipótese de LIP como um complexo aquoso em células.

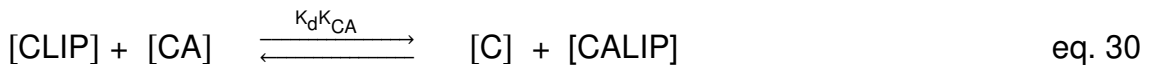
Primeiramente, nos testamos a hipótese simplista de que LIP em células RAW 264,7 é o íon complexo ($[Fe(H_2O)_6]^{2+}$), ajustando os dados da figura 15 com a equação 26. Os dados foram ajustados com três configurações diferentes: valores de K_{CA} e LIP_T parametrizados, LIP_T constante e K_{CA} parametrizado, e K_{CA} constante (4,4 μM) e LIP_T parametrizado. Os ajustes simplesmente não convergem ou convergem, mas retornam valores errados para K_{CA} e LIP_T , a despeito das configurações dos ajustes e valores iniciais dos parâmetros, indicando muito provavelmente que o LIP celular não seja um simples complexo aquoso de Fe(II).

4.2.5 Desenvolvimento matemático da equação de equilíbrio para determinação dos parâmetros termodinâmicos do ferro lábil em células.

Partimos da hipótese de que LIP está ligado e em condição equilíbrio com seu ligante celular (C) de acordo com equação 28, onde K_d é a constante de dissociação de LIP do ligante celular. Na presença de CA, LIP é complexado por CA (equação 29), com constante de formação dada por K_{CA} , que é conhecido. Supusemos que, em células e nas nossas condições experimentais, não ocorrem outras reações que interfiram na concentração de LIP, CA e CALIP.



Somando as duas equações acima encontramos uma equação geral de equilíbrio entre as espécies LIP, CA e CALIP (equação 30).



Tomando a equação de equilíbrio em termos das constantes K_d e K_{CA} chegamos à equação 31. Esta equação relaciona a concentração intracelular de ferro lábil, CALIP e CA, todas variáveis mensuráveis a partir do método empregando calceína.

$$K_d K_{CA} = \frac{[\text{CALIP}][\text{C}]}{[\text{CA}][\text{CLIP}]} \quad \text{eq. 31}$$

Resolvendo a expressão da lei de ação de massas do LIP (equação 32) e substituindo a expressão na equação 31, resulta na equação 33. Nós assumimos que a concentração de ferro livre (que não está ligado a CA nem a C) é desprezível comparado ao somatório de CLIP e CALIP.

$$[\text{LIP}_T] = [\text{CLIP}] + [\text{CALIP}] \quad \text{eq. 32}$$

$$[\text{CALIP}] = \frac{K_d K_{CA} [\text{CA}][\text{LIP}_T]}{K_d K_{CA} [\text{CA}] + [\text{C}]} \quad \text{eq. 33}$$

A equação 33 é consistente com os dados experimentais das concentrações de CALIP vs. CA (C_T) apenas se o termo $K_d K_{CA} [CA] \gg [C]$ para altas concentrações de CA, onde $[CALIP]$ aproxima-se de $[LIP_T]$. Contudo, o termo C da equação 33 não pode ser calculado experimentalmente. Considerando a expressão da lei de ação de massas para C (equação 34), resolvendo para C e substituindo na equação 33, obtemos a equação 35.

$$[C_T] = [C] + [CLIP] \quad \text{eq. 34}$$

$$K_d K_{CA} = \frac{[C_T] - ([LIP_T] - [CALIP]) [CALIP]}{([LIP_T] - [CALIP]) [CA]} \quad \text{eq. 35}$$

Esta equação mostra que os parâmetros desconhecidos são LIP_T (a concentração total de LIP em células), C_T (a concentração total do ligante celular de LIP) e K_d (a constante de dissociação do complexo CLIP). Os dois últimos parâmetros são informações valiosas que nunca foram exploradas. A equação 35 foi então resolvida fazendo toda a distribuição de produtos obtendo uma equação quadrática em CALIP (equação 36). Se tratando de uma expressão de segundo grau, a equação 36 apresenta duas resoluções possíveis pela resolução de Bhaskara, sendo uma delas impraticável do ponto de vista químico, uma vez que retorna valores negativos de K_d e C_T . A resolução plausível é apresentada na equação 37 a seguir.

$$[CALIP]^2 + (K_d K_{CA} [CA] + [C_T] - [LIP_T]) [CALIP] - K_d K_{CA} [CA] [LIP_T] = 0 \quad \text{eq. 36}$$

$$[CALIP] = \frac{-(K_d K_{CA} [CA] + [C_T] - [LIP_T]) + \sqrt{(K_d K_{CA} [CA] + [C_T] - [LIP_T])^2 - 4 K_d K_{CA} [CA] [LIP_T]}}{2} \quad \text{eq. 37}$$

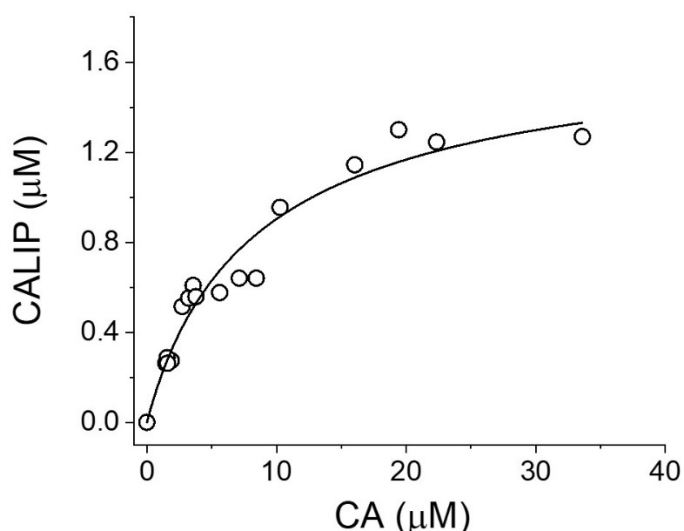
Com a equação 37 foi possível ajustar os dados experimentais obtidos neste estudo com células RAW 264,7. O mesmo modelo foi usado posteriormente para outras linhagens celulares.

4.2.6 Determinação dos parâmetros termodinâmicos do LIP e da concentração do ligante de LIP em RAW 264,7.

Para a determinação do valor da constante de dissociação do LIP (K_d) e da concentração do ligante celular de LIP (C_T) foi utilizada a solução por Bahskara (equação 37). Os dados obtidos nos experimentos em células (Figura 15) foram ajustados com a equação 37, tomando os valores constantes de K_{CA} $4,4 \mu\text{M}^{-1}$ e LIP_T $1,8 \mu\text{M}$. Já os valores de K_d e C_T foram permitidos que variassem de $0,001$ a $100 \mu\text{M}$ e $0,1$ a $5000 \mu\text{M}$, respectivamente.

Os ajustes com a equação 37 seguindo os parâmetros apontados acima sempre retornaram os mesmos valores de K_d e C_T , independentemente dos valores iniciais indicados para os parâmetros desconhecidos. Uma curva de ajuste representativa pode ser vista na figura 16 (traço preto). Foi observado que não há convergência do ajuste com valores iniciais para C_T maiores que $100 \mu\text{M}$, representando um limite prático durante o ajuste. Ressaltamos que tanto as concentrações intracelulares de CALIP quanto de CA foram determinadas experimentalmente, o que aumenta a incerteza dos valores obtidos para as grandezas parametrizadas C_T e K_d .

Figura 16 – Curva de ajuste da concentração de CA em função da concentração de CALIP.



Valores de calceína ligada ferro(II) (CALIP) plotados em função da concentração de calceína total (CA_T) em suspensões de células RAW 264,7 em tampão de trabalho (45×10^6 células / mL) tratadas com Calceína derivatizada com grupo aceto-metoxi (CA-AM) ($0,1 - 3 \mu\text{M}$) em constante agitação a 37°C por 20 minutos. Condições experimentais: Tampão PBS/semDTPA, pH 7,4, 37°C , $\lambda_{ex} = 495 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 516 \text{ nm}$, fendas de excitação e emissão de 3nm em um espectrofluorímetro convencional (Shimadzu RF-5301pc). Os dados

experimentais foram ajustados com uma equação 37 (subitem 4.2.5) usando o software Origin 2019 (v. Acadêmico), Origin Lab Corporation, Northampton, MA, USA.

4.2.7 Discussão – Capítulo II

Como mencionado anteriormente, acredita-se que o ferro lábil ou LIP é uma fonte de ferro mantida pelas células que a usa para incorporação em apo-ferroproteínas nascentes como seus cofatores. O LIP, é referido algumas vezes como um complexo íon $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$. Contudo, esta hipótese confronta conceitos básicos da química de coordenação de metais de transição, sendo também conflitantes aos testes experimentais. Devido aos metais de transição apresentarem densidade de carga consideravelmente elevada (Z/r) e se beneficiarem da energia de estabilização do campo cristalino (EECC), eles formam complexos termodinamicamente estáveis em solução aquosa (REF). Assim, considerando que o espaço intracelular é rico em potenciais ligantes para o ferro, é esperado que o LIP esteja na forma de um complexo ferroso, contrastando com os íons Na^+ e K^+ . Esses são extremamente lábeis e existem essencialmente na forma de complexos aquosos, estão em alta concentração e agem como verdadeiros carreadores de carga. Neste trabalho avaliamos a hipótese de que LIP é simplesmente o complexo hexaaquaferro(II) $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ utilizando calceína como indicador de LIP em células RAW 264,7.

Os dados experimentais apresentados na figura 15B foram ajustados com uma equação que representa bem este caso, equação 26. Foram realizados alguns ajustes não lineares utilizando softwares gráficos com diferentes combinações dos parâmetros K_{CA} e LIP_T : ambos os parâmetros K_{CA} e LIP_T parametrizados; LIP_T fixado e K_{CA} parametrizado; LIP_T parametrizado e K_{CA} fixado ($K_{CA} = 4,4 \mu\text{M}$). Independente da combinação e dos valores iniciais configurados para cada parâmetro, todas as tentativas de ajuste ou não convergiram ou convergiram mais retornaram os valores de K_{CA} e LIP_T incompatíveis. O fato de o modelo de ferro livre não convergir nos dados experimentais em células, nos leva a concluir que o LIP esteja complexado a algum constituinte celular. Assim, decidimos seguir com a abordagem que considera a existência de um ligante celular para LIP.

Ainda que previsível do ponto de vista da química de coordenação, os dados da figura 14B apresentaram convergência ao modelo onde LIP está ligado a um ligante intracelular genérico (equação 37). Esta conclusão não é diminuta, uma vez que tem origem em um modelo químico e em dados experimentais e não apenas em racionalização, revelando ainda, que o LIP provavelmente esteja estequiometricamente ligado a ligantes celulares. Além disso, o modelo revelou informações importantes sobre a concentração total do ligante celular de LIP (C_T) e da constante de dissociação termodinâmica do complexo CLIP (K_d). O modelo experimental é limitado por não permitir a identificação da espécie celular C e CLIP e nem mesmo determinar se ele é a única espécie ou múltiplos ligantes. Desta forma, os valores de C_T e K_d devem ser considerados estimativas de ordem de grandeza. Por outro lado, os valores determinados para K_d e C_T mostram uma possível natureza e característica de LIP.

O valor da constante de dissociação aparente K_d para o ferro em CLIP em células RAW 264,7, de $0,027 \pm 0,009 \mu\text{M}$, determinada neste trabalho, representa uma alta afinidade termodinâmica para Fe(II). De acordo com os valores de K_d e das concentrações de C_T e LIP_T obtidos, LIP estaria predominantemente complexado na forma de CLIP, justificando a simplificação de que LIP aquoso é insignificante a somatória CLIP + CALIP nas condições experimentais do estudo.

Os valores de K_d e C_T para células RAW 264.7 permitem testar hipóteses existentes para a identidade celular de LIP. O complexo de ferro e glutathiona (GSFe) foi sugerido como a forma predominante de LIP em células, apresentando competitividade termodinâmica com base na concentração de GSH e no seu valor de K_d . Quimicamente, essa hipótese não é diferente do modelo de CLIP e, portanto, pode ser comparada. Contudo, a concentração de C_T para as células RAW 264,7, determinado neste trabalho, está em cerca de $3,1 \mu\text{M}$, enquanto as concentrações de GS^- e GSH em pH fisiológico estão na ordem de centenas de μM a mM ⁸⁸. Além disso, como supracitado, o ajuste dos dados com a equação 37 (Figura 16) não convergem para valores iniciais de C_T maiores que $100 \mu\text{M}$. Adicionalmente, a constante de dissociação do complexo GSFe ($\sim 8 \mu\text{M}$)⁷⁸ é mais de duas ordens de grandeza maior do que o valor determinado de K_d para o LIP em células RAW 264,7 no presente trabalho. Portanto, os resultados supracitados desafiam frontalmente a hipótese de que o complexo GSFe é CLIP. Isso também exclui outros ligantes de baixa massa

molecular, como citrato e diferentes espécies de fosfatos, como ligantes para LIP, simplesmente porque eles não são termodinamicamente competitivos com o complexo GSFe. O valor de C_T determinados nesse estudo é mais compatível com as concentrações de proteínas. Nesse sentido, o grupo de Caroline Philpott vem realizando estudos que apontam para a natureza proteica de LIP, sugerindo que as proteínas PCBP (proteína de ligação a região poli citosina de RNAs; *Poly r(C) binding proteins*,) são ligantes do LIP e atuam como chaperonas de ferro. As proteínas da família PCBP são compostas por três domínios discretos denominados domínios KH. Estudo com o domínio truncado KH3 purificado mostra que o Fe(II) se coordena através de resíduos de cisteína e glutamato conservados com uma constante de dissociação para Fe(II) de 4,2 μM , que é muito baixa para uma ligação intracelular de Fe(II)²⁶. Na presença de 5 mM GSH, que supostamente se liga alostericamente ao domínio KH3, o valor de K_d para Fe(II) diminui aproximadamente cinco vezes ($K_d = 0,80 \mu\text{M}$)²⁶, mas ainda é uma ordem de magnitude maior do que o valor de K_d determinado em RAW 264,7. No entanto, estudos celulares sugerem que as proteínas PCBP1 e PCBP2 de humanos interagem fisicamente e supostamente trocam o Fe(II) com proteínas importantes do mecanismo homeostático de ferro como ferritina e DMTP e ferro-enzimas citosólicas mono e binucleares⁸¹. Essas informações e evidências sugere fortemente que as PCBPs atuam como chaperonas de ferro, desempenhando papéis centrais no transporte e entrega segura de ferro intracelular. Pode ser que as proteínas PCBP íntegras apresentem maior afinidade por Fe(II). Ainda que os demais domínios não apresentam sítios de coordenação para Fe(II) semelhantes, estes podem influenciar o domínio KH3 conformacionalmente, resultando em maior afinidade de Fe(II). Essa possibilidade ainda não foi investigada até o momento, entretanto.

Essa abordagem foi estendida para outros modelos celulares por um integrante do grupo de pesquisa (Gabriel Simonetti): células humanas de hepatócitos (HEPG2), glioblastoma (U87-MG) e células de rim embrionário (HEK 293). Isso talvez indique que o LIP tem identidade semelhante em todos os tipos de células testados até agora. Dado o papel biológico conceitual do complexo CLIP como chaperona de ferro, é razoável que a identidade e as propriedades químicas do LIP sejam semelhantes em diferentes tipos de células. Notavelmente, o K_d celular para CLIP em diferentes tipos de células (na faixa de $10^{-2} \mu\text{M}$) indica uma afinidade termodinâmica

de Fe(II) maior ou tão alta quanto muitas proteínas de ferro não-heme citosólicas e, como consequência e como supracitado, LIP está predominantemente na forma CLIP nos tipos de células testados. É importante ressaltar que a alta afinidade do CLIP não deve ser vista como impeditiva de sua função de chaperona de ferro. Em vez disso, parece ser uma propriedade comum de chaperonas de metais de transição. Essas propriedades garantem o transporte eficaz de LIP por CLIP, deixando um complexo aquoso ferroso residual muito baixo, evitando o compartilhamento de ferro com outras proteínas e ligantes não proteicos citosólicos que são potenciais quelantes de Fe(II). Concordante a isso, as baixas concentrações de complexos aquosos de outros metais de transição biologicamente relevantes, como Cu (I), Zn (II) e Ni (II). As chaperonas conhecidas de Cu(I) e Zinco (II) têm alta afinidade para o respectivo íon de metal de transição⁸⁹. Considerando CLIP uma proteína, esta poderia ter interações físicas específicas com apo-ferroproteínas, conferindo a ela a seletividade que permitiria alterações conformacionais que diminuem sua afinidade por Fe(II), facilitando a entrega do cofator Fe(II) ao sítio ativo na proteína recém traduzida. Essa é uma característica comum de metalochaperonas de metais de transição. Chaperonas apresentam sítios de coordenação incomuns que presumivelmente diminuem a afinidade pelo íon do metal de transição ao se associarem a proteínas receptoras. Esse mecanismo, que pode ou não ser associado a mudanças pós-traducionais na proteína receptora, permitiria passagem vetorial do íon do metal de transição. A estabilidade termodinâmica de metaloproteínas para a troca do metal transição com outras proteínas, em alguns casos, segue a lógica da espécie de menor afinidade para a de maior. Transferrina apresenta maior afinidade para Fe(III) (espécie de entrada, extracelular) comparada a Fe(II) (espécie de saída, intracelular), facilitando que Fe(II) seja entregue/captado por proteínas de maior afinidade no citosol celular, por exemplo, proteínas que tem como principal função a atividade chaperona de ferro normalmente apresentam maior afinidade por Fe(II) do que apresenta a transferrina, com K_d de $6,2 \times 10^{-4}$ e $3,2 \times 10^{-3}$ M para o primeiro e segundo Fe(II) adicionados, respectivamente ^{90; 91}.

Como CLIP e metaloproteínas tem afinidade comparáveis por Fe(II), do ponto de vista termodinâmico, em tese, a calceína (CA) poderia complexar e revelar o ferro de ferroproteínas citosólicas. Contudo, não é o que parece acontecer, pois a concentração intracelular de C_T e LIP_T são da ordem de sub-micromolar. Caso

contrário, os valores de concentração para estas espécies seriam exorbitantemente muito maiores, o que nos leva a assumir que as propriedades físicas e cinéticas são mais relevantes ou que o ferro(II) de ferro proteínas seja fisicamente inacessível a ligantes como CA e provavelmente GSH. O processo de substituição do seu centro metálico ao qual ferropoteínas são submetidas é pouco conhecido, mas talvez este seja um processo lento devido a fortes ligações e propriedade quelante exercido pelo sitio estrutural de ferropoteínas. Assim, muito provavelmente o ferro em ferropoteínas seja fisicamente inacessível a ligantes como CA e GSH. Por outro lado, o ferro lábil celular citosólico que CA tem acesso está termodinâmica e cineticamente disponível, embora este esteja fortemente ligado ao(s) ligante(s) celular(es). Embora assumidamente especulativo, propriedades como estas supracitadas são de grande importância em proteínas com atividade chaperona.

5. Conclusões

Este trabalho abordou propriedades fundamentais de LIP, tanto de natureza termodinâmica quanto da sua reatividade. Pela modificação de um método fluorescente existente usando o indicador fluorescente Calceína foi possível quantificar LIP citosólico total como o limite da concentração do complexo de Calceína e LIP (CALIP) e investigar modelos para a identidade citosólica de LIP. Os resultados indicam que para células RAW 264.7, LIP citosólico total (LIP_T) se encontra na faixa de baixo μM e são coerentes com a hipótese de que LIP citosólico esteja predominantemente complexado a um ou uma coleção de constituintes celulares (CLIP) com considerável afinidade termodinâmica ($K_d \approx 10^{-2} \mu M$), rivalizando com ferro-proteínas citosólicas conhecidas. A concentração total desse ligante seria apenas pouco maior do que LIP_T , mas suficiente para que todo LIP esteja na forma CLIP. Especulativamente, CLIP pode representar proteína(s) com atividade de chaperona de ferro. Abordamos também dúvidas suscitadas no estudo anterior do grupo que identificou possível reatividade de LIP com peroxinitrito ou com derivados radiculares desse oxidante. Demonstramos que LIP não reage com o radical NO_2^{\cdot} e provavelmente também não reage com outros radicais derivados de peroxinitrito. A hipótese mais provável e mais racional, portanto, é uma reação direta entre LIP e peroxinitrito. Baseados em um modelo reacional simplificado para a oxidação dependente de peroxinitrito do indicador oxidável, a hipotética reação entre LIP e peroxinitrito apresenta características catalíticas e tem constante de velocidade elevada (entre $10^6 - 10^7 M^{-1}s^{-1}$), sugerindo que LIP possa ser um sistema peroxinitrito redutase competitivo.

Juntas, essas observações ampliam as visões ortodoxas sobre a identidade, funções e reatividade de LIP citosólico e pode orientar estudos futuros nas diferentes áreas nas quais LIP é relevante, desde processos redox até homeostase celular de ferro.

6. Referências bibliográficas

- 1 CHEN, C. Y.; PAW, B. H. Cellular and mitochondrial iron homeostasis in vertebrates. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research**, v. 1823, n. 9, p. 1459-1467, Sep 2012. ISSN 0167-4889. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000307918100008 >.
- 2 LANE, D. J. R. et al. Cellular iron uptake, trafficking and metabolism: Key molecules and mechanisms and their roles in disease. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research**, v. 1853, n. 5, p. 1130-1144, May 2015. ISSN 0167-4889. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000353176700023 >.
- 3 RAZA, M. et al. Cellular Iron Homeostasis and Therapeutic Implications of Iron Chelators in Cancer. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 15, n. 12, p. 1125-1140, 2014. ISSN 1389-2010. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000345960900005 >.
- 4 KRISHNAMURTHY, P.; XIE, T.; SCHUETZ, J. D. The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 114, n. 3, p. 345-358, Jun 2007. ISSN 0163-7258. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000247615000008 >.
- 5 CABANTCHIK, Z. I. Labile iron in cells and body fluids: physiology, pathology, and pharmacology. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, p. 11, Mar 2014. ISSN 1663-9812. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000347057600001 >.
- 6 EISENSTEIN, R. S.; ROSS, K. L. Novel roles for iron regulatory proteins in the adaptive response to iron deficiency. **Journal of Nutrition**, v. 133, n. 5, p. 1510S-1516S, May 2003. ISSN 0022-3166. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000182828100021 >.
- 7 DONOVAN, A. et al. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. **Nature**, v. 403, n. 6771, p. 776-781, Feb 2000. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000085423100054 >.
- 8 MCKIE, A. T. et al. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. **Molecular Cell**, v. 5, n. 2, p. 299-309, Feb 2000. ISSN 1097-2765. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000085645100010 >.
- 9 HENTZE, M. W.; KUHN, L. C. Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 16, p. 8175-8182, Aug 1996. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996VB32500005 >.
- 10 NANDAL, A. et al. Activation of the HIF Prolyl Hydroxylase by the Iron Chaperones PCBP1 and PCBP2. **Cell Metabolism**, v. 14, n. 5, p. 647-657, Nov 2011. ISSN 1550-4131. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000297142200010 >.
- 11 HENTZE, M. W.; MUCKENTHALER, M. U.; ANDREWS, N. C. Balancing acts: Molecular control of mammalian iron metabolism. **Cell**, v. 117, n. 3, p. 285-297, Apr 2004. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000221176400004 >.

- 12 KAKHLON, O.; CABANTCHIK, Z. I. The labile iron pool: Characterization, measurement, and participation in cellular processes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 8, p. 1037-1046, Oct 2002. ISSN 0891-5849. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000178566000003 >.
- 13 CRICHTON, R. R.; DECLERCQ, J. P. X-ray structures of ferritins and related proteins. **Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1800, n. 8, p. 706-718, Aug 2010. ISSN 0304-4165. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000279652000004 >.
- 14 EGYED, A.; SALTMAN, P. IRON IS MAINTAINED AS FE(II) UNDER AEROBIC CONDITIONS IN ERYTHROID-CELLS. **Biological Trace Element Research**, v. 6, n. 4, p. 357-364, 1984. ISSN 0163-4984. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1984TL68400008 >.
- 15 BREUER, W.; EPSZTEJN, S.; CABANTCHIK, Z. I. IRON ACQUIRED FROM TRANSFERRIN BY K562 CELLS IS DELIVERED INTO A CYTOPLASMIC POOL OF CHELATABLE IRON(II). **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 41, p. 24209-24215, Oct 1995. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1995TA21700054 >.
- 16 PETRAT, F. et al. Selective determination of mitochondrial chelatable iron in viable cells with a new fluorescent sensor. **Biochemical Journal**, v. 362, p. 137-147, Feb 2002. ISSN 0264-6021. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000173990400017 >.
- 17 BREUER, W.; SHVARTSMAN, M.; CABANTCHIK, Z. I. Intracellular labile iron. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 40, n. 3, p. 350-354, 2008. ISSN 1357-2725. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000254119100005 >.
- 18 SHVARTSMAN, M.; IOAV CABANTCHIK, Z. Intracellular iron trafficking: role of cytosolic ligands. **Biometals**, v. 25, n. 4, p. 711-23, Aug 2012. ISSN 1572-8773. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22350471> >.
- 19 KOPPENOL, W. H.; HIDER, R. H. Iron and redox cycling. Do's and don'ts. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 133, p. 3-10, Mar 2019. ISSN 0891-5849. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000457712300002 >.
- 20 HAMED, M. Y.; SILVER, J.; WILSON, M. T. STUDIES OF THE REACTIONS OF FERRIC IRON WITH GLUTATHIONE AND SOME RELATED THIOLS. **Inorganica Chimica Acta-Bioinorganic Chemistry**, v. 78, n. 1, p. 1-11, 1983. ISSN 0020-1693. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1983QB02400004 >.
- 21 HAMED, M. Y.; SILVER, J. STUDIES ON THE REACTIONS OF FERRIC IRON WITH GLUTATHIONE AND SOME RELATED THIOLS .2. COMPLEX-FORMATION IN THE PH RANGE 3 TO 7. **Inorganica Chimica Acta-Bioinorganic Chemistry**, v. 80, n. 3, p. 115-122, 1983. ISSN 0020-1693. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1983RF66200011 >.

- 22 HAMED, M. Y.; SILVER, J.; WILSON, M. T. STUDIES ON THE REACTIONS OF FERRIC IRON WITH GLUTATHIONE AND SOME RELATED THIOLS .3. A STUDY OF THE IRON CATALYZED OXIDATION OF GLUTATHIONE BY MOLECULAR-OXYGEN. **Inorganica Chimica Acta-Bioinorganic Chemistry**, v. 80, n. 5, p. 237-244, 1983. ISSN 0020-1693. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1983RQ70900005 >.
- 23 SILVER, J.; HAMED, M. Y.; MORRISON, I. E. G. STUDIES OF THE REACTIONS OF FERRIC IRON WITH GLUTATHIONE AND SOME RELATED THIOLS .5. SOLID COMPLEXES CONTAINING FEII AND GLUTATHIONE OR FEIII WITH OXIDIZED GLUTATHIONE. **Inorganica Chimica Acta-Bioinorganic Chemistry**, v. 107, n. 3, p. 169-178, 1985. ISSN 0020-1693. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1985ANB2600005 >.
- 24 SILVA, A. M. N. et al. Iron(III) citrate speciation in aqueous solution. **Dalton Transactions**, n. 40, p. 8616-8625, 2009. ISSN 1477-9226. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000270593400022 >.
- 25 PHILPOTT, C. C.; PATEL, S. J.; PROTCHENKO, O. Management versus miscues in the cytosolic labile iron pool: The varied functions of iron chaperones. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research**, v. 1867, n. 11, p. 9, Nov 2020. ISSN 0167-4889. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000565326000018 >.
- 26 PATEL, S. J. et al. A PCBP1-Bola2 chaperone complex delivers iron for cytosolic 2Fe-2S cluster assembly. **Nature Chemical Biology**, v. 15, n. 9, p. 872+, Sep 2019. ISSN 1552-4450. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000481649500010 >.
- 27 BREUER, W.; EPSZTEJN, S.; CABANTCHIK, Z. I. Dynamics of the cytosolic chelatable iron pool of K562 cells. **Febs Letters**, v. 382, n. 3, p. 304-308, Mar 1996. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996UB79100017 >.
- 28 ZHANG, D. L.; GHOSH, M. C.; ROUAULT, T. A. The physiological functions of iron regulatory proteins in iron homeostasis - an update. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, p. 12, Jun 2014. ISSN 1663-9812. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000347099400001 >.
- 29 ROUAULT, T. A. The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. **Nature Chemical Biology**, v. 2, n. 8, p. 406-414, Aug 2006. ISSN 1552-4450. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000239146800008 >.
- 30 PANTOPOULOS, K. Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system - An update. **Redox-Active Metals in Neurological Disorders**, v. 1012, p. 1-13, 2004. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000221503700001 >.
- 31 TRUZZI, D. R. et al. The Peroxidatic Thiol of Peroxiredoxin 1 is Nitrosated by Nitrosoglutathione but Coordinates to the Dinitrosyl Iron Complex of Glutathione. **Antioxidants**, v. 9, n. 4, p. 20, Apr 2020. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000536961200066 >.

- 32 PEREIRA, J. C. M. et al. Dinitrosyl Iron Complexes with Cysteine. Kinetics Studies of the Formation and Reactions of DNICs in Aqueous Solution. **Journal of the American Chemical Society**, v. 137, n. 1, p. 328-336, Jan 2015. ISSN 0002-7863. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000348483500061 >.
- 33 FUJIKAWA, M.; KOBAYASHI, K.; KOZAWA, T. Mechanistic studies on formation of the dinitrosyl iron complex of the 2Fe-2S cluster of SoxR protein. **Journal of Biochemistry**, v. 156, n. 3, p. 163-172, Sep 2014. ISSN 0021-924X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000342967600005 >.
- 34 CHENG, Z. S. et al. Binding of Nitric Oxide in CDGSH-type 2Fe-2S Clusters of the Human Mitochondrial Protein Miner2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 8, p. 3146-3153, Feb 2017. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000395538800008 >.
- 35 WILEY, S. E. et al. The outer mitochondrial membrane protein mitoNEET contains a novel redox-active 2Fe-2S cluster. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 33, p. 23745-23749, Aug 2007. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000248686600002 >.
- 36 LI, Q. et al. Nitrosothiol Formation and Protection against Fenton Chemistry by Nitric Oxide-induced Dinitrosyliron Complex Formation from Anoxia-initiated Cellular Chelatable Iron Increase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 29, p. 19917-19927, Jul 2014. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000339395200010 >.
- 37 TOLEDO, J. C. et al. Nitric Oxide-induced Conversion of Cellular Chelatable Iron into Macromolecule-bound Paramagnetic Dinitrosyliron Complexes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 43, p. 28926-28933, Oct 2008. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000260179900018 >.
- 38 SHAMOVA, E. V. et al. Effect of Dinitrosyl Iron Complexes on Platelet Aggregation Induced by HeLa Cervical Carcinoma Cells. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 150, n. 3, p. 372-374, Jan 2011. ISSN 0007-4888. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000286935700024 >.
- 39 VANIN, A. F. et al. Vasorelaxing activity of stable powder preparations of dinitrosyl iron complexes with cysteine or glutathione ligands. **Nitric Oxide-Biology and Chemistry**, v. 16, n. 3, p. 322-330, May 2007. ISSN 1089-8603. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000245930000002 >.
- 40 SHEKHTER, A. B. et al. Dinitrosyl-iron complexes with cysteine or glutathione accelerate skin wound healing in animals. **Biofizika**, v. 52, n. 3, p. 539-547, May-Jun 2007. ISSN 0006-3029. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000247335800020 >.
- 41 HASSANNIA, B.; VANDENABEELE, P.; VANDEN BERGHE, T. Targeting Ferroptosis to Iron Out Cancer. **Cancer Cell**, v. 35, n. 6, p. 830-849, Jun 2019. ISSN 1535-6108. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000470851400005 >.

- 42 DIXON, S. J.; STOCKWELL, B. R. The Hallmarks of Ferroptosis. In: JACKS, T. e SAWYERS, C. L. (Ed.). **Annual Review of Cancer Biology, Vol 3**. Palo Alto: Annual Reviews, v.3, 2019. p.35-54. (Annual Review of Cancer Biology-Series).
- 43 SCHONBERG, D. L. et al. Preferential Iron Trafficking Characterizes Glioblastoma Stem-like Cells. **Cancer Cell**, v. 28, n. 4, p. 441-455, Oct 2015. ISSN 1535-6108. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000362848800009 >.
- 44 MAI, T. T. et al. Salinomycin kills cancer stem cells by sequestering iron in lysosomes. **Nature Chemistry**, v. 9, n. 10, p. 1025-1033, Oct 2017. ISSN 1755-4330. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000411474800018 >.
- 45 CONRAD, M. et al. Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 5, p. 348-366, May 2016. ISSN 1474-1776. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000375257900014 >.
- 46 YANG, W. S.; STOCKWELL, B. R. Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-RAS-harboring cancer cells. **Chemistry & Biology**, v. 15, n. 3, p. 234-245, Mar 2008. ISSN 1074-5521. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000254570500009 >.
- 47 YAGODA, N. et al. RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels. **Nature**, v. 447, n. 7146, p. 864-868, Jun 2007. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000247207500046 >.
- 48 SHEFTEL, A.; STEHLING, O.; LILL, R. Iron-sulfur proteins in health and disease. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 21, n. 5, p. 302-314, May 2010. ISSN 1043-2760. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000278674600006 >.
- 49 WARDMAN, P.; CANDEIAS, L. P. Fenton chemistry: An introduction. **Radiation Research**, v. 145, n. 5, p. 523-531, May 1996. ISSN 0033-7587. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1996UH19100001 >.
- 50 YAMAZAKI, I.; PIETTE, L. H. ESR SPIN-TRAPPING STUDIES ON THE REACTION OF FE-2+ IONS WITH H2O2-REACTIVE SPECIES IN OXYGEN-TOXICITY IN BIOLOGY. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 23, p. 13589-13594, Aug 1990. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1990DU27500032 >.
- 51 HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine** FIFTH EDITION. 2015.
- 52 GLIGOROVSKI, S. et al. Environmental Implications of Hydroxyl Radicals (center dot OH). **Chemical Reviews**, v. 115, n. 24, p. 13051-13092, Dec 2015. ISSN 0009-2665. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000367563000001 >.

- 53 TARPEY, M. M.; FRIDOVICH, I. Methods of detection of vascular reactive species - Nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. **Circulation Research**, v. 89, n. 3, p. 224-236, Aug 2001. ISSN 0009-7330. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000170313200005 >.
- 54 STOYANOVSKY, D. A. et al. Iron catalysis of lipid peroxidation in ferroptosis: Regulated enzymatic or random free radical reaction? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 133, p. 153-161, Mar 2019. ISSN 0891-5849. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000457712300017 >.
- 55 DAVIES, M. J.; SLATER, T. F. STUDIES ON THE METAL-ION AND LIPOXYGENASE-CATALYZED BREAKDOWN OF HYDROPEROXIDES USING ELECTRON-SPIN-RESONANCE SPECTROSCOPY. **Biochemical Journal**, v. 245, n. 1, p. 167-173, Jul 1987. ISSN 0264-6021. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1987J077900022 >.
- 56 KAIM, W., SCHWEDERSK, B., & KLEIN, A. **Bioinorganic chemistry: inorganic elements in the chemistry of life : an introduction and guide** . 2nd edition. wiley, 2013.
- 57 KISSNER, R. et al. Formation and properties of peroxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis. **Chemical Research in Toxicology**, v. 10, n. 11, p. 1285-1292, Nov 1997. ISSN 0893-228X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1997YH25200013 >.
- 58 SZABO, C. The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. **Shock**, v. 6, n. 2, p. 79-88, Aug 1996. ISSN 1073-2322. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1996VB27000001 >.
- 59 KOPPENOL, W. H. et al. Peroxynitrous acid: controversy and consensus surrounding an enigmatic oxidant. **Dalton Transactions**, v. 41, n. 45, p. 13779-13787, 2012. ISSN 1477-9226. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000310371500001 >.
- 60 FERRER-SUETA, G.; RADI, R. Chemical Biology of Peroxynitrite: Kinetics, Diffusion, and Radicals. **Acs Chemical Biology**, v. 4, n. 3, p. 161-177, Mar 2009. ISSN 1554-8929. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000264535100004 >.
- 61 LYMAR, S. V.; HURST, J. K. RAPID REACTION BETWEEN PEROXONITRITE ION AND CARBON-DIOXIDE - IMPLICATIONS FOR BIOLOGICAL-ACTIVITY. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 34, p. 8867-8868, Aug 1995. ISSN 0002-7863. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1995RR73500027 >.
- 62 DENICOLA, A. et al. Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: Kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 333, n. 1, p. 49-58, Sep 1996. ISSN 0003-9861. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1996VD62900007 >.

- 63 BONINI, M. G. et al. Direct EPR detection of the carbonate radical anion produced from peroxynitrite and carbon dioxide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 16, p. 10802-10806, Apr 1999. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000079751900023 >.
- 64 AUGUSTO, O. et al. Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: Two emerging radicals in biology. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, n. 9, p. 841-859, May 2002. ISSN 0891-5849. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000175291200008 >.
- 65 DAMASCENO, F. C. et al. The labile iron pool attenuates peroxynitrite-dependent damage and can no longer be considered solely a pro-oxidative cellular iron source. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 22, p. 8530-8542, Jun 2018. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000434205700017 >.
- 66 BURNEY, S. et al. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 424, n. 1-2, p. 37-49, Mar 1999. ISSN 0027-5107. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000079117000004 >.
- 67 PONKA, P. et al. STUDY OF INTRACELLULAR IRON-METABOLISM USING PYRIDOXAL ISONICOTINOYL HYDRAZONE AND OTHER SYNTHETIC CHELATING-AGENTS. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 586, n. 2, p. 278-297, 1979. ISSN 0006-3002. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1979HG25500007 >.
- 68 AKAIKE, T.; MAEDA, H. **Direct quantitation of nitric oxide released from cells using liposome-encapsulated PTIO**. 4th International Meeting on the Biology of Nitric Oxide. Amelia Isl, Fl: Portland Press Ltd. Sep, 1995. 171-171 p.
- 69 ESPEY, M. G. et al. Focusing of nitric oxide mediated nitrosation and oxidative nitrosylation as a consequence of reaction with superoxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 17, p. 11127-11132, Aug 2002. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000177606900034 >.
- 70 GOLDSTEIN, S.; CZAPSKI, G. Indirect oxidation of ferrocyanide by peroxynitrite - Evidence against the formation of hydroxyl radicals. **Nitric Oxide-Biology and Chemistry**, v. 1, n. 5, p. 417-422, Oct 1997. ISSN 1089-8603. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000072975600005 >.
- 71 HUIE, R. E. THE REACTION-KINETICS OF NO₂. **Toxicology**, v. 89, n. 3, p. 193-216, May 1994. ISSN 0300-483X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1994NU84200003 >.
- 72 CONDELES, A. L.; TOLEDO, J. C. The Labile Iron Pool Reacts Rapidly and Catalytically with Peroxynitrite. **Biomolecules**, v. 11, n. 9, p. 19, Sep 2021. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000699377500001 >.
- 73 SHIMADA, H. et al. Mitochondrial NADH-quinone oxidoreductase of the outer membrane is responsible for paraquat cytotoxicity in rat livers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.

- 351, n. 1, p. 75-81, Mar 1998. ISSN 0003-9861. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000072310900011 >.
- 74 DAMASCENO, F. C. et al. Mechanisms and kinetic profiles of superoxide-stimulated nitrosative processes in cells using a diaminofluorescein probe. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 77, p. 270-280, Dec 2014. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000346392500026 >.
- 75 LOPES, A. K. B. **Reatividade de ferro lábil com peroxinitrito**. 2017. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo
- 76 WANG, M. C. et al. Version 4.0 of PaxDb: Protein abundance data, integrated across model organisms, tissues, and cell-lines. **Proteomics**, v. 15, n. 18, p. 3163-3168, Sep 2015. ISSN 1615-9853. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000362503900007 >.
- 77 YANG, Y. S.; BALCARCEL, R. R. Determination of carbon dioxide production rates for mammalian cells in 24-well plates. **Biotechniques**, v. 36, n. 2, p. 286-+, Feb 2004. ISSN 0736-6205. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000188882400014 >.
- 78 HIDER, R. C.; KONG, X. L. Glutathione: a key component of the cytoplasmic labile iron pool. **Biometals**, v. 24, n. 6, p. 1179-1187, Dec 2011. ISSN 0966-0844. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000297117100018 >.
- 79 CHO, E. A. et al. Differential in vitro and cellular effects of iron chelators for hypoxia inducible factor hydroxylases. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 114, n. 4, p. 864-873, Apr 2013. ISSN 0730-2312. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000315219000014 >.
- 80 SHI, H. F. et al. A cytosolic iron chaperone that delivers iron to ferritin. **Science**, v. 320, n. 5880, p. 1207-1210, May 2008. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000256233000036 >.
- 81 FREY, A. G. et al. Iron chaperones PCBP1 and PCBP2 mediate the metallation of the dinuclear iron enzyme deoxyhypusine hydroxylase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 22, p. 8031-8036, Jun 2014. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000336687900047 >.
- 82 LEFFERS, H.; DEJGAARD, K.; CELIS, J. E. CHARACTERIZATION OF 2 MAJOR CELLULAR POLY(RC)-BINDING HUMAN PROTEINS, EACH CONTAINING 3 K-HOMOLOGOUS (KH) DOMAINS. **European Journal of Biochemistry**, v. 230, n. 2, p. 447-453, Jun 1995. ISSN 0014-2956. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1995RC83700010 >.
- 83 BOSWORTH, C. A. et al. Dinitrosyliron complexes and the mechanism(s) of cellular protein nitrosothiol formation from nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 12, p. 4671-4676, Mar 2009. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000264522600020 >.

- 84 WINTERBOURN, C. C.; KETTLE, A. J. Redox Reactions and Microbial Killing in the Neutrophil Phagosome. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 6, p. 642-660, Feb 2013. ISSN 1523-0864. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000313673400005 >.
- 85 EXNER, M.; HEROLD, S. Kinetic and mechanistic studies of the peroxynitrite-mediated oxidation of oxymyoglobin and oxyhemoglobin. **Chemical Research in Toxicology**, v. 13, n. 4, p. 287-293, Apr 2000. ISSN 0893-228X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000086631200011 >.
- 86 KAKHLON, O.; GRUENBAUM, Y.; CABANTCHIK, Z. L. Repression of ferritin expression increases the labile iron pool, oxidative stress, and short-term growth of human erythroleukemia cells. **Blood**, v. 97, n. 9, p. 2863-2871, May 2001. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000168516200048 >.
- 87 TRUZZI, D. R.; AUGUSTO, O.; FORD, P. C. Thiyl radicals are co-products of dinitrosyl iron complex (DNIC) formation. **Chemical Communications**, v. 55, n. 62, p. 9156-9159, Aug 2019. ISSN 1359-7345. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000477960000019 >.
- 88 ZHOU, Y. et al. Genetic analysis of tissue glutathione concentrations and redox balance. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 71, p. 157-164, Jun 2014. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000336891100014 >.
- 89 XIAO, Z. G.; WEDD, A. G. The challenges of determining metal-protein affinities. **Natural Product Reports**, v. 27, n. 5, p. 768-789, 2010. ISSN 0265-0568. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000277359700011 >.
- 90 HARRIS, W. R. ESTIMATION OF THE FERROUS TRANSFERRIN BINDING CONSTANTS BASED ON THERMODYNAMIC STUDIES OF NICKEL(II) TRANSFERRIN. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 27, n. 1, p. 41-52, May 1986. ISSN 0162-0134. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1986C794500004 >.
- 91 JIANG, D. L. et al. Ternary Complexes of Iron, Amyloid-beta, and Nitritotriacetic Acid: Binding Affinities, Redox Properties, and Relevance to Iron-Induced Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. **Biochemistry**, v. 48, n. 33, p. 7939-7947, Aug 2009. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000269044800018 >.

Apêndices

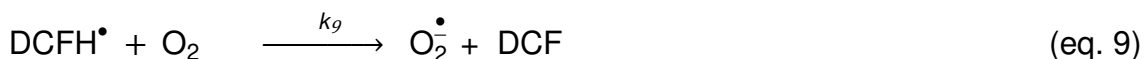
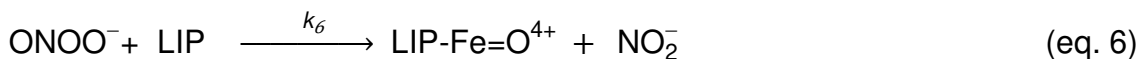
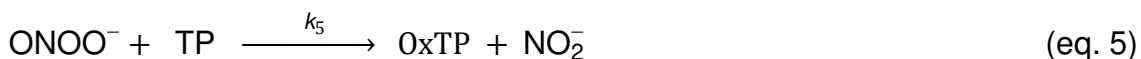
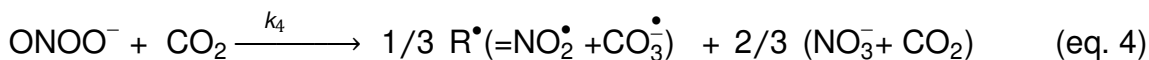
APÊNDICE A - Modelo de reações para a oxidação de H₂DCF por radicais oxidantes derivados de peroxinitrito em células.

Um modelo reacional simplificado para a oxidação de H₂DCF dependentes de peroxinitrito em células é apresentada em detalhes abaixo. A numeração apresentada não reflete a utilizada no texto principal. Começando pela equação de formação de peroxinitrito que é representado como a combinação entre NO• e O₂• derivado de paraquat (equação 3). Com base no valor de pka do ONOO⁻ (6,9) optamos por assumir que a decomposição catalisada por protonação do ONOO⁻ é desprezível quando comparada a decomposição catalisada por CO₂ nas nossas condições experimentais. Também, que a autooxidação de NO• foi racionalmente e experimentalmente descartada como fonte relevante de NO₂•. Portanto, assumimos que todo radical NO₂• e CO₃• formado é proveniente da reação de peroxinitrito com CO₂ (equação 4). Com a finalidade de simplificar, todos os radicais derivados de peroxinitrito foram representados coletivamente por R• (NO₂• + CO₃•) nas equações 4, 7 e 8. Como a concentração em estado estacionário destes radicais é baixa, consideramos que as reações de desproporcionamento e recombinação são pouco relevantes em células.

O peroxinitrito reage com uma grande variedade de alvos intracelulares, sendo assim, todas as reações diretas de peroxinitrito, exceto com CO₂ (equação 4) e ferro lábil (equação 6), e todas as reações de derivados radicalares de peroxinitrito exceto com H₂DCF (equação 8), são representadas de forma genérica pelas equações 5 e 7, respectivamente. Possíveis alvos como peroxiredoxinas, glutathiona peroxidases, metaloperoxidases e proteínas são representados por TP, enquanto a forma oxidada dessas enzimas é representada por oxTP. Os demais constituintes celulares que podem ser alvos de radicais derivados de peroxinitrito estão denominados como CC (equação 7).

O modelo proposto é válido para a fase inicial das reações, uma vez que estamos omitindo do modelo reações de redução que possivelmente vem restabelecer as formas oxidadas do ferro lábil e TP. Isso fica mais claro quando analisamos a oxidação do H₂DCF intracelular dependente de peroxinitrito, onde é observado uma linearidade nos experimentos (Figura 11A, texto principal) , sugerindo que as

concentrações de LIP e TP reativas a peroxinitrito estão na condição de estado estacionário, o que permite as devidas aproximações.



A dismutação de DCF^\bullet em H_2DCF e DCF foi desconsiderada tendo em vista sua baixa concentração de estado estacionário e seu rápido consumo pela reação com O_2 ($k_9 \approx 1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, eq. 9). Ainda, a quantidade de superóxido produzido pela reação da equação 9 é desprezível quando comparada a produzida por paraquat nas nossas condições experimentais.

A taxa de formação intracelular de DCF é dada pela equação 10 abaixo.

$$\frac{d[\text{DCF}]}{dt} = k_9 [\text{DCFH}^\bullet][\text{O}_2] \quad (\text{eq. 10})$$

A lei de velocidade para R^\bullet é dada pela equação 11, onde o termo $2/3$ é utilizado como correção de rendimento para a formação de NO_2^\bullet e CO_3^\bullet da equação 4.

$$\frac{d[\text{R}^\bullet]}{dt} = 2/3 k_4 [\text{ONOO}^-][\text{CO}_2] - k_7 [\text{CC}][\text{R}^\bullet] - k_8 [\text{H}_2\text{DCF}][\text{R}^\bullet] \quad (\text{eq. 11})$$

Nós assumimos a condição de estado estacionário para a concentração de R^\bullet na equação 11, uma vez representa todas as espécies reativas de radicais, que quando resolvida para a concentração de peroxinitrito em estado estacionário obtemos a equação 12 abaixo.

$$[\text{ONOO}^-] = \frac{[\text{R}^\bullet] (k_7 [\text{CC}] + k_8 [\text{H}_2\text{DCF}])}{2/3 k_4 [\text{CO}_2]} \quad (\text{eq. 12})$$

A lei de velocidade para peroxinitrito pode ser dada pela equação 13, a partir das equações 5 a 8, que assumindo novamente a condição de estado estacionário e resolvendo-a para peroxinitrito obtemos a equação 14.

$$\frac{d [\text{ONOO}^-]}{dt} =$$

$$k_3 [\text{NO}^\bullet][\text{O}_2^\bullet] - k_4 [\text{ONOO}^-][\text{CO}_2] - k_5 [\text{ONOO}^-][\text{TP}] - k_6 [\text{ONOO}^-][\text{LIP}] \quad (\text{eq. 13})$$

$$[\text{ONOO}^-] = \frac{k_3 [\text{NO}^\bullet][\text{O}_2^\bullet]}{(k_4 [\text{CO}_2] + k_5 [\text{TP}] + k_6 [\text{LIP}])} \quad (\text{eq. 14})$$

Em seguida, igualamos as equações 12 e 13 e resolvendo-a para R^\bullet obtemos a equação para a concentração de R^\bullet no estado estacionário (equação 15).

$$[\text{R}^\bullet] = \frac{2/3 k_3 [\text{NO}^\bullet][\text{O}_2^\bullet] k_4 [\text{CO}_2]}{(k_4 [\text{CO}_2] + k_5 [\text{TP}] + k_6 [\text{LIP}]) (k_7 [\text{CC}] + k_8 [\text{H}_2\text{DCF}])} \quad (\text{eq. 15})$$

A lei de velocidade para a formação do radical DCFH^\bullet é dada pela equação 16 abaixo.

$$\frac{d [\text{DCFH}^\bullet]}{dt} = k_8 [\text{R}^\bullet][\text{H}_2\text{DCF}] - k_9 [\text{DCFH}^\bullet][\text{O}_2] \quad (\text{eq. 16})$$

Assumindo a condição de estado estacionário para este radical podemos escrever a seguinte equação para sua concentração (equação 17).

$$[\text{DCFH}^\bullet] = \frac{k_8 [\text{R}^\bullet][\text{H}_2\text{DCF}]}{k_9 [\text{O}_2]} \quad (\text{eq. 17})$$

Substituindo o termo da concentração de R^\bullet (equação 15) na equação 17 acima obtemos a equação 18 abaixo.

$$[\text{DCFH}^\bullet] = \frac{2/3 k_3 [\text{NO}^\bullet][\text{O}_2^\bullet] k_4 [\text{CO}_2] k_8 [\text{H}_2\text{DCF}]}{(k_4 [\text{CO}_2] + k_5 [\text{TP}] + k_6 [\text{LIP}]) (k_7 [\text{CC}] + k_8 [\text{H}_2\text{DCF}]) (k_9 [\text{O}_2])} \quad (\text{eq. 18})$$

Substituindo a solução acima para a concentração de DCFH^\bullet no estado estacionário na equação 10, obtemos a lei de velocidade formação de DCF na ausência de quelante metálico (equação 19).

$$\frac{d [\text{DCF}]}{dt} = \frac{k_3 [\text{NO}^\bullet][\text{O}_2^\bullet] 2/3 k_4 [\text{CO}_2] k_8 [\text{H}_2\text{DCF}]}{(k_4 [\text{CO}_2] + k_5 [\text{TP}] + k_6 [\text{LIP}]) (k_7 [\text{CC}] + k_8 [\text{H}_2\text{DCF}])} \quad (\text{eq. 19})$$

De acordo com o que é observado na equação 19, a velocidade de formação do DCF é aumentada em altos fluxos de NO^\bullet e O_2^\bullet , ou seja, de peroxinitrito. Também, essa velocidade é proporcional a reação de peroxinitrito com CO_2 , assim como a reação dos radicais derivados de peroxinitrito com H_2DCF (eq. 8). Além disso, a

equação 19 nos mostra que a velocidade de formação do DCF será, inversamente dependente as reações competitivas entre peroxinitrito e os constituintes celulares, como TP (eq. 5) e LIP (eq. 6), e dos radicais derivados de peroxinitrito com constituintes celulares (eq. 7).

A taxa de formação de DCF na presença do quelante metálico é dada pela equação 20 abaixo, uma vez que o termo $k_6[LIP]$ é eliminado da equação 19.

$$\frac{d [DCF]}{dt} = \frac{k_3[NO^\bullet][O_2^\bullet] 2/3 k_4 [CO_2] k_8 [H_2DCF]}{(k_4 [CO_2] + k_5 [TP]) (k_7 [CC] + k_8 [H_2DCF])} \quad (\text{eq. 20})$$

Dividindo-se a equação 20 pela equação 19 obtemos o parâmetro adimensional q , termo que representa o aumento na taxa de formação de DCF quando LIP é complexado com quelantes (equação 21). Este parâmetro pode ser determinado experimentalmente pela razão das taxas de formação de DCF nas duas condições, presença e ausência do quelante.

$$q = 1 + \frac{k_6 [LIP]}{k_4 [CO_2] + k_5 [TP]} \quad (\text{eq. 21})$$

Resolvendo a equação 21 para k_6 obtemos uma equação para a constante de velocidade da reação entre LIP e peroxinitrito (equação 22).

$$k_6 = (q - 1) \frac{k_4 [CO_2] + k_5 [TP]}{[LIP]} \quad (\text{eq. 22})$$

Se assumirmos que a concentração de estado estacionário para o O_2^\bullet a partir das equações 2 e 3, seja dada pela equação 23 a seguir, e substituindo-a para a concentração de O_2^\bullet na equação 19, obtemos as equações 24 e 25 para a taxa de formação de DCF na ausência e presença do quelante, respectivamente.

$$[O_2^\bullet] = \frac{k_1}{(k_2[SOD] + k_3[NO^\bullet])} \quad (\text{eq. 23})$$

$$\frac{d [DCF]}{dt} = \frac{k_1 k_3 [NO^\bullet] 2/3 k_4 [CO_2] k_8 [H_2DCF]}{(k_2[SOD] + k_3[NO^\bullet]) (k_4 [CO_2] + k_5 [TP] + k_6 [LIP]) (k_7 [CC] + k_8 [H_2DCF])} \quad (\text{eq. 24})$$



$$\frac{d [DCF]}{dt} =$$

$$\frac{k_1 k_3 [\text{NO}^\bullet]^{2/3} k_4 [\text{CO}_2] k_8 [\text{H}_2\text{DCF}]}{(k_2[\text{SOD}] + k_3[\text{NO}]) (k_4 [\text{CO}_2] + k_5[\text{TP}]) (k_7[\text{CC}] + k_8 [\text{H}_2\text{DCF}])} \quad (\text{eq. 25})$$

Como era esperado, equação 24 mostra que a taxa de formação do DCF é inversamente proporcional a concentração de SOD e dividindo a equação 25 pela equação 24 resulta na equação 21.

Article

The Labile Iron Pool Reacts Rapidly and Catalytically with Peroxynitrite

André Luis Condeles  and José Carlos Toledo Junior * 

Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto 14040-901, Brazil; acondeles@usp.br

* Correspondence: toledo@ffclrp.usp.br; Tel.: +55-16-3315-3755; Fax: +55-16-3633-2660

Abstract: While investigating peroxynitrite-dependent oxidation in murine RAW 264.7 macrophage cells, we observed that removal of the Labile Iron Pool (LIP) by chelation increases the intracellular oxidation of the fluorescent indicator H₂DCF, so we concluded that the LIP reacts with peroxynitrite and decreases the yield of peroxynitrite-derived oxidants. This was a paradigm-shifting finding in LIP biochemistry and raised many questions. In this follow-up study, we address fundamental properties of the interaction between the LIP and peroxynitrite by using the same cellular model and fluorescence methodology. We have identified that the reaction between the LIP and peroxynitrite has catalytic characteristics, and we have estimated that the rate constant of the reaction is in the range of 10⁶ to 10⁷ M⁻¹s⁻¹. Together, these observations suggest that the LIP represents a constitutive peroxynitrite reductase system in RAW 264.7 cells.

Keywords: labile iron pool; nitric oxide; superoxide; peroxynitrite; oxidative stress; nitrogen dioxide



Citation: Condeles, A.L.; Toledo Junior, J.C. The Labile Iron Pool Reacts Rapidly and Catalytically with Peroxynitrite. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1331. <https://doi.org/10.3390/biom11091331>

Academic Editors: Valeria M. Nurchi and Jan Aaseth

Received: 17 June 2021

Accepted: 28 July 2021

Published: 9 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

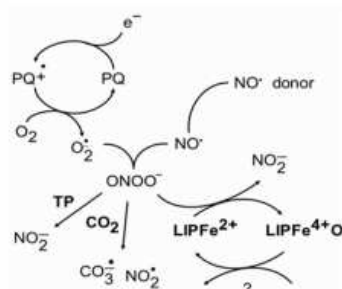
1. Introduction

Iron can coordinate with different types and numbers of ligands to form compounds with different geometries, while reversibly adopting a few stable oxidation and spin states. Such versatility provides iron compounds with different structural and chemical properties, which allow them to engage in fundamentally distinct chemical reactions. In particular, iron-mediated redox reactions are central in numerous biological processes, from biosynthesis to catabolism and energy transduction [1]. The iron pool associated with these physiological functions is firmly and directly bound to proteins or incorporated into protein prosthetic cofactor groups such as heme and iron sulfur-clusters. In contrast, the so-called labile iron pool (LIP) is poorly characterized, but there is growing evidence that the LIP is also protein-bound.

The LIP is defined as the fraction of cellular iron that can be complexed with high-affinity metal chelators [1,2]. Depending on the cell type, the iron content of this pool accounts for 0.1 to 3% of the total cellular iron. Perturbations in the levels of the LIP trigger cellular iron homeostasis mechanisms involving complementary actions that work toward restoring the status of the LIP [3]. For example, a manipulated rise in the LIP in K562 cells was found to be transient and to dissipate within 30 min [4]. These observations indicated that the LIP is under tight cellular homeostatic control and is an essential cellular component [2,3,5]. Currently, the LIP is thought to be primarily present in the ferrous state [4] and serve as a dynamic cellular iron source readily available for incorporation into fresh apo-iron proteins [3]. On the other hand, the LIP is often associated with an elusive cellular iron source that can potentially damage metabolites, macromolecules, and macro-biological structures through reaction with hydrogen peroxide (H₂O₂), which produces oxidants such as the highly reactive hydroxyl radical (OH•) [4,6]. This property is being explored as a potential cancer therapy [7,8]. Indeed, the LIP is often referred to as the redox toxic iron source developing from conditions such as iron overload, and it has been associated with hepatic [9–11] and cardiac [12,13] conditions and brain disorders [3,14–16]. Thus, the same redox activity that makes iron so

physiologically useful may also be dangerous. The central importance of iron in biological systems, its intrinsic toxicity and elusive nature have motivated investigations into the chemical properties and reactivity of the LIP. Previously, our group [17] and others [18–20] showed that the LIP reacts with nitrogen monoxide (nitric oxide, NO^\bullet), producing dinitrosyl iron complexes (DNICs) in RAW 264.7 cells, which are considered stable NO^\bullet carriers. DNICs are potential nitrosylating agents and may directly transfer nitrosyl equivalents to protein cysteine residues via cross-trans-nitrosation reactions [18,21,22], which may be a selective mechanism of protein S-nitrosylation. More recently, we investigated the possible reaction between the LIP and peroxyntirite ($\text{ONOOH}/\text{ONOO}^-$; $\text{pK}_a = 6.9$) in RAW 264.7 cells [23,24]. We selected the macrophage cell line as model for this study for several reasons: (i) macrophages cells are thought to be normally exposed to and to deal with peroxyntirite; (ii) macrophage cells are major players in the systemic iron homeostatic mechanism; (iii) macrophage cells normally carry larger concentrations of LIP. Peroxyntirite is formed by the diffusion-limited recombination reaction of ubiquitous NO^\bullet and superoxide anion radicals (O_2^\bullet) ($k_1 = 1.9 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [24]. In addition to being a strong oxidant, upon protonation or reaction with CO_2 , peroxyntirite generates highly reactive oxidant species such as OH^\bullet , nitrogen dioxide (NO_2), and carbonate anion radicals (CO_3^\bullet) [25,26], which can damage various biological molecules and have been implicated in the onset of several pathological conditions [25,27].

Unlike the reaction between the LIP and H_2O_2 , we previously demonstrated that the reaction between the LIP and peroxyntirite decreases the peroxyntirite-dependent intracellular oxidation and nitrosylation of fluorescent targets and protein carbonylation [23]. Inspired by the two-electron reduction of peroxyntirite by manganese (II) and iron (II) porphyrin complexes [28,29] as well as ferrous heme proteins [30–32], we hypothesized that the ferrous LIP directly reduces peroxyntirite to nitrite (NO_2^-) (Scheme 1) [23], thereby detoxifying peroxyntirite. However, whether this reaction is rapid and stoichiometric or catalytic is unclear. In the present study, we address these fundamental questions. We will show that our results are consistent with a rapid and catalytic reaction between the LIP and peroxyntirite.



Scheme 1. The cellular study model and the hypothetical reaction of the LIP with peroxyntirite. Peroxyntirite is delivered intracellularly by co-production of O_2^\bullet through paraquat (PQ) and NO^\bullet (NO^\bullet donor). Peroxyntirite reacts directly with thiol peroxidases, metalloproteins (TP) and CO_2 , phenomenologically producing 2/3 of NO_3^- and CO_2 and 1/3 of the oxidant radicals NO_2^\bullet and CO_3^\bullet . The acid-catalyzed decomposition of peroxyntirite phenomenologically produces 2/3 of NO_3^- and 1/3 of the oxidant radicals NO_2^\bullet and OH^\bullet , but it is kinetically less favorable and has been omitted for simplicity. Hypothesis: The ferrous LIP (LIPFe^{2+}) directly reacts with peroxyntirite, presumably producing NO_2^- . This reaction is inhibited by chelation of the LIP, which increases the availability of peroxyntirite and the net yield of peroxyntirite-derived radicals NO_2^\bullet and CO_3^\bullet , enhancing the peroxyntirite-dependent direct and indirect oxidation of cellular targets.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

Unless specified otherwise, all the chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA) and were of the highest purity available. The chelator salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazine (SIH) was synthesized through a Schiff base condensation reaction between 2-hydroxybenzaldehyde and isonicotinic acid hydrazide, as described previously (ref ponka). The nitric oxide donors and coumarin-7-boronic acid (CBA) were purchased from Cayman Chemical Co (Ann Arbor, MI, USA), and Calcein was acquired from Biotium (Fremont, CA, USA). All the stock solutions including the solutions of NO• donors, Ebselen, hexacyanoferrate (II), ascorbate, and SIH were prepared, maintained, and quantified as described previously [23]. The stock solutions of paraquat were spectrophotometrically calibrated by measuring their absorbance at 600 nm ($\epsilon = 2.9 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) after reduction with 1–10% of dithionite in $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ [33,34].

2.2. Cell Culture and Treatment

RAW 264.7 cells (ATCC) were incubated and cultured at 37°C in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 100 units/mL penicillin, $100 \mu\text{g/mL}$ streptomycin-penicillin, and 10% fetal bovine serum (FBS). The cells were passaged, seeded onto 75 cm^2 T-flask culture dishes, and grown overnight, to reach between 85% and 90% confluence. Then, the cells were washed with PBS/DTPA ($100 \mu\text{M}$) twice, harvested, and centrifuged at $450 \times g$ and 4°C for 5 min. Finally, the cells were suspended in 10 mL of complete medium and incubated on ice. The trypan blue exclusion assay was conducted before and after the experiments, and cell viability ranged from 85% to 95%.

2.3. Quantification of the LIP

Briefly, a suspension of RAW 264.7 cells in PBS/DTPA ($45 \times 10^6 \text{ cell/mL}$) was treated with the aceto-methoxy derivatized calcein probe (Calcein-AM) (0.25, 0.5, 1.0, 2.0, and $3.0 \mu\text{M}$) under constant stirring at 37°C for 20 min, washed (two cycles of centrifugation and resuspension in ice-cold CA-free PBS), and kept on ice until use. Calcein-AM is cleaved by nonspecific esterases, forming the fluorescent product Calcein (CA), which can no longer freely cross biological membranes and accumulates intracellularly. At the time of the experiment, a suspension of Calcein-AM-loaded cells (15×10^6 cells in a total volume of 3.0 mL) was transferred to pre-warmed (37°C) PBS/DTPA and placed in the fluorimeter, and data acquisition was initiated. The initial fluorescence is proportional to the intracellular concentration of free CA. Then, the high-affinity membrane-permeable iron chelator SIH was added with the help of a Hamilton syringe, and the fluorescence signal increased because CA was released (Figure 1A). This differential fluorescence recovery (ΔF) was proportional to the intracellular concentration of the CA-bound LIP. The concentrations of the solutions of free CA and the CA-bound LIP were determined by using a standard analytical curve of fluorescence versus concentration of free CA (Figure 1B inset), which was generated by successive additions of known concentrations of free CA to a suspension of control cells in the presence of SIH. The intracellular concentrations of free CA and the CA-bound LIP were calculated by unit conversion; the following equation was used: $((\text{CA}) \text{ or } (\text{LIP-bound CA})) \times \text{assay total volume} / \text{total volume of cells}$ (the diameter of RAW 264.7 cells is $7 \mu\text{m}$, as reported elsewhere) [35]. The stock solution of CA was prepared in DMSO, and the concentration was determined by using the absorbance at 492 nm and the molar absorptivity coefficient of $\epsilon_{492} = 7.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (provided by Biotium). The total concentration of the LIP in the RAW 264.7 cells was assumed to be the limiting concentration of the CA-bound LIP.

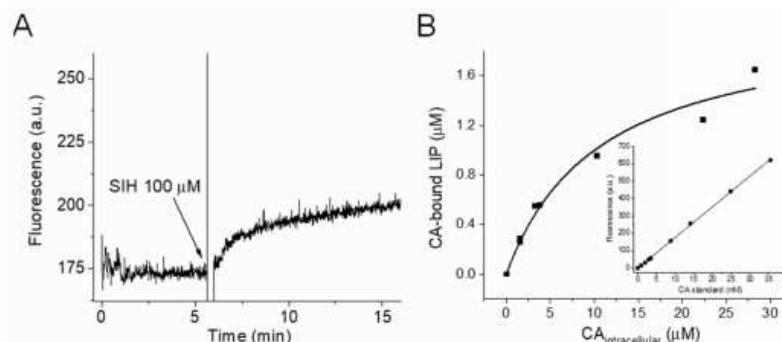


Figure 1. Quantification of the LIP in RAW 264.7 cells. **(A)** Fluorescence trace of Calcein-AM-loaded RAW 264.7 cells upon introduction of SIH. Pre-warmed 3-mL suspensions of 15×10^6 cells previously treated with Calcein-AM (0.25, 0.5, 1.0, 2.0, or 3.0 μM) at 37°C for 20 min were placed in the fluorimeter. When the baseline was established, SIH (100 μM) was added, as designated in the plot. The conditions and fluorescence acquisition parameter settings were as follows: PBS, 100 μM DTPA, pH 7.4, $T = 37^\circ\text{C}$, $\lambda_{\text{exc}} = 495\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 516\text{ nm}$, ex and em slit width = 3 nm. **(B)** Intracellular concentration of the CA-bound LIP as a function of the intracellular concentration of free CA. The concentration of the LIP was taken as the limiting concentration of the CA-bound LIP and was determined by fitting the data of Figure 1A to a hyperbolic equation with the aid of Origin 2019 (Academic), OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA. The intracellular concentrations of free CA and the CA-bound LIP were determined by unit transformation; the concentrations of the solutions of CA and the CA-bound LIP were determined with the help of a standard analytical curve of fluorescence versus known concentrations of free CA (inset) in control Calcein-AM untreated cells (15×10^6 cells in 3 mL) and in the presence of SIH under the same conditions of the experiments. The CA assays were performed in a conventional spectrofluorometer (Shimadzu RF-5301pc).

2.4. Fluorescence Experiments

A suspension of RAW 264.7 cells in PBS/DTPA was loaded with 30 μM 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$; fluorescent indicator) under constant stirring at 37°C for 30 min. To minimize differences in the intracellular concentrations of the fluorescent indicator during the experiments, the same number of cells was systematically used when the indicator was loaded (60×10^6 cells/mL). Once the indicator permeates biological membranes, the ester bonds present in $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ are cleaved by non-specific esterases, and the product 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (H_2DCF) is trapped and begins to accumulate intracellularly. To avoid the presence of extracellular H_2DCF , the cells were subjected to two cycles of centrifugation and resuspension after the loading procedure. For the assays regarding H_2DCF , the cells were transferred to 96-well plates (3×10^6 cells per pool in 250 μL), and the experiments were performed in a plate reader (Molecular Device SpectraMax i3x) with the following fluorescence acquisition parameter settings: $\lambda_{\text{excitation}} = 498\text{ nm}$, $\lambda_{\text{emission}} = 523\text{ nm}$ ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$), and excitation and emission slit widths of 9 and 15 nm, respectively. The CBA experiments were performed by using the same procedure, except that CBA (10 μM) was not loaded into the cells but simply included in the PBS/DTPA cellular suspension before the runs. COH and DCF fluorescence was measured at the time intervals designated in the figures. The donors sperNO and deta/NO were the NO^\bullet sources in these experiments (these donors have half-lives of 39 min and 20 h at 37°C and pH 7.4, respectively [36]) as described in the respective figure legends. All the experiments were performed in PBS buffer supplemented with 100 μM DTPA, and the temperature was controlled by a circulating water bath and/or the instrument internal temperature control (heated air flow) maintained at 37°C .

2.5. In the Rate of Fluorescence Increase

The rates at which the intracellular fluorescence of COH and DCF increased were determined by linear regression analyses of the fluorescence data. See the respective figures for more details.

2.6. Statistical Analysis

All the measurements are presented as the means \pm S.D. of $n \geq 3$ experiments. The means were compared between groups by using an F test followed by a paired Student's t-test; the academic version of the software Origin 2019 was employed (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). p values of <0.05 were considered to be statistically significant.

3. Results

3.1. Quantifying the LIP

First, we evaluated the LIP content of RAW 264.7 cells by using a modified Calcein methodology [2]. Briefly, we pre-loaded a suspension of RAW 264.7 cells in PBS/DTPA (45×10^6 cell/mL) with the aceto-methoxy derivatized calcein probe (Calcein-AM). Calcein-AM is cleaved by nonspecific esterases, forming the fluorescent product Calcein (CA), which can no longer freely cross biological membranes and thus accumulates intracellularly. The intracellular fluorescence of CA is quenched when the LIP binds to its EDTA-like moiety in a 1:1 stoichiometry; the remaining initial fluorescence is proportional to the intracellular concentration of free CA (Figure 1A). When the high-affinity membrane-permeable iron chelator SIH is introduced, the fluorescence signal increases due to LIP and the chelator complexation and CA release (Figure 1A) [2,37]; the differential fluorescence recovery (ΔF) is proportional to the intracellular concentration of the CA-bound LIP. We determined the intracellular concentrations of the CA-bound LIP with increasing intracellular concentrations of free CA (Figure 1A) and fitted the data ((CA-bound LIP) \times (free CA)) displayed in Figure 1B to a hyperbolic equation. We assumed that the total concentration of the LIP in RAW 264.7 cells was the limiting concentration of the CA-bound LIP, which was $2.0 \pm 0.2 \mu\text{M}$.

3.2. Checking Formation of Peroxynitrite

Next, we checked the formation of peroxynitrite in cells by co-production of NO^\bullet and O_2^\bullet according to Scheme 1 [38]. We transferred a suspension of RAW 264.7 cells to 96-well plates and treated it with the NO^\bullet donor (Z)-1-[N-[3-aminopropyl]-N-[4-(3-aminopropylammonio)butyl]-amino]diazene-1-ium-1,2-diolate (sperNO) and the redox cyclor *N,N'*-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride (paraquat), which catalytically generates intracellular O_2^\bullet at the expense of cellular reducing agents, Scheme 1. The combination of paraquat and sperNO is herein referred to as PQ/ NO^\bullet .

We followed the formation of peroxynitrite by PQ/ NO^\bullet in RAW 264.7 cells by fluorescence spectroscopy, by using $10 \mu\text{M}$ of the boronate compound coumarin-7-boronic acid (CBA). This compound reacts with peroxynitrite at a high rate constant ($k = 1.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [39], producing the fluorescent product 7-hydroxy coumarin (COH). As shown in Figure 2, on the basis of the accumulated COH, treatment with PQ/ NO^\bullet produced peroxynitrite in cells in a sperNO concentration-dependent way at least up to $15 \mu\text{M}$ sperNO, showing no sign of O_2^\bullet exhaustion. This behavior was expected given that NO^\bullet and cellular SODs compete for (O_2^\bullet). We used the combination PQ/ NO^\bullet throughout the study to deliver peroxynitrite to cells.

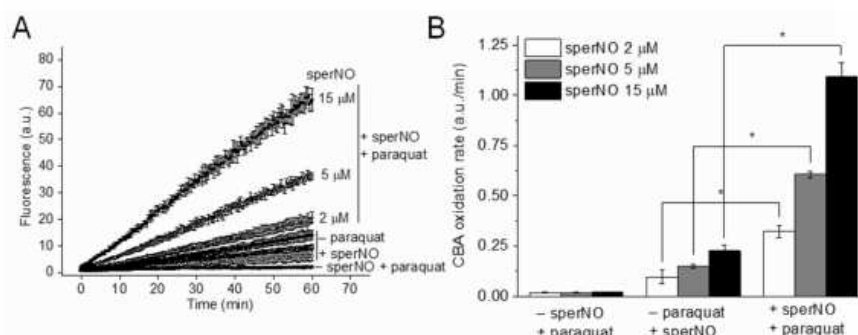
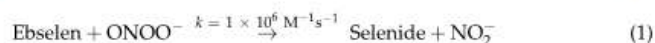


Figure 2. Formation of peroxynitrite by paraquat and NO[•] donor in cells. Briefly, suspensions of RAW 264.7 cells were transferred to 96-well plates (1.2×10^7 cells/mL). CBA (10 μM), paraquat (10 μM), and sperNO (2, 5 or 15 μM) were individually added to selected wells, in this order. (A). COH fluorescence as a function of time. The measurements were initiated immediately after sperNO was introduced, and the fluorescence was registered every minute for one hour. The data represent the mean \pm SD ($n = 4$). (B). Increase in the rate of COH fluorescence. This parameter was determined by linear regression of the fluorescence data presented in panel A within the first 10 min of each run. The data represent the mean of four independent experiments \pm S.D. and are statistically significant at the 95% confidence interval relative to control cells * ($p < 0.05$, Paired Student's *t*-test). The assays were performed in PBS, DTPA (100 μM), at pH 7.4 and 37 °C, and the fluorescence acquisition parameters were $\lambda_{ex} = 332$ nm, $\lambda_{em} = 456$ nm, and ex and em slit width = 9 and 15 nm, respectively.

3.3. Monitoring Peroxynitrite-Dependent Oxidation

Similarly to our previous study [23], we used 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) to monitor peroxynitrite-dependent oxidation. We visualized that the LIP reacted with peroxynitrite by the incremental peroxynitrite-dependent oxidation of H₂DCF-DA in the presence of the LIP chelator, which bound to the LIP and inhibited the reaction between the LIP and peroxynitrite. Using H₂DCF for our purposes has several advantages. First, by using its diacetate form (H₂DCF-DA), H₂DCF can be loaded into cells (through action of nonspecific esterases) [23] and accumulates to hundreds of μM intracellularly. This is critical for our goals, given that H₂DCF has to compete with multiple cellular targets for the peroxynitrite-derived radicals. In our hands, the intracellular concentration of H₂DCF approached 400 μM in the typical cell loading procedure (Supplementary Material, Figure S1). Second, H₂DCF does not react directly with the peroxynitrite precursors NO[•] and O₂^{•-} or H₂O₂ (the product of O₂^{•-} dismutation). Third, H₂DCF reacts with all peroxynitrite-derived radicals such as OH[•], NO₂[•], and CO₃^{•-} at high rate constants. If we consider that GSH is the only competitor, we can calculate that 400 μM H₂DCF reacts with 80% of CO₃^{•-} (assuming 5 mM GSH, $k_{GSH} = 5.3 \times 10^6$ M⁻¹s⁻¹, and $k_{H_2DCF} = 2.6 \times 10^8$ M⁻¹s⁻¹) [40]. Similar calculations showed that H₂DCF would react with only 5% of the NO₂[•] ($k_{H_2DCF} = 1.3 \times 10^7$ M⁻¹s⁻¹) [40], but we confirmed that H₂DCF efficiently (directly or indirectly) detected NO₂ (Please, see Figure 3 below). To guarantee that the oxidation of H₂DCF depended on peroxynitrite as intermediate, we ran parallel control experiments in the presence of 2-phenyl-1,2-benzoselenazol-3-one (Ebselen), a compound that directly and rapidly reduces peroxynitrite to NO₂⁻ (Equation (1)) [41]. Ebselen fully inhibited the intracellular oxidation of H₂DCF by treatment with PQ/NO[•] in both the absence and presence of the chelator (Please see Figures 3 and 4 below), indicating that formation of dichloro-fluorescein (DCF) in the presence of PQ/NO[•] depended on peroxynitrite acting as intermediate. In addition, along with proper controls, H₂DCF has been used to detect peroxynitrite [42] and to determine fluxes of peroxynitrite in activated macrophages [38].



The mechanism through which H₂DCF is oxidized deserves a final comment. Strong radical oxidant species such as those derived from peroxynitrite [40] or high-valent ferryl species derived from reactions of hydrogen peroxide with heme-proteins and heme-peroxidases (known as compound I and compound II) [40,43] oxidize H₂DCF mono-electronically, yielding the putative radical DCFH•. The latter may dismutate, but it more likely reduces O₂ to O₂•⁻, yielding the fluorescent product DCF in the process (supplementary information). Obviously, production of O₂•⁻ by this mechanism raises concerns because it could react with NO•, to form peroxynitrite, potentially self-stimulating the peroxynitrite-dependent oxidation of H₂DCF. However, the amount of O₂•⁻ (and thus H₂O₂) produced by this mechanism is arguably negligible compared to O₂•⁻-derived paraquat. According to a rough estimation based on kinetic competition (Supplementary information), O₂•⁻-derived H₂DCF amounts to, at most, less than 6% of the O₂•⁻-derived paraquat.

It could be argued that boronate compounds are a more appropriate choice of indicator to investigate the hypothetical reaction between the LIP and peroxynitrite because these compounds directly and rapidly react with peroxynitrite [44,45]. However, such approach poses difficulties. First, only a small fraction of the available peroxynitrite actually reacts with boronate in cells. In a similar cellular model, fluorescein-derived boronate (Fl-B) at a presumed concentration of 50 μM was estimated to react with only 10% of the available peroxynitrite. Moreover, possibly only a small fraction of available peroxynitrite (and even less in the presence of boronates) reacts with the LIP in cells given that the concentration of the LIP is in the low μM range. Rationally, in the presence of the LIP chelator, most peroxynitrite that would otherwise react with the LIP would not react with boronate but with other direct targets of peroxynitrite, such as TP and CO₂ [46]. Thus, arguably, inhibition of the reaction between the LIP and peroxynitrite by the chelator would cause only a small and possibly experimentally undebatable increase in the peroxynitrite-dependent oxidation of boronate. We did not detect any increase in the oxidation of Fl-B in the presence of a chelator (not shown) in cells challenged with PQ/NO•.

3.4. H₂DCF Efficiently Detected Different Levels of NO₂• in Cells Regardless of the Presence of the Chelator SIH

To test whether H₂DCF reacted with peroxynitrite-derived radicals under our experimental conditions, we had to design a strategy to deliver these species specifically to the cellular suspension model. We selected NO₂• as the prototype species. The NO₂• radical is a freely diffusible species that can rapidly access the cytosolic space [47,48], and it reacts rapidly with H₂DCF ($k = 1.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [40]. To the best of our knowledge, no currently available method can specifically deliver a continuous and sustained flux of the other peroxynitrite-derived species OH• and CO₃•⁻ in the absence of other oxidants in cells. On the other hand, we generated increasing fluxes of NO₂ practically devoid of NO• and other oxidants by mixing different concentrations of NO• donor with excess 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl 3-oxide (PTIO), an imidazoline-oxyl N-oxide that oxidizes NO• to NO₂ [49–54] (Supplementary Material, Figure S2). We performed the experiment as follows. We placed H₂DCF-loaded RAW 264.7 cells in 96-well plates and challenged them with sperNO in the presence of 250 μM PTIO, in the absence and in the presence of the chelator SIH (Figure 3A). As expected, compared to sperNO alone, PTIO, which fully oxidized NO• to NO₂, dramatically increased the rate at which DCF was formed. SIH had no effect on the H₂DCF oxidation under these conditions. That NO₂ was the H₂DCF oxidant in these experiments was confirmed by performing experiments in the presence of rapid NO₂ scavengers, hexacyanoferrate (II) (FCN) [55,56] and ascorbate (ASC⁻) [57]. Neither FCN nor ASC⁻ reacts rapidly or at all with peroxynitrite, and both fully prevented the increase in DCF fluorescence induced by the combination of the NO• donor and PTIO without any filter effect on the fluorescence of DCF (Figure 3B,C right panel). Therefore, H₂DCF efficiently competed with other intracellular targets for NO₂. In the experiments conducted with 15 μM sperNO, the rate at which the fluorescence increased slowed down toward the end of the run. The reason for this behavior was unclear, but it could involve exhaustion of H₂DCF or further oxidation of the product DCF by NO₂ [43], although the

rate constant for the reaction between DCF and NO_2^- is two orders of magnitude lower than the reaction between DCF and the reduced PTIO.

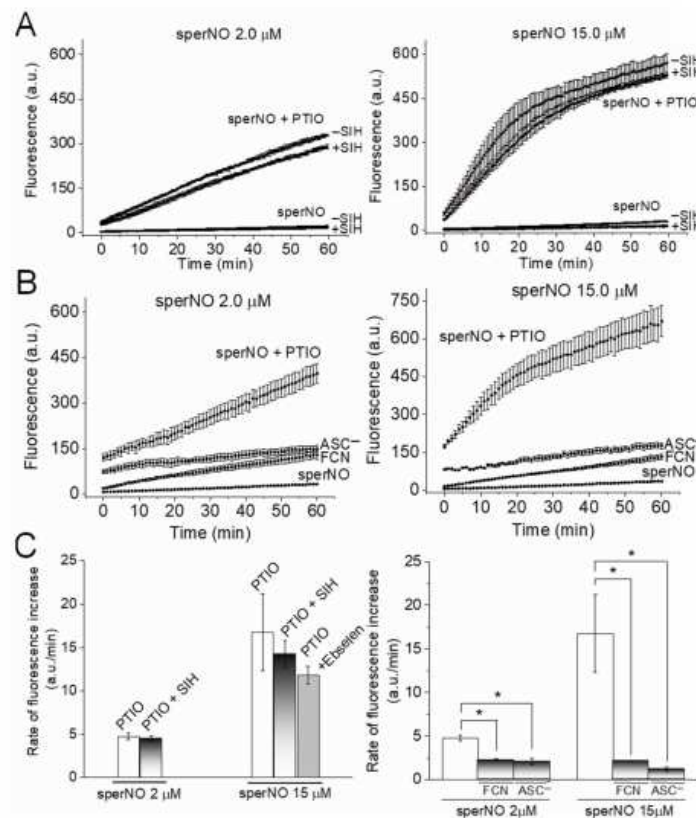


Figure 3. NO_2^- -dependent intracellular oxidation of H_2DCF and the effects of SIH and Ebselen. A suspension of H_2DCF -loaded RAW 264.7 cells was transferred to 96-well plates (1.2×10^7 cells/mL) and treated with sperNO (2 or 15 μM) in the presence of PTIO (250 μM) plus or minus SIH (100 μM). (A). Fluorescence traces of the oxidation of H_2DCF by NO_2^- generated by combination of sperNO and PTIO; (B). Fluorescence traces of the oxidation of H_2DCF by NO_2^- generated by combination of sperNO and PTIO in the presence of the NO_2^- scavenger potassium hexacyanoferrate (II) [55] or ascorbate (100 μM). The data in panels A and B represent the mean \pm S.D. of three experiments and are statistically significant at the 95% confidence interval relative to control cells * ($p < 0.05$, Paired Student's *t*-test); (C). Rate of the NO_2^- -dependent intracellular oxidation of H_2DCF shown in (A) and (B). The data represent the mean of three independent experiments \pm S.D. The assays were performed in PBS and DTPA (100 μM), at pH 7.4, and 37 °C, and the fluorescence acquisition parameters were $\lambda_{\text{ex}} = 498$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 523$ nm, and ex and em slit width = 9 and 15 nm, respectively.

3.5. Removal of the LIP by Chelation Increases Peroxynitrite-Dependent Intracellular Oxidation

We continued by repeating the critical experiments from our previous study, which had demonstrated augmented peroxynitrite-dependent intracellular oxidation of H_2DCF upon chelation of the LIP in RAW 264.7 cells. We assessed the effect of the LIP by comparing the intracellular oxidation of H_2DCF by PQ/NO^* with and without SIH, a cell membrane-permeable iron chelator that accesses the cytosolic space and binds to the LIP within a few

minutes [2]. SIH is known for rapidly and strongly ($\text{Log}\beta_2 = 26.9$) binding ferrous iron in a 2:1 stoichiometry, yielding the $(\text{Fe}(\text{SIH})_2)$ complex. This iron complex ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ redox pair at pH 7.4 is 0.13 V vs. NHE) does not undergo redox cycle to produce oxidants [58] and does not appear to react with peroxynitrite directly [23]. Direct oxidation of targets by peroxynitrite seems to take place by the inner-sphere mechanism [31,32,59], so metal chelators that prevent peroxynitrite binding are also likely to prevent the direct oxidation of transition metals by peroxynitrite.

To reproduce our previous experiments, we transferred a suspension of H_2DCF -DA-loaded RAW 264.7 cells to 96-well plates and exposed it to peroxynitrite fluxes generated by $\text{PQ}/\text{NO}^\bullet$ as described above. As shown in Figure 4A, we recorded the fluorescence of DCF in real-time. We used the linear regression of the fluorescence data obtained during the first 10 min of each run to express these data as the rate of the increase in fluorescence, or the rate at which DCF was formed (Figure 4B). Importantly, the $\text{PQ}/\text{NO}^\bullet$ -induced oxidation of H_2DCF was negligible in the absence of NO^\bullet and was fully inhibited in experiments performed in the presence of Ebselen (Figure 4A,B). Together, these observations indicated that peroxynitrite mediated the formation of DCF in the presence of $\text{PQ}/\text{NO}^\bullet$.

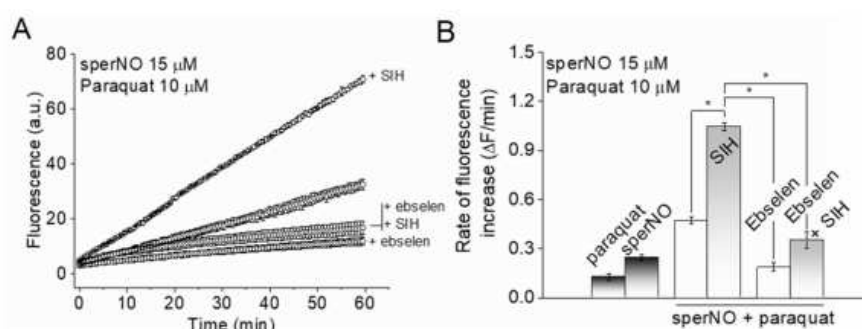


Figure 4. Sequestration of the LIP by chelation increases the peroxynitrite-dependent intracellular oxidation of H_2DCF . (A) Fluorescence traces of the formation of DCF in cells treated with $\text{PQ}/\text{NO}^\bullet$ in the presence and absence of Ebselen and SIH; Briefly, H_2DCF -loaded RAW 264.7 cells were transferred to 96-well plates (1.2×10^7 cells/mL). Paraquat (10 μM), SIH (100 μM), and Ebselen (50 μM) were individually added to selected wells in this order. The fluorescence measurements were initiated immediately after sperNO (15 μM) was introduced and registered every minute for one hour. Each trace represents the mean \pm standard deviation (S.D.) of four experiments. (B) The rate at which the fluorescence of DCF increased. This parameter was determined by linear regression of the fluorescence data presented in panel A, by using the data collected during the first 10 min of each run. The data represent the mean of four independent experiments \pm S.D. and are statistically significant at the 95% confidence interval relative to control cells * ($p < 0.05$, Paired Student's *t*-test). The assays were performed in PBS and DTPA (100 μM), at pH 7.4, and 37 °C. The conditions and fluorescence acquisition and parameter settings were the same as those described in Figure 3.

Consistent with our previous results [23], the rate at which DCF was formed increased significantly in the presence of SIH (Figure 4A,B), leading to the conclusion that LIP chelation increases the availability of peroxynitrite and its derived radical oxidants (Scheme 1). Importantly, in the absence of cells, SIH has no effect on peroxynitrite-dependent oxidation of H_2DCF [23]. Together, these results lead to the conclusion that cellular SIH effect on peroxynitrite-dependent H_2DCF oxidation is due to chelation of cellular LIP. In our previous study, we found that the cell membrane-permeable classic iron chelator 2,2'-bipyridine also elicits the chelator effect [23], indicating that this effect is not specific to SIH, but rather a common property of membrane-permeable LIP chelators. Finally, the oxidation of H_2DCF and the enhanced effect of the chelators were also observed with endogenous NO^\bullet produced by LPS-activated RAW 264.7 cells [23].

We estimated that the intracellular accumulation of DCF increased from 30 μM in the absence of SIH to 50 μM in the presence of SIH in the 60-min runs (Supplementary Material). This represented roughly 10% of the total intracellular concentration of H_2DCF . It is also safe to assume that the total intracellular peroxynitrite produced during this time interval was at least 300 μM given that most peroxynitrite reacts with metalloproteins, thiol peroxidases, and other targets [46]. Given that LIP concentration in RAW 264.7 cells was 2 μM , LIP is the limiting species in its reactions with peroxynitrite.

Remarkably, Ebselen also fully prevented the formation of DCF in the presence of SIH, indicating that the oxidation of H_2DCF in the presence of the chelator also depended on peroxynitrite. The fact that Ebselen (Figure 3C) and SIH (Figure 3A,C left panel) failed to affect the NO_2 -dependent oxidation of H_2DCF excluded the possibility that NO^\bullet autoxidation was an important source of NO_2 for the intracellular oxidation of H_2DCF under our experimental conditions. Indeed, SIH and Ebselen can neither prevent the formation of NO_2 from NO^\bullet autoxidation nor efficiently compete with H_2DCF for NO_2 generated from NO^\bullet and PTIO (PTIO is cell membrane-impermeable and thus generates NO_2 extracellularly, a compartment where both SIH and Ebselen may react with NO_2 , explaining why the oxidation of intracellular H_2DCF is partially inhibited in the presence of SIH or Ebselen.) (Figure 3) as shown here. Together with the observations that SIH increased and Ebselen prevented the PQ/ NO^\bullet -induced oxidation of H_2DCF , these results showed that the intracellular oxidants of H_2DCF generated by treatment with PQ/ NO^\bullet primarily derived from peroxynitrite ([23]) under the study conditions. Finally, the fact that SIH failed to increase the formation of DCF in cells exposed to NO^\bullet and PTIO (this failure does not mean that the LIP does not react with NO_2 ; it probably does react, but other NO_2 endogenous targets such as GSH (5–10mM) and exogenous targets such as H_2DCF (400 μM) outcompete the LIP (2 μM) for NO_2) provided further evidence to refute the possibility that free SIH or the $[\text{Fe}(\text{SIH})_2]$ complex somehow produces oxidants that would stimulate the formation of DCF inside the cells.

Other possibilities could explain the enhanced oxidation of H_2DCF in the presence of SIH. However, extensive control experiments conducted in our previous study [23] showed that: (i) SIH and the $[\text{Fe}(\text{SIH})_2]$ complex, which mimics the SIH/ferrous LIP, does not produce O_2^\bullet or other oxidants; (ii) neither the free SIH nor the $[\text{Fe}(\text{SIH})_2]$ complex suppresses or interferes in the fluorescence properties of DCF; (iii) SIH does not interfere with the concentration of NO^\bullet in cells; (iv) neither SIH nor the $[\text{Fe}(\text{SIH})_2]$ complex appears to react with peroxynitrite directly; (v) significant H_2O_2 -dependent oxidation of H_2DCF did not happen under the experimental conditions of the study. Indeed, almost no DCF was formed in the absence of NO^\bullet (indistinguishable from control experiments) and in the presence of PQ, a condition in which the availability of O_2^\bullet and H_2O_2 would be higher (Figure 4) [23]. This observation indicated that the chemistry of H_2O_2 with the LIP or iron peroxidases is not relevant for the intracellular oxidation of H_2DCF under the study conditions. The chelator SIH also attenuates the H_2O_2 -dependent oxidation of H_2DCF [18] and increases the PQ/ NO^\bullet -dependent oxidation of H_2DCF in RAW 264.7 cells (Figure 4) [23], indicating that the chemical mechanisms for the oxidation of H_2DCF by H_2O_2 and PQ/ NO^\bullet in RAW 264.7 cells are fundamentally different; (vi) there is no reason to believe that SIH changes the concentrations of antioxidants in cells that prevent the formation of peroxynitrite (e.g., SODs) or that compete with H_2DCF for peroxynitrite-derived radicals (e.g., GSH). The chelator enhancement effect is observed within seconds to few minutes after the chelator is introduced (please, see Figure 5A below), a time scale that is insufficient to affect the concentrations of the antioxidants. This time scale, however, is compatible with the kinetics of SIH cell membrane permeability and binding to the LIP (Figure 1A) [2,17]; (vii) H_2DCF is oxidized in the presence of NO^\bullet alone (in the absence of PQ), but this is possibly related to the formation of peroxynitrite by reaction of NO^\bullet with endogenous O_2^\bullet since H_2DCF was also inhibited by Ebselen (not shown).

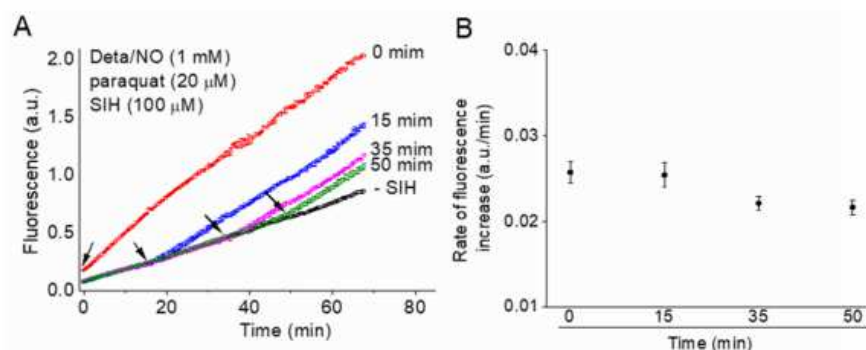


Figure 5. The rate of intracellular oxidation of H₂DCF as a function of the time when SIH was added. (A). Fluorescence traces due to the formation of DCF. The experiments were performed as described in Figure 4; 2,2'-(hydroxy-nitroso-hydrazone)bis-ethanimine (Deta/NO) was used as NO[•] donor in the presence of paraquat. SIH was added before or at selected time points during the run, as designated in the figure. Deta/NO has a long half-life under the experimental conditions, producing a constant flux of NO[•] in the time scale of the experiments. The data represent the mean ± S.D. of four experiments; (B). The rate at which the fluorescence increased after SIH was introduced. The rate was determined by linear regression of the fluorescence traces in the final 5 min of the collected data. The data represent the mean of four independent experiments ± S.D. The conditions and fluorescence acquisition and parameter settings were the same as those described in Figure 3.

3.6. Catalytic Properties of the Reaction between the LIP and Peroxynitrite

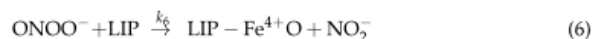
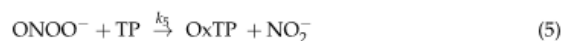
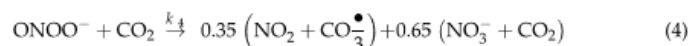
One important missing feature of the reaction between the LIP and peroxynitrite is whether it is stoichiometric or catalytic. We estimated that the concentration of the LIP in RAW 264.7 cells was 2 μM, and that at least 300 μM of peroxynitrite was formed in cells exposed to PQ/NO[•] in the period of 60 min, so we concluded that the LIP was the limiting reactant of the reaction between the LIP and peroxynitrite under the experimental conditions of the study. We rationalized that if the reaction between the LIP and peroxynitrite were stoichiometric, the LIP would be gradually consumed by the reaction with peroxynitrite and thus its concentration would be reduced with delayed addition of SIH. In fact, we rationalized that the rate at which DCF is formed in the absence of the chelator would actually increase, approaching the rate at which DCF was generated in the presence of the chelator (labeled as 0 min in the Figure below). However, accumulated data [23,60] and results of the current study (Figure 4) showed that the rate at which DCF was formed in the absence of SIH was constant even at the highest concentration of NO[•] donor used in the experiments. Assuming that the formation of peroxynitrite by PQ/NO[•] was constant, as suggested by the CBA experiment (Figure 2), the concentration of the LIP form reactive toward peroxynitrite did not appreciably decrease over time, indicating that the LIP may catalytically remove peroxynitrite.

We tested the catalytic versus stoichiometric behavior of the reaction between the LIP and peroxynitrite by exposing the cells to peroxynitrite fluxes, as usual, but we introduced the chelator SIH at different time points during the experimental run (Figure 5A). Again, if the reaction between the LIP and peroxynitrite were stoichiometric, the SIH effect would gradually decrease due to consumption of LIP by peroxynitrite. However, as shown in Figure 5B, the rate at which the fluorescence increased after SIH was added remained unchanged regardless of the delay in the addition of SIH. Together, these observations suggested that the LIP catalytically reacts with peroxynitrite.

3.7. The Rate Constant of the Reaction between the LIP and Peroxynitrite

We estimated the rate constant for the hypothetical reaction between the LIP and peroxynitrite by using a rather simple reaction model (Equations (2)–(9)) for the rate of the

peroxynitrite-dependent DCF formation, the parameter that we measure when we use the H₂DCF assay in cells.



The consumption of O₂[•] by SOD is simplified as the O₂[•] oxidase reaction (Equation (2)), and the formation of peroxynitrite is represented by the co-reaction between NO[•] and O₂[•] Equation (3). Due to the inherent reactivity of peroxynitrite and its derived radicals, they can react with various cellular targets. All the direct reactions of peroxynitrite other than its reactions with CO₂ Equation (4), $k_4 = 3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [61,62], and the LIP (Equation (6)) and all the reactions of the peroxynitrite-derived radicals other than their reaction with H₂DCF Equation (8) are represented generically in Equations (5) and (7), respectively). In Equation (5), TP stands for thiol and iron peroxidases/proteins, and oxTP represents the oxidized form of these species. The constant k_5 represents an average weighted rate constant that depends on the concentration and reactivity of the TP members, which vary among cells (we assume these values range from 1×10^5 to $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [63,64]. In Equation (7), CC and CC[•] stand for a collection of cell constituents that can be oxidized by peroxynitrite-derived radicals (such as GSH) and their corresponding oxidized forms. The peroxynitrite-derived radicals are represented collectively as R[•], and their corresponding reduced anions are represented as R⁻ (Equations (7) and (8)).

Assuming steady-state conditions for peroxynitrite and all the intermediate reactive species, our model demonstrated that the rate of the peroxynitrite-dependent indirect intracellular formation of DCF in the absence of the chelator is given by Equation (10) (see Supplementary Material for the demonstration of the equation).

$$\frac{d[\text{DCF}]}{dt} = \frac{2/3 k_3 k_4 k_8 [\text{NO}^{\bullet}] [\text{O}_2^{\bullet}] [\text{CO}_2] [\text{H}_2\text{DCF}]}{(k_4 [\text{CO}_2] + k_5 [\text{TP}] + k_6 [\text{LIP}]) (k_7 [\text{CC}] + k_9 [\text{H}_2\text{DCF}])} \quad (10)$$

The equation shows that the rate of the oxidation of H₂DCF depends directly on the concentrations of NO[•] and O₂[•] and indirectly on the concentration of TP, CC, and the LIP, while it has a complex relationship with the concentrations of CO₂ and H₂DCF. In the presence of the chelator, the rate of the oxidation of H₂DCF is

$$\frac{d[\text{DCF}]}{dt} = \frac{2/3 k_3 k_4 k_8 [\text{NO}^{\bullet}] [\text{O}_2^{\bullet}] [\text{CO}_2] [\text{H}_2\text{DCF}]}{(k_4 [\text{CO}_2] + k_5 [\text{TP}]) (k_7 [\text{CC}] + k_9 [\text{H}_2\text{DCF}])} \quad (11)$$

Because the term $k_6[\text{LIP}]$ vanishes from Equation (10).

Division of Equation (11) by Equation (10) and rearrangement gives an expression for k_6 Equation (12), the rate constant for the hypothetical reaction between the LIP and peroxynitrite. This equation allows k_6 to be estimated if all the other parameters (q , k_4 , k_5 , and the concentrations of CO₂, TP, and LIP) are known. We determined the quotient (q), which represents a dimensionless parameter for the enhanced effect of the chelation of the

LIP on the rate of the peroxyxynitrite-dependent indirect formation of DCF, experimentally. Using the data from Figure 5, we calculated the mean value of q as 1.7 (Figure 6). Whereas we did not measure the concentration of CO_2 experimentally, its concentration in the aqueous phase of cellular suspensions under similar conditions (i.e., bicarbonate free buffer and open vessels) and experimental time scales suggest concentrations of CO_2 in the range of hundreds of micromolar [65]. The concentration of TP varies depending on the cell type and cellular compartments. Considering only the thiol peroxidases, which are by far the most abundant TP members [66,67] and according to Wang et al. [68] and some calculations, TP concentration in several mammalian cell lines like *Mus musculus* and Raw 264.7 cells is around 10 μM . We determined that the concentration of the LIP in RAW 264.7 cells was 2.0 μM (Figure 1).

$$k_6 = (q - 1) \frac{k_4 [\text{CO}_2] + k_5 [\text{TP}]}{[\text{LIP}]} \quad (12)$$

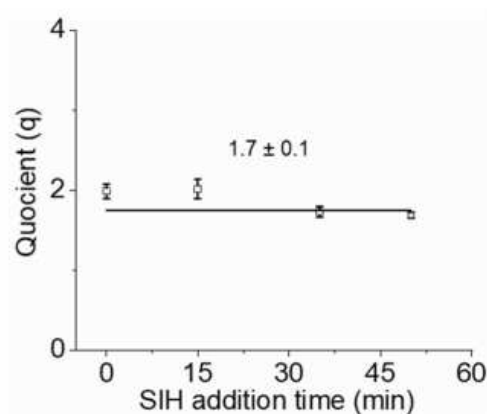


Figure 6. The quotient of the rates of fluorescence increased in the presence and absence of SIH. The quotient (q) was determined by dividing the rates of the increase in fluorescence in the presence of SIH by the rates of the increase in fluorescence in the absence of SIH; the data from Figure 5 were used.

Thus, assuming the concentrations of CO_2 [65] and TP as 100 and 10 μM , respectively, as well as the lower and higher end limits of k_5 (10^5 – $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), we estimated the rate constant for the hypothetical reaction between peroxyxynitrite and the ferrous LIP to be between $1.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ and $40 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ in RAW 264.7 cells.

We recognize that our approach has several limitations and uncertainties. Nevertheless, we think that our assumptions are justified (please see below). In addition, the estimated range for the rate constant of the reaction between the ferrous LIP and peroxyxynitrite is comparable to the rate constants determined for similar reactions involving a two-electron oxidation of the ferrous ions of deoxymyoglobin [31,32] or myeloperoxidase [30] by peroxyxynitrite, for which k is in the order of $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. The uncertainties of the model may include: (i) the fact that the model assumed that any other mechanism for the oxidation of H_2DCF other than the mechanism mediated by peroxyxynitrite (through its derived radicals) are equal in the absence and presence of chelator. These may include the oxidation of H_2DCF by reactions of H_2O_2 with iron proteins and with metallo-peroxidase. Under our experimental conditions, however, the formation of DCF fully depended on the availability of NO^\bullet and could be prevented by the peroxyxynitrite scavenger Ebselen, so the H_2O_2 -dependent formation of DCF was apparently not significant; (ii) similarly, our model assumed that the pathways for the consumption of O_2^\bullet (cellular SODs) and NO^\bullet (cellular consumption of NO^\bullet and autoxidation of NO^\bullet) are equal in the absence and

presence of chelator; (iii) the concentrations of TP and CO₂ we used for the calculations are based on the literature, but given the simplicity of the model and the uncertainties above, determining these concentrations would not significantly increase the accuracy of the result; (iv) the model does not consider that the chelator itself is oxidized by the peroxynitrite-derived radicals and competes with H₂DCF for these oxidants, which would have the practical effect of artefactually attenuating the incremental effect of the chelator on the rate at which DCF is formed.

4. Discussion

The nature of the cellular ferrous LIP remains unclear, but it is usually assumed to consist of small-molecular-mass iron complexes. On the basis of the available thermodynamic constants and concentrations, among all the bioavailable small molecular cellular ligands, only GSH could potentially serve as a meaningful ligand for the ferrous LIP in cells [69,70]. The reaction of GSH with either Fe(III) or Fe(II) ions in solution within the pH range of 3–7 yields the Fe(II)-GS complex only (excess GSH reduces ferric to ferrous iron), and empirical evidence supports the formation of Fe(II)-GS complexes in the cytosol [69,70]. However, we have hypothesized that the LIP is protein-bound by rationalizing that proteins potentially offer multiple ligands to iron [17], essentially functioning as metal chelator and forming species with higher thermodynamic affinity constants than GSH. This hypothesis is also based on the observation that iron in mononuclear non-heme enzymes such as prolyl hydroxylases (PHDs) are chelatable [71]. Additionally, a recent and convincing set of studies have strongly suggested that the LIP is bound to poly(rC)-binding protein 1 and 2 (PCBP1 and PCBP2) and possibly to other members of the PCBP family [72,73]. These proteins were initially characterized as RNA-binding proteins, but human PCBP1 and PCBP2 have been suggested to bind and to deliver iron to ferritin (the iron storage protein) [74], to deliver iron to cytosolic non-heme enzymes with mono- and di-nuclear iron centers such as prolyl hydroxylases and deoxy-hypusine hydroxylase (DOHH) [75,76], and to bind to mammalian protein BolA2, which together with glutathione reductase 3 functions as (2Fe-2S) chaperones [72,73]. Conceptually, PCBP1 and PCBP2 have been suggested to be the LIP cellular ligands and major iron chaperones playing an integral roles in safe intracellular iron trafficking. The PCBP proteins are comprised of three discrete domains (called KH domains) [77]. Mutational analysis of the KH3 domain revealed that conserved cysteine and glutamate residues are necessary for PCBP1 to coordinate with iron [73]. Importantly, studies have shown that the purified recombinant PCBP1 KH3 binds Fe(II) with a dissociation constant of 4.2 and 0.8 μM in the absence and in the presence of 5 mM GSH, respectively [73], suggesting that GSH completes the coordination sphere of iron in PCBP proteins, reconciling the importance of GSH for the binding of the LIP in cells.

In this study, we focused on the fundamental properties of the reaction between peroxynitrite and the LIP in cells. Overall, the results presented herein indicate that the LIP directly, rapidly, and catalytically reacts with peroxynitrite in RAW 264.7 cells. Hypothetically, the ferrous LIP directly reduces peroxynitrite to nitrite (while it is oxidized to LIP-Fe=O⁴⁺), which presumably lowers the direct and indirect oxidation of cellular targets by peroxynitrite and its derived radicals. The reduction of LIP-Fe⁴⁺O back to the ferrous LIP would make the reduction of peroxynitrite by the LIP a catalytic process, which seems to be the case. The hypothetical LIP-Fe⁴⁺O reducing agent, the actual reactions, and the kinetic properties remain obscure, but given the possible PCBP1-GSH nature of the LIP, GSH seems to be a plausible candidate for the reduction of the LIP-Fe⁴⁺O species. Previous studies have demonstrated that the inhibition of the biosynthesis of GSH increases the oxidation of H₂DCF [21] relative to the control in RAW 264.7 cells exposed to peroxynitrite, which is consistent with our hypothesis. However, these effects cannot be easily dissociated from direct scavenging of the peroxynitrite-derived oxidants by GSH. The depletion of GSH may also interfere in the PCBP-Fe(II) binding equilibrium and possibly with the reactivity of the LIP. Again, assuming the PCBP nature of LIP, it is also possible that protein amino acid residues act as the reducing agent for LIP-Fe⁴⁺O species. It is not unlikely that

the Ferrous LIP and peroxynitrite reaction actually generates ferric LIP and NO_2^- . Still, LIP could efficiently scavenge peroxynitrite anion while driving its oxidizing power into a single ferryl ($\text{LIP-Fe}^{4+}\text{O}$) or radical (NO_2^\bullet) pathway, which could then be more effectively neutralized by cellular reductants such as GSH and maybe ASC [78]. Nonetheless, the catalytic characteristics combined with the rate constant estimated for the reaction between the LIP and peroxynitrite ($k_6 = 1.4\text{--}40 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) suggest that the LIP may represent a relevant peroxynitrite reductase system in RAW 264.7 cells, efficiently competing with the reaction between peroxynitrite and CO_2 , which generates reactive radical oxidants. Given the ubiquity of LIP and that iron is a kinetic preferential target of peroxynitrite, it is tempting to conclude that the peroxynitrite and the LIP reaction is important in other cell types, especially in condition where peroxynitrite formation is likely such as infection and inflammation. However, this remains to be tested considering that the relevance of LIP at detoxifying peroxynitrite in cells depends on the concentration of the LIP itself and presumably on the activity of other peroxynitrite reductases systems that compete with the LIP for the oxidant, such as peroxiredoxins and glutathione peroxidases; the higher their concentration/activity the lower the LIP relevance (Equation (12)). Thus, the peroxynitrite reductase activity of LIP is probably cell type dependent.

The finding that the LIP attenuates the peroxynitrite-dependent oxidation apparently contradicts the documented pro-oxidant properties of the LIP. We extensively discussed this issue in our previous work [23]. It is important to point out again that the redox toxicity of the LIP is often rationalized in terms of its reaction with H_2O_2 , and that the pro-oxidant outcome of such interaction is not a shared feature with other peroxides. Furthermore, the toxic iron that accumulates in chronic conditions such as Hemochromatosis, Thalassemia Major, and brain disorders or trauma, ferroptosis [79,80] and in acute iron loading does not necessarily represent the LIP and may have different chemical properties, including different reactivity toward H_2O_2 and peroxynitrite. Kakhlon et al. [81] showed that iron associated with the LIP in K562 cells only demonstrably increased the hydrogen peroxide-dependent oxidation of proteins when the LIP levels were manipulatively raised to at least 2.6-fold above its basal conditions, suggesting that LIP is not an oxidant while bound to its cellular ligand, but that the species binding to the LIP had limiting buffer capacity. The possible PCBP1 and other iron proteins nature of the LIP cannot be ignored, and it is not yet known how the expression of these proteins is affected under different conditions of iron overload. Thus, the relationship between the LIP and the toxic iron source that develops and accumulates under situations in which iron is dysregulated is not straightforward. Production of the oxyferryl oxidant species $\text{LIP-Fe}^{4+}\text{O}$ (Scheme 1, Equation (6)) by the hypothetical reaction between peroxynitrite and the LIP may also appear conflicting with our results. However, $\text{LIP-Fe}^{4+}\text{O}$ is probably less reactive than peroxynitrite and its derived radical species. In addition, given the possible PCBP-GSH nature of the LIP, the $\text{LIP-Fe}^{4+}\text{O}$ oxidative power may be neutralized by GSH.

One last point is worth discussing. We [17] and others [18] have shown that the LIP also reacts with NO^\bullet . The competitive nature of the reaction of the LIP with NO^\bullet and with peroxynitrite is not surprising given that this is a shared property of iron compounds and iron proteins. We reason that the reaction of the LIP with NO^\bullet or peroxynitrite depend on the conditions, notably the availability of O_2^\bullet . Possibly, the formation of DNIC predominates under normal conditions, while the reaction between the LIP and peroxynitrite gains importance with increasing levels of O_2^\bullet given that the latter gradually outcompetes the LIP for NO^\bullet . In addition, the reaction of the LIP with NO^\bullet producing DNIC is rapid, but it is a complex multi-step process that requires at least two reversible NO^\bullet binding steps and the reduction of Fe(II) to Fe(I) [22,82], which may limit the formation of DNIC. Interestingly, the formation of DNIC prevents the LIP- and H_2O_2 -dependent oxidation of H_2DCF in RAW 264.7 cells [18]. Thus, with regard to the chemistry related to NO^\bullet and peroxynitrite, the LIP appears to exhibit complementary antioxidant activities under normal and oxidative conditions although this occurs through fundamentally different chemical mechanisms.

5. Conclusions

In summary, the LIP rapidly and possibly catalytically reacts with peroxynitrite. This reaction potentially attenuates the modifications made by peroxynitrite at biological targets, as we had shown in the case of protein carbonylation [23]. These findings broaden the conventional view of the reactivity of the LIP and have potential physiologically relevant implications in redox biology, particularly in infection and inflammation conditions when peroxynitrite is likely to be formed.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biom11091331/s1>, Quantification of total intracellular H₂DCF (reduced) loaded into RAW264.7 cells upon treatment (Figure S1) and accumulated DCF after cell treatment with NO[•] donor and paraquat. generation of fluxes of NO₂ (Figure S2), model for the oxidation of H₂DCF by peroxynitrite-derived radical oxidants (Equations (S1)–(S25)).

Author Contributions: Conceptualization, J.C.T.J.; Methodology J.C.T.J. and A.L.C.; investigation, A.L.C.; writing—original draft preparation, J.C.T.J.; writing—review and editing, J.C.T.J. and A.L.C.; funding acquisition, J.C.T.J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Grant 2013/07937-8 and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

- Ganz, T.; Nemeth, E. Iron homeostasis in host defence and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **2015**, *15*, 500–510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Epsztejn, S.; Kakhlon, O.; Glickstein, H.; Breuer, W.; Cabantchik, Z.I. Fluorescence analysis of the labile iron pool of mammalian cells. *Anal. Biochem.* **1997**, *248*, 31–40. [[CrossRef](#)]
- Rouault, T.A. The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 406–414. [[CrossRef](#)]
- Breuer, W.; Epsztejn, S.; Cabantchik, Z.I. Dynamics of the cytosolic chelatable iron pool of K562 cells. *FEBS Lett.* **1996**, *382*, 304–308. [[CrossRef](#)]
- Camarena, V.; Huff, T.C.; Wang, G.F. Epigenomic regulation by labile iron. *Free Radic. Biol. Med.* **2021**, *170*, 44–49. [[CrossRef](#)]
- Kruszewski, M. Labile iron pool: The main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagenesis* **2003**, *531*, 81–92. [[CrossRef](#)]
- Lin, L.S.; Wang, S.; Deng, H.Z.; Yang, W.J.; Rao, L.; Tian, R.; Liu, Y.; Yu, G.C.; Zhou, Z.J.; Song, J.B.; et al. Endogenous Labile Iron Pool-Mediated Free Radical Generation for Cancer Chemodynamic Therapy. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 15320–15330. [[CrossRef](#)]
- Jiang, Z.Y.; Wang, Z.W.; Chen, L.; Zhang, C.; Liao, F.Y.; Wang, Y.W.; Wang, Y.; Luo, P.; Luo, M.; Shi, C.M. Artesunate induces ER-derived-ROS-mediated cell death by disrupting labile iron pool and iron redistribution in hepatocellular carcinoma cells. *Am. J. Cancer Res.* **2021**, *11*, 691.
- Golfeyz, S.; Lewis, S.; Weisberg, I.S. Hemochromatosis: Pathophysiology, evaluation, and management of hepatic iron overload with a focus on MRI. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2018**, *12*, 767–778. [[CrossRef](#)]
- Kew, M.C. Hepatic Iron Overload and Hepatocellular Carcinoma. *Liver Cancer* **2014**, *3*, 31–40. [[CrossRef](#)]
- Miyaniishi, K.; Tanaka, S.; Sakamoto, H.; Kato, J. The role of iron in hepatic inflammation and hepatocellular carcinoma. *Free Radic. Biol. Med.* **2019**, *133*, 200–205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Chang, H.C.; Shapiro, J.S.; Ardehali, H. Getting to the “Heart” of Cardiac Disease by Decreasing Mitochondrial Iron. *Circ. Res.* **2016**, *119*, 1164–1166. [[CrossRef](#)]
- Siri-Angkul, N.; Chattipakorn, S.C.; Chattipakorn, N. Diagnosis and treatment of cardiac iron overload in transfusion-dependent thalassemia patients. *Expert Rev. Hematol.* **2018**, *11*, 471–479. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lawen, A.; Lane, D.J.R. Mammalian Iron Homeostasis in Health and Disease: Uptake, Storage, Transport, and Molecular Mechanisms of Action. *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *18*, 2473–2507. [[CrossRef](#)]

15. De Domenico, I.; Ward, D.M.; Kaplan, J. Regulation of iron acquisition and storage: Consequences for iron-linked disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 72–81. [[CrossRef](#)]
16. Moos, T.; Morgan, E.H. The metabolism of neuronal iron and its pathogenic role in neurological disease—Review. *Redox-Act. Met. Neurol. Disord.* **2004**, *1012*, 14–26. [[CrossRef](#)]
17. Toledo, J.C.; Bosworth, C.A.; Hennon, S.W.; Mahtani, H.A.; Bergonia, H.A.; Lancaster, J.R. Nitric Oxide-induced Conversion of Cellular Chelatable Iron into Macromolecule-bound Paramagnetic Dinitrosyliron Complexes. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 28926–28933. [[CrossRef](#)]
18. Li, Q.; Li, C.Y.; Mahtani, H.K.; Du, J.; Patel, A.R.; Lancaster, J.R. Nitrosothiol Formation and Protection against Fenton Chemistry by Nitric Oxide-induced Dinitrosyliron Complex Formation from Anoxia-initiated Cellular Chelatable Iron Increase. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 19917–19927. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Hickok, J.R.; Sahni, S.; Shen, H.; Arvind, A.; Antoniou, C.; Fung, L.W.M.; Thomas, D.D. Dinitrosyliron complexes are the most abundant nitric oxide-derived cellular adduct: Biological parameters of assembly and disappearance. *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, *51*, 1558–1566. [[CrossRef](#)]
20. Meczynska, S.; Lewandowska, H.; Sochanowicz, B.; Sadlo, J.; Kruszewski, M. Variable inhibitory effects on the formation of dinitrosyl iron complexes by deferoxamine and salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone in K562 cells. *Hemoglobin* **2008**, *32*, 157–163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Bosworth, C.A.; Toledo, J.C.; Zmijewski, J.W.; Li, Q.; Lancaster, J.R. Dinitrosyliron complexes and the mechanism(s) of cellular protein nitrosothiol formation from nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 4671–4676. [[CrossRef](#)]
22. Truzzi, D.R.; Augusto, O.; Ford, P.C. Thiyl radicals are co-products of dinitrosyl iron complex (DNIC) formation. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 9156–9159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Damasceno, F.C.; Condeles, A.L.; Lopes, A.K.B.; Facci, R.R.; Linares, E.; Truzzi, D.R.; Augusto, O.; Toledo, J.C. The labile iron pool attenuates peroxynitrite-dependent damage and can no longer be considered solely a pro-oxidative cellular iron source. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 8530–8542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Kissner, R.; Nauser, T.; Bugnon, P.; Lye, P.G.; Koppenol, W.H. Formation and properties of peroxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis. *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10*, 1285–1292. [[CrossRef](#)]
25. Beckman, J.S.; Beckman, T.W.; Chen, J.; Marshall, P.A.; Freeman, B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite—Implications for endothelial injury from nitric-oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 1620–1624. [[CrossRef](#)]
26. Bonini, M.G.; Radi, R.; Ferrer-Sueta, G.; Ferreira, A.M.D.; Augusto, O. Direct EPR detection of the carbonate radical anion produced from peroxynitrite and carbon dioxide. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 10802–10806. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Pacher, P.; Beckman, J.S.; Liaudet, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* **2007**, *87*, 315–424. [[CrossRef](#)]
28. Shimanovich, R.; Groves, J.T. Mechanisms of peroxynitrite decomposition catalyzed by FeTMPS, a bioactive sulfonated iron porphyrin. *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, *387*, 307–317. [[CrossRef](#)]
29. Ferrer-Sueta, G.; Batinic-Haberle, I.; Spasojevic, I.; Fridovich, I.; Radi, R. Catalytic scavenging of peroxynitrite by isomeric Mn(III) N-methylpyridylporphyrins in the presence of reductants. *Chem. Res. Toxicol.* **1999**, *12*, 442–449. [[CrossRef](#)]
30. Furtmuller, P.G.; Jantschko, W.; Zederbauer, M.; Schwanninger, M.; Jakopitsch, C.; Herold, S.; Koppenol, W.H.; Obinger, C. Peroxynitrite efficiently mediates the interconversion of redox intermediates of myeloperoxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *337*, 944–954. [[CrossRef](#)]
31. Exner, M.; Herold, S. Kinetic and mechanistic studies of the peroxynitrite-mediated oxidation of oxyhemoglobin and oxyhemoglobin. *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, *13*, 287–293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Herold, S.; Exner, M.; Boccini, F. The mechanism of the peroxynitrite-mediated oxidation of myoglobin in the absence and presence of carbon dioxide. *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16*, 390–402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Rai, M.K.; Das, J.V.; Gupta, V.K. A sensitive determination of paraquat by spectrophotometry. *Talanta* **1997**, *45*, 343–348. [[CrossRef](#)]
34. Calderbank, A.; Yuen, S.H. An Ion-Exchange Method for Determining Paraquat Residues in Food Crops. *Analyst* **1965**, *90*, 99–106. [[CrossRef](#)]
35. Bakalar, M.H.; Joffe, A.M.; Schmid, E.M.; Son, S.; Podolski, M.; Fletcher, D.A. Size-Dependent Segregation Controls Macrophage Phagocytosis of Antibody-Opsonized Targets. *Cell* **2018**, *174*, 131–142.e13. [[CrossRef](#)]
36. Li, Q.; Lancaster, J.R. Calibration of nitric oxide flux generation from diazeniumdiolate (NO)-N-center dot donors. *Nitric Oxide-Biol. Chem.* **2009**, *21*, 69–75. [[CrossRef](#)]
37. Kakhlon, O.; Cabantchik, Z.I. The labile iron pool: Characterization, measurement, and participation in cellular processes. *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, *33*, 1037–1046. [[CrossRef](#)]
38. Alvarez, M.N.; Trujillo, M.; Radi, R. Peroxynitrite formation from biochemical and cellular fluxes of nitric oxide and superoxide. *Methods Enzymol.* **2002**, *359*, 353–366.
39. Zielonka, J.; Sikora, A.; Joseph, J.; Kalyanaram, B. Peroxynitrite Is the Major Species Formed from Different Flux Ratios of Co-generated Nitric Oxide and Superoxide: Direct reaction with boronate-based fluorescent probe. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 14210–14216. [[CrossRef](#)]
40. Wrona, M.; Patel, K.; Wardman, P. Reactivity of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms toward carbonated nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals. *Free Radic. Biol. Med.* **2005**, *38*, 262–270. [[CrossRef](#)]

41. Masumoto, K.; Kissner, R.; Koppenol, W.H.; Sies, H. Kinetic study of the reaction of ebselen with peroxynitrite. *FEBS Lett.* **1996**, *398*, 179–182. [[CrossRef](#)]
42. Possel, H.; Noack, H.; Augustin, W.; Keilhoff, G.; Wolf, G. 2,7-Dihydrodichlorofluorescein diacetate as a fluorescent marker for peroxynitrite formation. *FEBS Lett.* **1997**, *416*, 175–178. [[CrossRef](#)]
43. Wardman, P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: Progress, pitfalls, and prospects. *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, *43*, 995–1022. [[CrossRef](#)]
44. Sikora, A.; Zielonka, J.; Joseph, J.; Kalyanaram, B. Oxidation of Coumarin Boronate to Hydroxycoumarin by Different Fluxes of Nitric Oxide and Superoxide: Quantitative Measurements of Peroxynitrite under Various Nitric Oxide Superoxide Fluxes. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *47*, S36.
45. Sikora, A.; Zielonka, J.; Lopez, M.; Dybala-Defratyka, A.; Joseph, J.; Marcinek, A.; Kalyanaram, B. Reaction between Peroxynitrite and Boronates: EPR Spin-Trapping, HPLC Analyses, and Quantum Mechanical Study of the Free Radical Pathway. *Chem. Res. Toxicol.* **2011**, *24*, 687–697. [[CrossRef](#)]
46. Rios, N.; Piacenza, L.; Trujillo, M.; Martinez, A.; Demicheli, V.; Prolo, C.; Alvarez, M.N.; Lopez, G.V.; Radi, R. Sensitive detection and estimation of cell-derived peroxynitrite fluxes using fluorescein-boronate. *Free Radic. Biol. Med.* **2016**, *101*, 284–295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Squadrito, G.L.; Postlethwait, E.M. On the hydrophobicity of nitrogen dioxide: Could there be a "lens" effect for NO₂ reaction kinetics? *Nitric Oxide-Biol. Chem.* **2009**, *21*, 104–109. [[CrossRef](#)]
48. Signorelli, S.; Moller, M.N.; Coitino, E.L.; Denicola, A. Nitrogen dioxide solubility and permeation in lipid membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* **2011**, *512*, 190–196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Akaike, T.; Yoshida, M.; Miyamoto, Y.; Sato, K.; Kohno, M.; Sasamoto, K.; Miyazaki, K.; Ueda, S.; Maeda, H. Antagonistic action of Imidazolineoxyl N-oxides against endothelium-derived relaxing factor No through a radical reaction. *Biochemistry* **1993**, *32*, 827–832. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Akaike, T.; Maeda, H. Direct quantitation of nitric oxide released from cells using liposome-encapsulated PTIO. In Proceedings of the 4th International Meeting on the Biology of Nitric Oxide, Amelia Island, FL, USA, September 1995; p. 171.
51. Goldstein, S.; Russo, A.; Samuni, A. Reactions of PTIO and carboxy-PTIO with (NO)-N-center dot, (NO₂)-N-center dot, and O-2(center dot). *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 50949–50955. [[CrossRef](#)]
52. Espey, M.G.; Thomas, D.D.; Miranda, K.M.; Wink, D.A. Focusing of nitric oxide mediated nitrosation and oxidative nitrosylation as a consequence of reaction with superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 11127–11132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Kojima, H.; Nakatsubo, N.; Kikuchi, K.; Kawahara, S.; Kirino, Y.; Nagoshi, H.; Hirata, Y.; Nagano, T. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: Diaminofluoresceins. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2446–2453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Espey, M.G.; Miranda, K.M.; Thomas, D.D.; Wink, D.A. Distinction between nitrosating mechanisms within human cells and aqueous solution. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 30085–30091. [[CrossRef](#)]
55. Goldstein, S.; Czapski, G. Indirect oxidation of ferrocyanide by peroxynitrite—Evidence against the formation of hydroxyl radicals. *Nitric Oxide-Biol. Chem.* **1997**, *1*, 417–422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Forni, L.G.; Moraarellano, V.O.; Packer, J.E.; Willson, R.L. Nitrogen-dioxide and related free-radicals—electron-transfer reactions with organic-compounds in solutions containing nitrite or nitrate. *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 2* **1986**, 1–6. [[CrossRef](#)]
57. Kirsch, M.; de Groot, H. Ascorbate is a potent antioxidant against peroxynitrite-induced oxidation reactions—Evidence that ascorbate acts by re-reducing substrate radicals produced by peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 16702–16708. [[CrossRef](#)]
58. Chen, Y.L.; Kong, X.L.; Xie, Y.Y.; Hider, R.C. The interaction of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) and salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH) with iron. *J. Inorg. Biochem.* **2018**, *180*, 194–203. [[CrossRef](#)]
59. Herold, S.; Koppenol, W.H. Peroxynitritometal complexes. *Coord. Chem. Rev.* **2005**, *249*, 499–506. [[CrossRef](#)]
60. Damasceno, F.C.; Facci, R.R.; da Silva, T.M.; Toledo, J.C. Mechanisms and kinetic profiles of superoxide-stimulated nitrosative processes in cells using a diaminofluorescein probe. *Free Radic. Biol. Med.* **2014**, *77*, 270–280. [[CrossRef](#)]
61. Denicola, A.; Freeman, B.A.; Trujillo, M.; Radi, R. Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: Kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations. *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, *333*, 49–58. [[CrossRef](#)]
62. Lyman, S.V.; Hurst, J.K. Rapid reaction between peroxynitrite ion and carbon-dioxide—implications for biological-activity. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8867–8868. [[CrossRef](#)]
63. Ogusucu, R.; Rettori, D.; Munhoz, D.C.; Netto, L.E.S.; Augusto, O. Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: Rate constants by competitive kinetics. *Free Radic. Biol. Med.* **2007**, *42*, 326–334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Trujillo, M.; Ferrer-Sueta, G.; Radi, R. Kinetic studies on peroxynitrite reduction by peroxiredoxins. In *Nitric Oxide, Pt G: Oxidative and Nitrosative Stress in Redox Regulation of Cell Signaling*; Cadenas, E., Packer, L., Eds.; Methods in Enzymology; Elsevier Academic Press Inc: San Diego, CA, USA, 2008; Volume 441, pp. 173–196.
65. Yang, Y.S.; Balcarcel, R.R. Determination of carbon dioxide production rates for mammalian cells in 24-well plates. *Biotechniques* **2004**, *36*, 286–295. [[CrossRef](#)]
66. Ferrer-Sueta, G.; Manta, B.; Botti, H.; Radi, R.; Trujillo, M.; Denicola, A. Factors Affecting Protein Thiol Reactivity and Specificity in Peroxide Reduction. *Chem. Res. Toxicol.* **2011**, *24*, 434–450. [[CrossRef](#)]
67. Milo, R. What is the total number of protein molecules per cell volume? A call to rethink some published values. *Bioessays* **2013**, *35*, 1050–1055. [[CrossRef](#)]

68. Wang, M.C.; Herrmann, C.J.; Simonovic, M.; Szklarczyk, D.; von Mering, C. Version 4.0 of PaxDb: Protein abundance data, integrated across model organisms, tissues, and cell-lines. *Proteomics* **2015**, *15*, 3163–3168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Hamed, M.Y.; Silver, J. Studies on the reactions of ferric iron with glutathione and some related thiols II. Complex-formation in the pH range 3 to 7. *Inorg. Chim. Acta-Bioinorg. Chem.* **1983**, *80*, 115–122. [[CrossRef](#)]
70. Hider, R.C.; Kong, X.L. Glutathione: A key component of the cytoplasmic labile iron pool. *Biomaterials* **2011**, *24*, 1179–1187. [[CrossRef](#)]
71. Cho, E.A.; Song, H.K.; Lee, S.H.; Chung, B.H.; Lim, H.M.; Lee, M.K. Differential in vitro and cellular effects of iron chelators for hypoxia inducible factor hydroxylases. *J. Cell. Biochem.* **2013**, *114*, 864–873. [[CrossRef](#)]
72. Philpott, C.C.; Patel, S.J.; Protchenko, O. Management versus miscues in the cytosolic labile iron pool: The varied functions of iron chaperones. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* **2020**, *1867*, 9. [[CrossRef](#)]
73. Patel, S.J.; Frey, A.G.; Palenchar, D.J.; Achar, S.; Bullough, K.Z.; Vashisht, A.; Wohlschlegel, J.A.; Philpott, C.C. A PCBP1-BolA2 chaperone complex delivers iron for cytosolic 2Fe-2S cluster assembly. *Nat. Chem. Biol.* **2019**, *15*, 872–881. [[CrossRef](#)]
74. Shi, H.F.; Bencze, K.Z.; Stemmler, T.L.; Philpott, C.C. A cytosolic iron chaperone that delivers iron to ferritin. *Science* **2008**, *320*, 1207–1210. [[CrossRef](#)]
75. Nandal, A.; Ruiz, J.C.; Subramanian, P.; Ghimire-Rijal, S.; Sinnamon, R.A.; Stemmler, T.L.; Bruick, R.K.; Philpott, C.C. Activation of the HIF Prolyl Hydroxylase by the Iron Chaperones PCBP1 and PCBP2. *Cell Metab.* **2011**, *14*, 647–657. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Frey, A.G.; Nandal, A.; Park, J.H.; Smith, P.M.; Yabe, T.; Ryu, M.S.; Ghosh, M.C.; Lee, J.; Rouault, T.A.; Park, M.H.; et al. Iron chaperones PCBP1 and PCBP2 mediate the metallation of the dinuclear iron enzyme deoxyhypusine hydroxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 8031–8036. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Leffers, H.; Dejgaard, K.; Celis, J.E. Characterization of 2 major cellular poly(rc)-binding human proteins, each containing 3 k-homologous (kh) domains. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *230*, 447–453. [[CrossRef](#)]
78. Zhou, L.F.; Zhang, L.X.; Wang, S.H.; Zhao, B.; Lv, H.H.; Shang, P. Labile iron affects pharmacological ascorbate-induced toxicity in osteosarcoma cell lines. *Free Radic. Res.* **2020**, *54*, 385–396. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Nishizawa, H.; Matsumoto, M.; Shindo, T.; Saigusa, D.; Kato, H.; Suzuki, K.; Sato, M.; Ishii, Y.; Shimokawa, H.; Igarashi, K. Ferroptosis is controlled by the coordinated transcriptional regulation of glutathione and labile iron metabolism by the transcription factor BACH1. *J. Biol. Chem.* **2020**, *295*, 69–82. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Zhang, C.P.; Liu, Z.X.; Zhang, Y.H.; Ma, L.; Song, E.Q.; Song, Y. “Iron free” zinc oxide nanoparticles with ion-leaking properties disrupt intracellular ROS and iron homeostasis to induce ferroptosis. *Cell Death Dis.* **2020**, *11*, 15. [[CrossRef](#)]
81. Kakhlon, O.; Gruenbaum, Y.; Cabantchik, Z.L. Repression of ferritin expression increases the labile iron pool, oxidative stress, and short-term growth of human erythroleukemia cells. *Blood* **2001**, *97*, 2863–2871. [[CrossRef](#)]
82. Pereira, J.C.M.; Iretskii, A.V.; Han, R.M.; Ford, P.C. Dinitrosyl Iron Complexes with Cysteine. Kinetics Studies of the Formation and Reactions of DNICs in Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 328–336. [[CrossRef](#)]