

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

GÉRSIKA BITENCOURT SANTOS

**AÇÃO DO NITRÓXIDO TEMPOL SOBRE A ATIVIDADE DO COMPLEXO
ENZIMÁTICO NADPH OXIDASE (Nox2) EM NEUTRÓFILOS**

Alfenas/MG
2016

GÉRSIKA BITENCOURT SANTOS

**AÇÃO DO NITRÓXIDO TEMPOL SOBRE A ATIVIDADE DO COMPLEXO
ENZIMÁTICO NADPH OXIDASE (Nox2) EM NEUTRÓFILOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Federal de Alfenas, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas

Área de Concentração: Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof^a Dr^a Máisa Ribeiro P. L. Brigagão

Co-orientador: Prof. Dr. Andres Trostchansky

Alfenas/MG
2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Santos, Gérsika Bitencourt.

Ação do nitróxido tempol sobre a atividade do complexo enzimático NADPH oxidase (Nox2) em neutrófilos / Gérsika Bitencourt Santos. -- 2016.

97 f. : il.

Orientadora: Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, 2016.

Bibliografia.

1. Antioxidantes. 2. Inflamação. 3. Neutrófilos. I. Brigagão, Maísa Ribeiro Pereira Lima. II. Título.

CDD 572

GÉRSIKA BITENCOURT SANTOS**“Ação do nitróxido tempo! sobre a atividade do complexo enzimático NADPH oxidase (Nox2) em neutrófilos”**

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Aprovada em: 02/09/2016


Profa. Dra. Maira Ribeiro P. Lima Brigagão
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profa. Dra. Ana Lochabel Soares Moretti
Instituição: IAMSPE/SP

Assinatura: 

Prof. Dr. Pio Colepícolo Neto
Instituição: USP/SP

Assinatura: 

Profa. Dra. Marília Gabriella A. Goulart Pereira
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profa. Dra. Fernanda Borges de Araújo Paula
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Dedico a DEUS, pelo dom da vida e do saber. Aos meus Pais, Gerson e Elena, aos irmãos Leandro e Júnior, ao meu esposo e fiel companheiro Giulliano, pelo amor e compreensão durante a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

- À Prof^a. Dr^a. Maisa Ribeiro Pereira Lima Brigagão, por todos os ensinamentos, paciência, confiança, dedicação, cuidado e amizade.
- Ao Prof. Dr. Andres Trosthansky, que me permitiu concluir este trabalho, através das análises realizadas em Montevideo. Obrigada pela oportunidade de amadurecimento e pela sensação de dever cumprido e de conhecimento adquirido.
- Ao Prof. Dr. Francisco Laurindo por ceder gentilmente seu laboratório para aprendizado e realização de experimentos no Instituto do Coração – InCor – USP. Obrigada Chico pelas dicas de experimento e apoio, sempre.
- Ao doutorando Cláudio Daniel pelas valiosas contribuições durante a redação dos artigos científicos e pelas conversas científicas no laboratório.
- Às professoras Dr^a. Fernanda, Dr^a Maria Rita, Dr^a Marília Pereira e Dr^a Marisa Ionta pelas valiosas contribuições no exame de qualificação geral e específico.
- Ao Maurício e Lucía (Facultad de Medicina da Universidad de Montevideo) por toda ajuda e dedicação durante as análises realizadas.
- À Prof^a. Dr^a. Ohara Augusto e Dr^a. Edlaine Linares do Instituto de Química, USP, São Paulo, SP, Brazil por permitir o uso do equipamento e pela ajuda nos experimentos envolvendo EPR.
- Aos amigos e colegas de Doutorado, que nestes anos sempre acrescentaram em minha formação e vida, principalmente a Patrícia Lunardelli, André Viana, Olímpia, Aline Pereira, Bruno Salles, Alessandra Pupin, eterna gratidão a todos.
- Aos funcionários e professores do Laboratório de Bioquímica: Rose, Val, Marta (querida e conselheira), Prof. José Maurício, Plínio, Denise, Marília, Terezinha e Lira que colaboraram durante esses anos de jornada intensa entre estudo e trabalho.
- Aos técnicos e amigos Gabriel e George, pelos importantes auxílios com vidrarias e preparo de reagentes. Sem vocês, tudo ficaria mais difícil.
- A Deus e Nossa Senhora por todas as bênçãos.
- Ao meu esposo Giulliano, por seu carinho, apoio e compreensão durante a concretiza de cada pedacinho deste trabalho.
- À minha mãe, por sua presença infinita e incondicional durante todas as etapas de minha vida. Ao meu pai pelas orações.

- Aos meus queridos irmãos! Pelo apoio, incentivo e momentos de amizade e descontração que permitem a união de nossa família, mesmo à distância!
- A minha sogra Berê, pelas velas acesas durante meu exame de ingresso, as minhas qualificações e sempre que preciso. Ao meu sogro Sarda (*in memoriam*) que nunca mediu esforços para me ajudar em todos os momentos da minha vida.
- Às companheiras diárias de trabalho (Maria Tereza e Luisa Messoria) que com certeza deram todo suporte necessário para permitir minhas ausências esporádicas sem comprometimento das minhas obrigações como professora. Obrigada pela amizade, apoio e compreensão!
- Aos meus queridos amigos, Frank e Adriana que sempre torceram por mim.
- Aos amigos e colegas de trabalho, pelos 5 minutos de prosa com palavras incentivadoras.
- À Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS- Alfenas) pela disponibilidade para viagens, congressos e por apoiar a ida à Montevideo para realização de experimentos.
- À Universidade Federal de Alfenas, por toda estrutura disponibilizada nos laboratórios.
- À Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas pelo apoio necessário para a realização desta pesquisa.
- A todos que direta ou indiretamente participaram na realização desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“Os sonhos não determinam o lugar onde vocês vão chegar, mas produzem a força necessária para tirá-los do lugar em que vocês estão”.

(Augusto Cury, 2003)

RESUMO

A identificação de novos alvos para controlar o processo inflamatório é, provavelmente, o principal desafio que dificulta o desenvolvimento de novas drogas anti-inflamatórias. Assim, a modulação das vias de sinalização intracelulares em fagócitos desponta como uma forma interessante de alcançar este objetivo. No entanto, isso pode trazer como consequência a diminuição da defesa do hospedeiro contra patógenos. Este estudo teve como objetivo examinar se o nitróxido 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi (Tempol) exerce efeito sobre produção de oxidantes por neutrófilos inflamatórios através da regulação da atividade de proteínas quinases e da proteína dissulfeto isomerase (PDI), uma chaperona cujos sítios ativos contêm o motivo Cys-Gly-His-Cys (CXXC) e está envolvida na montagem do complexo enzimático NADPH oxidase (Nox2) de fagócitos. Vias bioquímicas diferentes foram ativadas para a liberação de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos inflamatórios, e, paralelamente, a atividade de proteínas quinases foi determinada sob efeito de Tempol nos fagócitos. O nitróxido inibiu significativamente o burst oxidativo dos neutrófilos de maneira dependente da concentração. Este efeito foi detectado pelo consumo de oxigênio, onde a IC50 encontrada foi de $45 \pm 4 \mu\text{M}$. Utilizando-se ensaios de quimioluminescência dependente de luminol ou de isoluminol, mostramos que o Tempol provocou um atraso no período de resposta latente da ativação de Nox2 dos neutrófilos sob diferentes estímulos. Coerentemente, o nitróxido inibiu a atividade de proteínas quinases de neutrófilos estimuladas por diferentes vias bioquímicas, como quantificado por ensaios quimioluminescentes e por teste *dot blot*. Nas mesmas condições, Tempol reduziu a atividade fungicida de neutrófilos contra *Candida albicans*. Na presença de Tempol a atividade redutase de PDI foi reversivelmente afetada tanto *in vitro* como em neutrófilos inflamatórios estimulados, cuja IC50 de $35 \pm 3,3 \mu\text{M}$ foi calculada através de metodologia de espectrofluorescência. Esta atividade inibitória foi confirmada com o método espectrofotométrico de enovelamento de insulina. Foi utilizada PDI recombinante para ser estudado o mecanismo de inibição que o Tempol exerce sobre a esta tiol óxido-redutase, através de espectrometria de massa. Na análise da proteína total, 1 e 4 moléculas de Tempol foram detectadas ligadas à proteína. No entanto, somente uma molécula do nitróxido foi encontrada ligada covalentemente à PDI. Mais especificamente, a Cys400 foi modificada por Tempol. Em conjunto, os resultados revelam um novo mecanismo do Tempol sobre a regulação de enzimas associadas à atividade do complexo Nox2 de neutrófilos inflamatórios, os quais apresentam aplicações clínicas potenciais para intervenção

terapêutica em processos patológicos. Entretanto, o possível uso do Tempol como agente anti-inflamatório deve ser cauteloso, uma vez que este nitróxido diminuiu a resposta microbicida de neutrófilos.

Palavras-chave: NADPH oxidase. Proteína Quinase. Proteína Dissulfeto Isomerase. Tempol.

ABSTRACT

The identification of new targets for controlling inflammatory processes is, almost certainly, the major challenge that hampers the development of new anti-inflammatory drugs. Thus, the modulation of intracellular signaling pathways in phagocytes emerges as an interesting way to achieve this goal. However, this strategy can bring the effect of lowering the host defense against pathogens. This study aimed to examine whether the nitroxide 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy (Tempol) has an effect on production of oxidants by inflammatory neutrophils through regulation of protein kinase activity and protein disulfide isomerase (PDI), a chaperone whose active sites containing the motif Cys-Gly-His-Cys (CXXC) and is involved in the assembly of the NADPH oxidase enzyme complex (Nox2) on phagocytes. Different biochemical pathways were activated for the release of reactive oxygen species by inflammatory neutrophils, and, in parallel, the protein kinase activities were determined under Tempol treatment of phagocytes. The nitroxide significantly inhibited oxidative burst of neutrophils in a concentration dependent manner. This effect was detected by oxygen consumption, where the IC₅₀ was found to be 45±4 μM. By means of chemiluminescence luminol- or isoluminol-dependent assay, we showed that Tempol caused a delay in the lag period of neutrophils Nox2 activation under different stimuli. Accordingly, the nitroxide inhibited the activity of protein kinases in neutrophils stimulated by various biochemical pathways, as quantitated by chemiluminescent assays and dot blot test. Under the same conditions, Tempol reduced neutrophil fungicidal activity against *Candida albicans*. In the presence of Tempol, PDI reductase activity was reversibly affected both *in vitro* and in stimulated inflammatory neutrophils, whose IC₅₀ of 35±3.3 μM was calculated by fluorescent methodology. This inhibitory activity was confirmed by the spectrophotometric insulin method. Recombinant PDI was used for the purpose of studying the mechanism of inhibition that Tempol exerts on this thiol oxide reductase enzyme, by mass spectrometry. In the analysis of total protein, 1 and 4 molecules of Tempol were detected bound to the protein. However, only one molecule of the nitroxide was found covalently linked to PDI. More specifically, Cys400 has been changed by Tempol. Together, these results reveal a novel mechanism of Tempol on the regulation of enzymes associated with Nox2 complex inflammatory activity of neutrophils, which have potential clinical applications for therapeutic intervention in pathological processes. However, the promising use of Tempol as an anti-

inflammatory agent must be taken with caution, since this nitroxide decreased neutrophil microbicidal response.

Key-words: NADPH oxidase. Protein Kinase. Protein Dissulfide Isomerase. Tempol.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	- adenosina trifosfato
cDNA	- ácido desoxirribonucléico complementar
cGMP	- guanosina monofosfato cíclica
Cys	- cisteína
DAG	- diacilglicerol
DGC	- doença granulomatosa crônica
DNA	- ácido desoxirribonucléico
DPI	- difenil iodônio
D-PBS-G	- tampão salina-fosfato
DTNB	- ácido ditionitrobenzóico
DTT	- ditionitroreitol
EC	- classificação enzimática
ED ₅₀	- dose efetiva para inibição de 50%
EDTA	- ácido etilenodiamino tetra-acético
E-GSH	- glutatona reduzida associada à eosina
EPR	- ressonância paramagnética eletrônica
ERO	- espécie reativa de oxigênio
ERN	- espécie reativa de nitrogênio
FAD	- flavina adenina dinucleotídeo
fMLP	- formil-metionil-leucil-fenilalanina
GR	- glutatona redutase
GSH	- glutatona reduzida
GSSG	- glutatona oxidada
GST	- glutatona S-transferase
H ₂ O ₂	- peróxido de hidrogênio
HO•	- radical hidroxila

HO ₂ •	- radical hidroperoxil
HPLC	- cromatografia líquida de alta eficiência
HRP	- peroxidase
HOCl	- ácido hipocloroso
IC ₅₀	- concentração para inibição de 50%
LC/MS-MS	- cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas
MPO	- mieloperoxidase
MS	- espectrômetro de massas
MTT	- 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NADPH	- nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NETs	- armadilhas extracelulares de neutrófilos
NF-κB	- fator de transcrição nuclear kappa B
•NO	- óxido nítrico
NOS	- óxido nítrico sintase
Nox	- oxidase não fagocítica
¹ O ₂	- oxigênio singlete
O ₂	- oxigênio
O ₂ • ⁻	- ânion radical superóxido
ONOO ⁻	- peroxinitrito
PAO	- óxido de fenilarsina
PBS	- tampão salina-fosfato
PDI	- proteína dissulfeto isomerase
pH	- potencial hidrogeniônico
PMA	- forbol 12-miristato 13-acetato
PMN	- polimorfonucleares
PMSF	- fluoreto de fenilmetilsulfonil
PVDF	- fluoreto de polivinilideno
RE	- retículo endoplasmático

RRP - região rica em prolina
Se-Gpx - glutathione peroxidase
SOD - superóxido dismutase
SDS - dodecilsulfato de sódio
Txr - tioredoxina reductase
UFC - unidade formadora de colônia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura e ativação do complexo enzimático NADPH oxidase no fagócito.....	27
Figura 2 -	Produção de ERO/ERN por fagócitos.....	28
Figura 3 -	Vias de sinalização celular que levam à liberação de ânion superóxido por neutrófilos ativados por diferentes agentes, forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) e zimozan opsonizado (ZIops)	30
Figura 4 -	Organização dos domínios da PDI	33
Figura 5 -	Esquema ilustrativo da atividade da PDI como chaperona molecular...	34
Figura 6 -	Atividade catalítica na formação e rompimento e na isomerização de pontes dissulfeto intermoleculares catalisadas por PDI.....	35
Figura 7 -	Estrutura química dos nitróxidos cíclicos.....	38
Figura 8 -	O processo redox de metabolização de nitróxidos.....	39
Figura 9 -	Representação esquemática da geração de quimioluminescência do luminol na presença de peróxido de hidrogênio.....	47
Figura 10 -	Oxidação da luciferina em presença de ATP.....	48
Figura 11 -	Determinação da atividade da PDI por HPLC.....	52
Figura 12 -	Efeito do Tempol e de conhecidos inibidores das proteínas quinases sobre a atividade do sistema Nox2 de neutrófilos.....	56
Figura 13 -	Produção de oxidantes totais e extracelulares por neutrófilos provenientes de focos inflamatórios tratados com Tempol.....	58
Figura 14 -	Detecção da atividade de quinases dos neutrófilos após tratamento com Tempol.....	60
Figura 15 -	Efeito do Tempol sobre a fosforilação de aminoácidos serina/treonina e análise do conteúdo de fosfotirosina detectados nos neutrófilos provenientes de focos inflamatórios.....	61
Figura 16 -	Papel do Tempol na capacidade fungicida dos neutrófilos provenientes de focos inflamatórios.....	63
Figura 17 -	Modulação da atividade da PDI por Tempol.....	66
Figura 18 -	Efeito do Tempol no conteúdo de tióis reduzidos em PDI.....	67

Figura 19 -	Tempol inibe a PDI em neutrófilos ativados.....	69
Figura 20 -	Detecção por fluorescência da atividade redutase da PDI em neutrófilos provenientes de focos inflamatórios.....	71
Figura 21 -	Análise por MS da ligação do Tempol à PDI.....	73
Figura 22 -	Detecção da ligação covalente do Tempol ao sítio ativo da PDI através da análise de LC-MS/MS.....	75

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	O PROCESSO INFLAMATÓRIO	21
2.1.1	Neutrófilos.....	22
2.2	O COMPLEXO NADPH OXIDASE	24
2.2.1	Envolvimento de proteínas quinases na regulação do complexo NADPH oxidase.....	27
2.2.2	Ativação do complexo NADPH oxidase.....	28
2.2.3	Produção de ERO/ERN e controle metabólico do estresse oxidativo.....	30
2.3	PROTEÍNA DISSULFETO ISOMERASE	31
2.3.1	Propriedades catalíticas da PDI e correlação com estados fisiológicos.....	35
2.4	NITRÓXIDOS CÍCLICOS	36
2.4.1	Propriedades antioxidantes e antiinflamatórias dos nitróxidos.....	38
3	OBJETIVOS.....	43
3.1	OBJETIVO GERAL	43
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
4	PARTE EXPERIMENTAL	44
4.1	DECLARAÇÃO ÉTICA.....	44
4.2	OBTENÇÃO DOS NEUTRÓFILOS PROVENIENTES DE FOCO INFLAMATÓRIO.....	45
4.3	EFEITOS DO TEMPOL NA EXPLOSÃO OXIDATIVA DE NEUTRÓFILOS.....	45
4.3.1	Consumo de oxigênio por neutrófilos inflamatórios.....	45
4.3.2	Produção de oxidantes por neutrófilos avaliados por método de quimiluminescência	46
4.4	AÇÃO DO TEMPOL SOBRE QUINASES DE NEUTRÓFILOS.....	46

4.4.1	Avaliação da atividade de quinases medidas pelo consumo de ATP.....	47
4.4.2	Detecção de fosfoproteínas através da técnica de dot blot.....	47
4.5	EFEITOS DO TEMPOL SOBRE A ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	48
4.6	EFEITOS DO TEMPOL SOBRE A ATIVIDADE REDUTASE DE PDI.....	48
4.6.1	Análise da atividade da PDI pelo método da insulina.....	49
4.6.2	Preparação de uma sonda fluorescente para medir a atividade redutase PDI..	49
4.6.2.1	Ação do Tempol sobre a atividade redutase da PDI	52
4.7	ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DA PDI.....	52
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1	EFEITO DO TEMPOL SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO.....	55
5.2	PRODUÇÃO DE OXIDANTES PELOS NEUTRÓFILOS	56
5.3	EFEITO DO TEMPOL SOBRE A ATIVIDADE DAS PROTEÍNAS QUINASES.....	58
5.4	EFEITO DO TEMPOL NO KILLING DE C. Albicans POR NEUTRÓFILOS.....	61
5.5	INIBIÇÃO DA ATIVIDADE REDUTASE DA PDI PELO TEMPOL.....	64
5.5.1	Tempol inibe a atividade redutase da PDI	64
5.5.2	Tempol afeta a atividade da PDI em neutrófilos.....	67
5.6	TEMPOL SE LIGA NO SÍTIO ATIVO a' DA PDI	71
6	CONCLUSÕES	76
	REFERÊNCIAS	77
	ANEXOS	93

1 INTRODUÇÃO

A inflamação é um dos principais mecanismos de defesa em mamíferos contra o trauma e infecções. É a resposta mais frequente e imediata desempenhada pela imunidade inata e está diretamente ligada à patologias infecto-inflamatórias bem como às auto-imunes (SOBOLEWSKI et al., 2010). As células efetoras neste processo são principalmente os fagócitos, que migram para o foco inflamatório para fagocitar e eliminar agentes estranhos. O complexo nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase encontrado em fagócitos (sistema Nox2) é a principal fonte de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que conduz à subsequente produção de outras espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) (LAMBETH et al., 2008). Contudo, a produção excessiva de oxidantes durante o burst oxidativo tem sido implicado em vários eventos vasculares, doenças imunológicas e inflamatórias (MITTAL, 2014). Como resultado, vigorosos esforços estão em andamento para desenvolverem inibidores específicos e clinicamente úteis do sistema Nox2 (LAMBETH et al., 2008).

A ativação do sistema Nox2 em fagócitos é desencadeada por diversos estímulos que promovem a translocação de componentes citosólicos para a membrana do fagossoma (HIRAN et al., 1998). O complexo NADPH oxidase é montado na membrana, pelo recrutamento de subunidades citosólicas, p47phox, p67phox, p40phox e Rac2, para o citocromo b558 ligado à membrana, que por sua vez é formado pelas subunidades p22phox e gp91phox. A regulação da atividade do sistema Nox2 é possível principalmente através de dois mecanismos: (i) separação das subunidades essenciais para a montagem do complexo enzimático em compartimentos sub-celulares distintos durante o estado de repouso e (ii) a modulação de interações proteína-proteína entre eles, de forma reversível. Portanto, os eventos que afetam as modificações pós-traducionais e alterações conformacionais na estrutura das subunidades ou na montagem do complexo NADPH oxidase (Nox2 em neutrófilos), tem um papel central no controle do burst oxidativo.

O sistema Nox2 é ativado por vários agentes que podem estar envolvidos em diferentes vias bioquímicas, levando à ativação do burst oxidativo (também conhecido como burst respiratório), um evento caracterizado por um aumento rápido e abrupto no consumo de oxigênio molecular (O_2) pelos fagócitos com subsequente conversão em $O_2^{\bullet-}$, com alto consumo dos níveis de glicose e mobilização de Ca^{2+} intracelular. Esta resposta fagocítica é

dependente de diversas vias bioquímicas (BORREGAARD, 1998; HAMPTON et al., 1998; LAMBETH et al., 2008).

Evidências mostram o envolvimento de proteínas quinases em respostas de sinalização fagocíticas (DALLE-DONNE et al., 2007; GOPALAKRISHNA; JAKEN, 2000). Quando o burst oxidativo é desencadeado pela ligação de um estímulo ao seu receptor específico, tal como tripeptídeos, a informação é transmitida através da maquinaria acoplada à membrana citoplasmática, via receptores acoplados à proteína G. Esta resposta leva à ativação de efetores que liberam mensageiros intracelulares e iniciam a fosforilação de proteínas citosólicas. Dentre elas, a proteína quinase A (PKA), a proteína quinase C (PKC), proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e outras tirosina-quinases que levam à fosforilação de várias proteínas, incluindo componentes citosólicos do sistema Nox2. Por outro lado, alguns forbóis ativam a Nox2 por ativar diretamente a atividade de PKC (HURST, 1987).

A proteína dissulfeto isomerase (PDI, 57 kDa) e seus homólogos são membros da superfamília de tioredoxinas (oxidoredutase), que são envolvidas no balanço redox e no enovelamento adequado de proteínas. Estas proteínas desempenham um papel importante na sinalização redox bem como no processamento oxidativo de peptídeos e proteínas ricas em cisteína (Cys), provenientes do retículo endoplasmático (RE), caracterizando a sua função chaperona, catalisando a quebra, formação e o rearranjo de ligações dissulfeto. Além disso, PDI participa da montagem do complexo NADPH oxidase em células fagocíticas (KHAN, MUTUS, 2014).

A função redox da PDI é devido à presença de um domínio/motivo altamente conservado, contendo a sequência Cys-Gly-His-Cys (CXXC), presente em seus dois sítios ativos. Quando as cisteínas deste resíduo estão no estado oxidado, PDI interage com dois grupos cisteinil-tiol de um peptídeo vizinho para formar uma ponte dissulfeto, ao passo que quando CXXC carrega dois cisteinil-tiois, PDI cliva as ligações dissulfeto vizinhas. No RE, a PDI atua essencialmente como uma oxidase, mas na superfície da célula esta enzima atua como um redutase, catalisando as trocas tiol-dissulfeto e gerando, conseqüentemente, dois tióis livres de uma proteína alvo e um motivo CXXC oxidado (KHAN, MUTUS, 2014).

A proteína dissulfeto isomerase não só atua numa vasta gama de processos fisiológicos, como também suas alterações qualitativas e/ou quantitativas estão implicadas em vários processos patológicos, tais como as doenças neurodegenerativas, diabetes mellitus, doenças cardiovasculares e infecciosas, doenças originadas pelo estresse do RE e o câncer. Assim, em alguns casos, PDI pode representar um importante alvo para intervenção terapêutica farmacológica (BENHAM, 2012).

Tempol é um nitróxido estável, de baixo peso molecular, que permeia membranas biológicas e tem a capacidade antioxidante atuando sobre os várias EROs/ERNs formadas em sistemas biológicos (TEKE et al., 2008). A atividade do nitróxido envolve a regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias e a inibição enzimática dos danos oxidativos catalisada por mieloperoxidase (CUZZOCREA et al., 2000; FERNANDES et al., 2005; KHATTAB, 2006; SOULE et al., 2007; TEKE et al., 2008; THALER et al., 2010; TSUHAKO et al., 2010).

Tempol é um eficaz sequestrante de EROs/ERNs, com excelente atividade mimética da enzima superóxido dismutase (SOD). Este nitróxido é capaz de interagir com uma vasta variedade de oxidantes, incluindo o $O_2^{\bullet-}$ gerado através de complexo de NADPH oxidase (diferentes isoformas de Nox) e seus derivados, tais como o radical hidroxila (HO^{\bullet}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peroxinitrito ($ONOO^-$). Além disso, este nitróxido atua sobre a enzima mieloperoxidase (MPO) e a óxido nítrico sintase (e iNOS). Tempol contém um grupo nitróxido e por meio de reações que envolvem a transferência de elétrons, ele pode ser reduzido a hidroxilaminas ou oxidado a cátion oxoamônio, com a capacidade de quebrar a cadeia de reações redox, apresentando um bom coeficiente de partição em compartimentos hidrofílicos e hidrofóbicos (SAMUNI; BARENHOLZ, 2003; SOULE et al., 2007; WILCOX; PEARLMAN, 2008).

Vários efeitos biológicos têm sido atribuídos ao Tempol, incluindo a proteção contra radiações, a quimioprevenção e atividade anti-câncer, efeitos positivos sobre a lesão de isquemia-reperfusão, a atenuação de doenças inflamatórias, efeitos cardioprotetores, diminuição das lesões e disfunções renais mediada pelo estresse oxidativo, efeitos anti-hipertensivos, melhoria e prevenção de doenças neurodegenerativas (doença de Parkinson), prevenção da obesidade, e redução de EROs/ERNs e armadilhas extracelulares dos neutrófilos (HOSSEINZADEH et al., 2012; SOULE et al., 2007; WILCOX, PEARLMAN, 2008).

Nos últimos anos, há uma grande busca a agentes antiinflamatórios potentes que não apresentem os efeitos colaterais típicos das drogas atualmente comercializadas. Recentemente, o fato de que antiinflamatórios comercializados como fármacos seguros, são mostrados como compostos danosos, em alguns casos, letais, levantam a hipótese de que vias bioquímicas diferentes devem ser estudadas detalhadamente como possíveis alvos celulares para novos compostos. Aliado a isso, o fato de que a longevidade da população está aumentando significativamente, o que determina uma incidência mais prolongada de patologias com componentes inflamatórios, torna de vital importância a pesquisa de novos mecanismos de prevenção e/ou minimização destas alterações do organismo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Inflamação é conceituada como uma reação dos tecidos vascularizados a um agente agressor, caracterizada morfológicamente pela saída de líquidos e células do sangue para o interstício tissular. Graças a esse fenômeno, o organismo localiza e elimina células, elementos estruturais alterados, microrganismos e outros agentes reconhecidamente estranhos. A inflamação é um mecanismo defensivo desenvolvido ao longo de séculos de evolução, o qual envolve uma complexa rede de moléculas e células, porém, em muitos casos pode causar danos ao organismo. Os problemas ocorrem quando a capacidade de eliminar substâncias estranhas ou tecidos lesados fica comprometida, ou podem ocorrer quando os mecanismos de regulação fisiológica sofrem alterações. Nesses casos, a inflamação traz malefícios, acarretando perda da função do órgão ou tecido (ABBAS; LICHTMAN, 2005; BRASILEIRO FILHO, 2004; RUBIN et al. 2006).

2.1 O PROCESSO INFLAMATÓRIO

Dentre as principais fontes de inflamação incluem infecções microbianas e virais, exposição a alérgenos, à radiação e a substâncias químicas tóxicas, doenças auto-imunes e crônicas, obesidade, consumo de álcool, uso de tabaco e uma dieta rica em calorias (AGGARWAL; VIJAYALEKSHMI; SUNG, 2009; SCHETTER; HEEGAARD; HARRIS, 2010).

Durante o processo inflamatório, ocorre elevação do suprimento sanguíneo no local da injúria, aumento da permeabilidade vascular, migração de granulócitos, monócitos e linfócitos e, simultaneamente, indução da liberação de mediadores químicos, tais como proteínas de fase aguda, eicosanóides e citocinas. Com a interrupção da ação do agente inflamatório, a liberação de mediadores é cessada, a circulação sanguínea retoma o equilíbrio hemodinâmico original e as células do exudato retornam à circulação sanguínea pelos vasos linfáticos (OHSHIMA et al., 2005).

Clinicamente a inflamação divide-se em padrões agudo e crônico, dependendo da persistência da lesão, dos sintomas clínicos e da natureza da resposta existente (RUBIN et al., 2006).

Define-se como inflamação aguda o estágio inicial de inflamação (imunidade inata), a qual é mediada através da ativação do sistema imune. Este tipo de inflamação ocorre por um curto tempo e é normalmente considerada benéfica para o hospedeiro. Se a inflamação permanecer por um período de tempo mais longo, designa-se de inflamação crônica, que pode predispor o hospedeiro a várias doenças crônicas (LIN; KARIN, 2007).

O acúmulo de líquidos e componentes do plasma no tecido afetado, estimulação intravascular de plaquetas e a migração de leucócitos polimorfonucleares (PMN – principalmente neutrófilos) do espaço intraluminal até o tecido extravascular são as características mais importantes da inflamação aguda.

A inflamação crônica é prolongada, com persistência de células inflamatórias e dano tecidual frequentemente resultando em reparo aberrante (RUBIN et al., 2006).

Muitos estudos têm examinado em detalhes as ações individuais e específicas dos elementos do sistema imune. Em especial, a resposta aguda do hospedeiro é vista como uma coalizão de elementos antimicrobianos, alguns transitórios e outros duradouros, que colaboram entre si para a criação de um ambiente fagocítico que promova a destruição da maioria dos agentes invasores (BALDRIDGE; GERARD, 2000).

2.1.1 Neutrófilos

As primeiras células a deixar os vasos, normalmente, são os polimorfonucleares (PMN). Os neutrófilos constituem as células mais encontradas no exsudato nas primeiras 24 horas após o início do processo inflamatório. Os monócitos começam a deixar os vasos 18 a 24 horas depois de iniciada a exsudação, mas, a partir daí, se acumulam rapidamente, passando a constituir as células dominantes após 24 horas do início do processo inflamatório. Os neutrófilos têm tempo de vida muito curto após a exsudação (8 horas em média), enquanto os macrófagos, derivados dos monócitos, sobrevivem por maior intervalo de tempo. Por esse motivo que, nas inflamações agudas, em geral predominam PMN, enquanto que nas crônicas, os leucócitos mais numerosos são aqueles derivados de mononucleares, linfócitos e plasmócitos (BRASILEIRO FILHO, 2004).

Os neutrófilos (PMN) medem, em média, 10-20 μm de diâmetro e têm núcleo segmentado, com três a cinco lóbulos. No citoplasma, exibem dois tipos principais de grânulos (cerca de 600 por célula). Os grânulos azurófilos (também chamados de primários),

que representam 10-20% do total, são lisossomos verdadeiros e contêm enzimas como mieloperoxidase, catepsina G, elastase, colagenase, muramidase, várias proteínas catiônicas microbidas, defensinas, além de hidrolases existentes nos lisossomos das demais células. O segundo tipo são os grânulos específicos (também chamados de secundários), contêm lisozima, lactoferrina, ativador de plasminogênio, histaminase e fosfatase alcalina (ABBAS; LICHTMAN, 2005; BRASILEIRO FILHO, 2004).

A população mais abundante de células sanguíneas brancas circulantes são os neutrófilos e são produzidos na medula óssea onde se originam de uma linhagem comum àquela dos fagócitos mononucleares. Um ser humano adulto produz mais de 10^{11} neutrófilos/dia, os quais podem migrar para locais de infecção ou lesão poucas horas após a entrada de microrganismos ou o contato com o agente agressor. Se os neutrófilos não forem recrutados, sofrem morte celular programada e são normalmente fagocitados por macrófagos residentes no fígado ou no baço (ABBAS ; LICHTMAN, 2005; BRASILEIRO FILHO, 2004).

Os monócitos, macrófagos tissulares, células dendríticas e neutrófilos são células inflamatórias que possuem a capacidade de reconhecer, internalizar e digerir materiais estranhos, como microrganismos ou fragmentos celulares através de um processo conhecido como fagocitose (RUBIN et al. 2006) e a sequência de eventos na qual estas células fagocitárias reconhecem e eliminam estes agentes estranhos ao organismo é bem conhecida, tendo sido reportada pela primeira vez nos finais de 1800 por um cientista russo, (METCHNIKOFF, 1883, citado por BABIOR, 2000) constituindo o processo de fagocitose. Durante a fagocitose, agentes estranhos ao organismo, após o englobamento pela membrana plasmática dos fagócitos, com formação do fagossoma, são internalizados e destruídos pelas enzimas lisossomais e pelos mecanismos oxidativos.

Os mecanismos não oxidativos constituem a fusão de lisossomos aos vacúolos fagocíticos com subsequente degranulação de proteínas, e os mecanismos oxidativos se caracterizam pela produção de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (ERO/ERN) pelo sistema NADPH oxidase (ABBAS; LICHTMAN, 2005; BRASILEIRO FILHO, 2004; GROEMPING et al. 2003).

2.2 O COMPLEXO NADPH OXIDASE

O sistema NADPH oxidase, especificamente a isoforma fagocitária Nox2, é conhecido como um dos primeiros complexos enzimáticos envolvidos na ação anti-patogênica de neutrófilos e outras células fagocíticas. Esta enzima é responsável pela produção de ERO/ERN, as quais são liberadas no interior do fagossoma (JONES; HANCOCK; MORICE, 2000).

Durante o processo inflamatório, a produção de oxidantes (ERO/ERN) inicia-se quando a célula de defesa (neutrófilo) recebe estímulos para o englobamento do corpo estranho, originando uma série de alterações metabólicas coordenadas, aproximadamente 30 segundos após a estimulação. A ativação do processo de fagocitose estimula no neutrófilo o evento conhecido como *burst* oxidativo ou respiratório, que é caracterizado pelo aumento abrupto do consumo de oxigênio, aumento da glicólise anaeróbica, mobilização de cálcio intracelular e produção de ERO/ERN (BABIOR, 2004; SEGAL, 2008). A forma reduzida de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) tem grande importância na ativação do *burst* respiratório; isso porque o NADPH é o doador de elétrons para o oxigênio extracelular, produzindo o radical ânion superóxido, $O_2^{\bullet-}$ (SEGAL et al., 2000).

Em neutrófilos não estimulados, o sistema NADPH oxidase (Nox2) está dormente e dissociado, com componentes presentes tanto no citossol quanto na membrana de grânulos secretórios. Esse sistema é rapidamente ativado quando os neutrófilos são expostos a estímulos adequados. A ativação do *burst* oxidativo envolve importantes mudanças de localização e atividades de diferentes subunidades deste complexo enzimático (BABIOR, 2004).

O complexo enzimático leva os elétrons do NADPH citoplasmático, gerado pela via de hexose monofosfato, e os transfere ao oxigênio no vacúolo fagocítico para produzir a espécie oxidante, ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (WIENTJES; SEGAL, 1995). Esse radical é a primeira espécie reativa de oxigênio formada, sendo produzido pela redução do oxigênio por um único elétron, e dando origem a outras espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio, uma vez que é capaz de agir como oxidante ou redutor (RIBEIRO et al., 2005). O sistema NADPH oxidase é composto por elementos presentes no citosol e componentes ligados à membrana de grânulos (gp91^{PHOX}, p22^{PHOX} e rap); esses últimos constituem o citocromo b558. A codificação do cDNA destas proteínas foi elucidada e os diferentes componentes foram clonados e sequenciados e a localização cromossômica foi identificada (DINAUER et al.,

1987; DINAUER et al., 1990; HARPER; CHAPLIN; LETO et al., 1990; LOMAX et al., 1989; ROYER-POKORA et al., 1986; SEGAL, 1985; PARKOS et al., 1988; TEAHAN et al., 1990; TEAHAN et al., 1987; VOLPP et al., 1989; YAMAGUCHI et al., 1989).

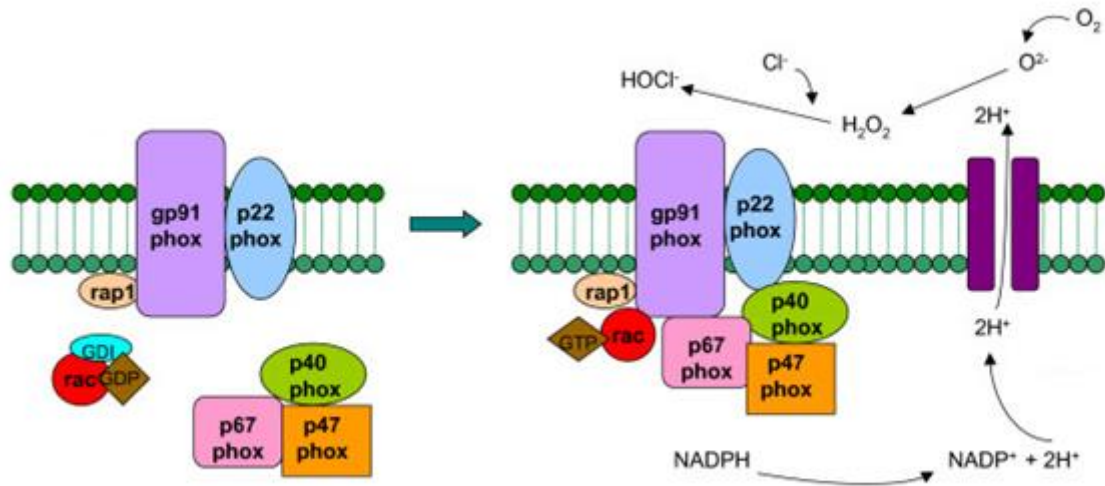
De acordo com Morel et al. (1991) e Babior (1992) a ativação da NADPH oxidase do fagócito catalisa a produção de $O_2^{\bullet-}$ a partir de oxigênio molecular e NADPH, de acordo com a reação a seguir:



Após a identificação dos componentes da oxidase através de estudo em células de pacientes com doença granulomatosa crônica (DGC) (HAMERS et al., 1984), foi observado que as duas subunidades gp91^{PHOX} e p22^{PHOX} são proteínas integrais de membrana, sendo que a subunidade gp91^{PHOX} contém os elementos responsáveis pela transferência de elétrons. A porção carboxi-terminal dessa proteína está voltada para o lado citosólico da membrana e contém os sítios de ligação para FAD (Flavina Adenina Dinucleotideo) e NADPH. A porção amino-terminal da subunidade forma uma sequência de seis domínios em α - hélice aos quais está ancorado um par de grupos heme (LAMBETH, 2007). Os grupos heme estão localizados perpendicularmente a ambos os lados da membrana, formando um conduto à passagem dos elétrons oriundos do NADPH citosólico em direção ao O_2 extracelular ou intra-fagosômico (ISOGAI; IZUKA; SHIRO, 1995). Enquanto isso, a subunidade p22^{PHOX} possui na porção C-terminal uma região rica em prolina (RRP) que se liga com o p47^{PHOX} fosforilado, evento indispensável à ativação do complexo enzimático (LAMBETH, 2007). O citocromo b558 desempenha uma função primordialmente regulatória e suas subunidades estão inativas na célula em estado de repouso. Após estímulos adequados, tais como ésteres de forbol, partículas opsonizadas, lipídios bioativos, peptídeos quimiotáticos (fMLP) ou anticorpos, as subunidades citosólicas migram do citosol para a membrana plasmática e se associam às subunidades de membrana (citocromo b558) (BABIOR, 1999; GROEMPING ; SUMIMOTO; MIYANO; TAKEYA, 2005). Quando o complexo enzimático é montado, os dois grupos heme localizados na subunidade gp91^{PHOX} transferem elétrons do NADPH citosólico para o oxigênio molecular, resultando na geração de ânion superóxido (CROSS, 1999).

Após a formação do complexo enzimático, reações subsequentes no fagossoma levam à produção de uma grande variedade de ERO/ERN, de forma coordenada. A Figura 1 ilustra a ativação do complexo Nox2, destacando-se a liberação do $O_2^{\bullet-}$ no fagossoma.

Figura 1- Estrutura e ativação do complexo enzimático NADPH oxidase no fagócito.



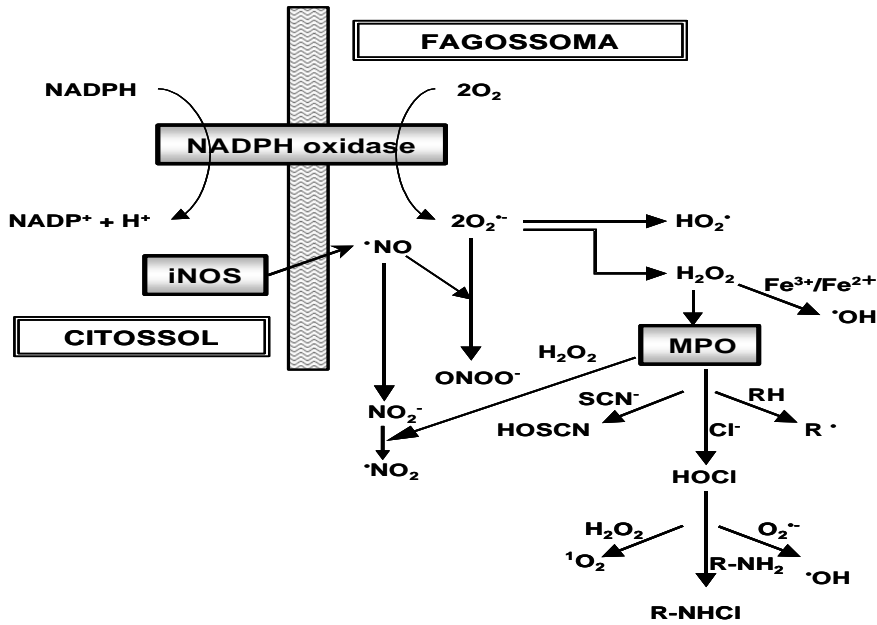
Fonte: Ilustração adaptada de: Assari, 2006.

Nota: Em neutrófilos em repouso, os componentes da NADPH oxidase estão espacialmente segregados entre citosol e membrana. Mediante estímulo, o complexo formado pelas unidades citosólicas p67^{PHOX}, p47^{PHOX}, p40^{PHOX} e Rac associa-se ao citocromo b558, possibilitando a transferência de elétrons do NADPH citosólico para o oxigênio molecular, o que resulta na geração de O₂^{•-}.

A produção de ERO/ERN por fagócitos é reconhecida como uma resposta de defesa contra agentes estranhos ao organismo, e, portanto, essencial para a sobrevivência. A partir do O₂, que se encontra no estado triplete, pode ser produzido O₂^{•-}, por ganho de um elétron, ou oxigênio singlete (¹O₂), por mudança do número de spin de um dos dois elétrons não pareados do O₂ através de uma reação endotérmica. Embora o O₂^{•-} não seja uma espécie oxidante forte, reações subsequentes deste radical levam à produção de ERO mais eficientes como microbicidas, por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical hidroxila (HO[•]). No fagossoma, o O₂^{•-} sofre dismutação, resultando na produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que, além de ser capaz de atravessar membranas e oxidar GSH e metionina, ativa a expressão de genes que estão sob o controle do fator de transcrição NF-κB. Além disso, este peróxido, através de reação de Fenton, na presença de metais como Fe²⁺ origina o radical hidroxila (HO[•]), extremamente reativo, capaz de causar danos em fitas de DNA, inativar diferentes enzimas, iniciar a lipoperoxidação de membranas. O O₂^{•-} pode, adicionalmente, sofrer protonação em meio ácido, originando a forma altamente reativa radical hidroperoxil (HO₂[•]). A mieloperoxidase (MPO), enzima que é liberada no fagossoma durante a fagocitose, catalisa a produção de ácido hipocloroso (HOCl), a partir de H₂O₂ e Cl⁻. Este ácido, altamente

reativo, é capaz de oxidar diferentes biomoléculas, servindo, ainda, de substrato para a produção subsequente de HO^\bullet e $^1\text{O}_2$ (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; HAMPTON; KETLE; WINTERBOURN, 1998) (Figura 2).

Figura 2- Produção de ERO/ERN por fagócitos.



Fonte: HAMPTON et al (1998).

Nota: Ressaltam-se os doadores citossólicos de elétrons para o sistema Nox2 que produz $\text{O}_2^{\bullet-}$ no fagossoma.

2.2.1 Envolvimento de proteínas quinases na regulação do complexo NADPH oxidase

Além de ser ativada por um grande número de partículas solúveis e outros fatores, a ativação da NADPH oxidase é acompanhada de três grandes eventos: fosforilação de proteínas, ativação de GTPase e translocação dos componentes citosólicos para a membrana plasmática (EL-BENNA, DANG, GOUGEROT-POCIDALO, 2008).

PKA (Protein kinase A), PKC (Protein kinase C), MAPKs (Mitogen Activated Protein Kinase) e outras tirosina quinases são ativadas durante a ativação dos fagócitos e fosforilam várias proteínas com importantes funções celulares, incluindo os componentes citosólicos da NADPH oxidase. Em neutrófilos humanos, várias proteínas quinases têm sido implicadas na regulação da atividade da NADPH oxidase, entre as quais a família PKC parece desempenhar um importante papel sobre a ativação por fMLP ou PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate),

embora outras quinases como ERK1/2, p38MAPK e PAK também possam participar (DANG et al., 2001; DANG et al., 2003; EL-BENNA et al., 2005; EL-BENNA, DANG, GOUGEROT-POCIDALO, 2008).

A produção de EROs é iniciada pela fosforilação da p47phox e a subsequente translocação das subunidades citosólicas. Acredita-se que a p47phox seja responsável pelo transporte do complexo citosólico para a membrana durante a ativação da enzima e por isso é considerada um organizador do complexo ativado da NADPH oxidase. A p67 phox também é fosforilada, embora em menor grau e p40phox é fracamente fosforilada. Enquanto todo esse complexo citoplasmático migra para se ligar ao complexo de membrana (flavocitocromo b558), Rac1/2 se dissocia do seu inibidor, migra independentemente e interage com p67phox e o flavocitocromo b558, resultando na ativação do complexo e na produção de EROs. p67phox é capaz de regular a atividade catalítica da enzima através de uma sequência chamada domínio de ativação. Acredita-se que este sítio presente em p67phox seja capaz de iniciar a transferência de elétrons de NADPH para FAD (DANG, CROSS, BABIOR, 2001; EL-BENNA, RUEDI, BABIOR, 1994; EL-BENNA et al., 2005; EL-BENNA, DANG, GOUGEROT-POCIDALO, 2008; NISIMOTO et al., 1999; GROEMPING, RITTINGER, 2005).

2.2.2 Ativação do complexo NADPH oxidase

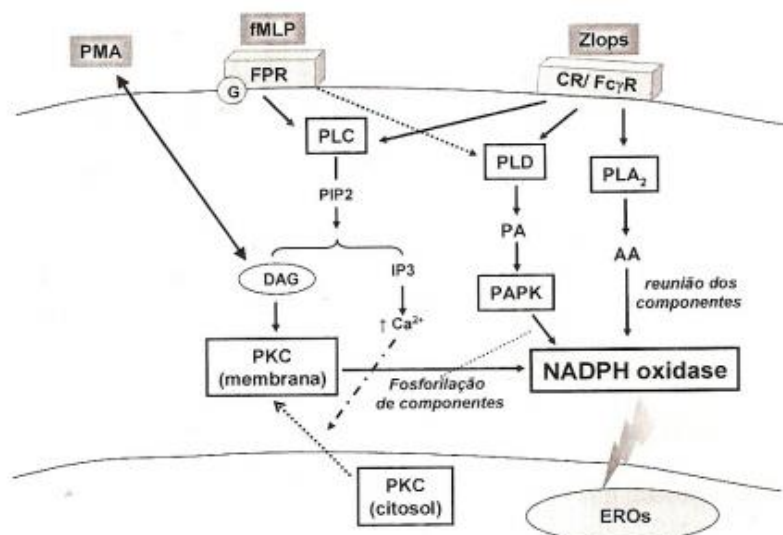
Uma grande variedade de agentes, tanto substâncias solúveis quanto particuladas, é capaz de estimular, seletivamente ou em conjunto, o sistema Nox2 em fagócitos. Entre as solúveis incluem-se os peptídeos quimiotáticos, como o formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), a concanavalina A, os leucotrienos, as citocininas, os ionóforos de cálcio, o fluoreto de sódio e os ésteres de forbol, como o forbol 12-miristato 13-acetato (PMA). Bactérias e leveduras opsonizadas que atuam pela via alternativa do complemento, complexos imunes formados pela interação antígeno/anticorpo que atuam pela via clássica do complemento e estreptolisina O são substratos particulados capazes de ativar fagócitos (JESIATIS et al., 1991).

Vias bioquímicas diferentes são ativadas na produção de $O_2^{\bullet-}$ por fagócitos, dependendo da natureza das células e do ativador utilizado (BRIGAGÃO; COLEPICOLO, 1996; BRIGAGÃO; BARROSO; COLEPICOLO, 2000; JESIATIS et al., 1991). PMA e

alguns de seus análogos são promotores tumorais descritos como capazes de disparar o *burst* respiratório em células fagocitárias através da ativação direta da proteína quinase C (PKC), o que independe de receptores de membranas. Estes forbóis são agonistas que se ligam diretamente ao domínio de ligação de diacilglicerol (DAG) da PKC, ativando-a por mudança conformacional e aumento da afinidade por íon cálcio, em algumas isoformas. Esta ativação determina que a mesma fosforile resíduos de serina e treonina em uma vasta gama de substratos protéicos (DYKE, 1991). Foi mostrado que a proteína p47^{PHOX} é, *in vitro*, substrato para PKC, e que a fosforilação nos seus diferentes resíduos de serina inicia a ativação do complexo Nox2 (BABIOR, 2000; SEGAL, 2008).

A ativação do complexo NADPH oxidase de neutrófilos por agonistas bem conhecidos, tais como PMA e fMLP (Figura 3), incluem a fosforilação de várias proteínas que conduzem à montagem deste complexo (RAAD, 2009). Assim, as proteínas quinases e fosfatases desempenham um papel central na ativação e manutenção do sistema Nox2 (JIANG, 2011). Em particular, PKC e tirosina-quinases participam da fosforilação da subunidade p47phox citosólica, que tem um papel importante na ativação de Nox2, uma vez que esta modificação induz uma alteração conformacional que permite a interação de p47phox com o flavocitocromo b558 e a subunidade p67phox (SEGAL, 2008).

Figura 3: Vias de sinalização celular que levam à liberação de ânion superóxido por neutrófilos ativados por diferentes agentes, forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) e zimozan opsonizado (Zlops).



Fonte: Adaptado de Caldefie-Chézet et. al., 2004.

2.2.3 Produção de ERO/ERN e controle metabólico do estresse oxidativo

As células geram energia principalmente através da redução do oxigênio molecular em água. Durante esse processo, pequenas quantidades de formas de oxigênio reativas parcialmente reduzidas são produzidas como um subproduto inevitável da respiração mitocondrial (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2006;). Como a oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do metabolismo, essencialmente todas as células aeróbicas produzem, naturalmente, ou por alguma disfunção biológica, quantidades significantes de ERO/ERN, sendo essa uma condição fisiológica associada a esse tipo de vida (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; GRISHAM, 2004).

Entre os danos mais graves ocasionados por ERO/ERN, estão aqueles causados ao DNA, envolvendo clivagem da ligação fosfodiéster, alteração de ribose e oxidação de bases. O maior gerador de ERO, a mitocôndria, é alvo de oxidação com consequências deletérias, tais como danos oxidativos no DNA da mitocôndria (CIRCU et al., 2009; RACHEK et al., 2009). O acúmulo de lesões no DNA tem consequências relacionadas à mutagênese e carcinogênese. Uma enzima que tenha seus aminoácidos alterados pode perder ou sofrer alteração de sua atividade catalítica. Ocorrendo na membrana celular, a oxidação de lipídios interfere no transporte ativo e passivo normal através da membrana, ou ocasiona a ruptura dessa, levando à morte celular. A oxidação de lipídios no sangue agride as paredes das artérias e veias, facilitando o acúmulo desses lipídios, com conseqüente aterosclerose, podendo causar trombose, infarto ou acidente vascular cerebral (MOREL et al. 2001; NIE et al. 2001; RIBEIRO et al. 2005; SIES, 1999).

A produção dessas espécies oxidantes pode ser observada em vias metabólicas como a da cadeia respiratória mitocondrial, via do catabolismo de purinas para a formação de ácido úrico, do sistema NADPH citocromo p-450 redutase microsomal, da síntese de prostaglandinas e isoprostanos, e de especial interesse nessa revisão, no sistema NADPH oxidase, também conhecido como Nox2 (BLANCK et al., 1991; GORSKY; KOOP; COON, 1984; ZHUKOV; ARCHAKOV, 1982; ZHUKOV; INGELMAN-SUNDBERG, 1999; RIBEIRO et al. 2005).

O organismo apresenta uma série de mecanismos endógenos e exógenos capazes de manter a concentração de ERO/ERN dentro de limites fisiológicos, os quais, quando ultrapassados seja por uma disfunção biológica ou por atuação de agentes externos, geram uma condição celular oxidativa associada a diversas patologias como, doenças inflamatórias,

vasculares, neurodegenerativas, de origem auto-imune, câncer e acidentes que envolvam isquemia e reperfusão (BIANCHI; ANTUNES, 1999; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2006; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; KOJDA; HARRISON, 1999; RIBEIRO et al., 2005).

Um dos mecanismos endógenos de controle da concentração de ERO/ERN é a ação de enzimas envolvidas na proteção antioxidante primária do organismo humano. Entre elas, cita-se a superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (Se-Gpx), glutatona redutase (Gr), glutatona S-transferases (GST), catalase, tioredoxina redutase (Txr) e as enzimas que catalisam reações geradoras de equivalentes redutores nos compartimentos citosólico e mitocondrial: glicose 6-fosfato desidrogenase, 6-fosfogluconolactona e transidrogenases. Através destas enzimas e da ação de antioxidantes não enzimáticos, o organismo mantém a concentração de oxidantes dentro dos limites fisiológicos (RIBEIRO et al., 2005).

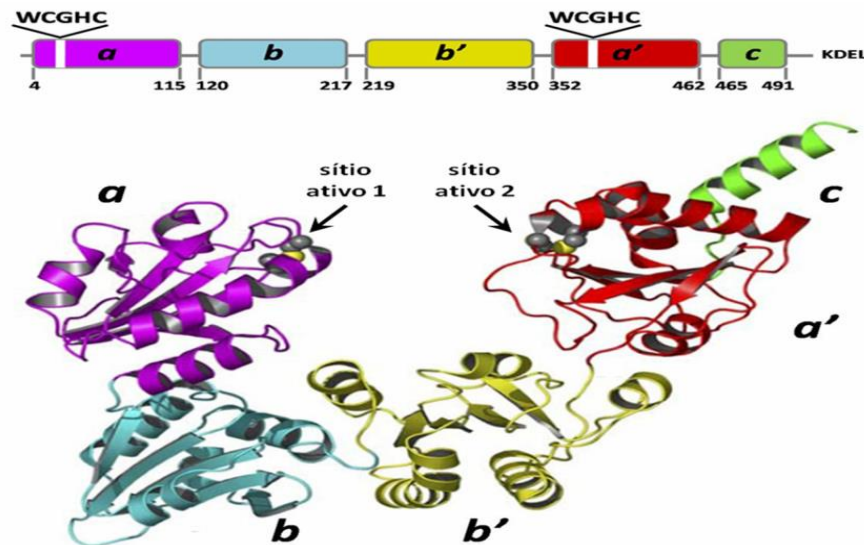
2.3. PROTEÍNA DISSULFETO ISOMERASE

A proteína dissulfeto isomerase (PDI, E.C. 5.3.4.1) é membro da grande classe proteica das tiol/dissulfeto oxidoredutases (tioredoxinas) encontradas no lúmen do retículo endoplasmático (RE) em células eucarióticas. Foi descrita pela primeira vez há mais de 40 anos como uma proteína de 58 kDa (PDI58) (GOLDBERGER; EPSTEIN; ANFINSEN, 1963), sendo hoje identificadas várias isoformas, tanto em células de mamíferos (ERp57, ERp72, ERp44, PDIR, P5, ERdj5 e PDIp) quanto em fungos e plantas (Eps1, Eug1, Mpd 1, Mpd2) e bactérias (DsbA e DsbC/G) (WILKINSON; GILBERT, 2004).

A PDI é organizada em cinco domínios (a, b, b', a', e c) (Figura 4) (DARBY; KEMMINK; CREIGHTON, 1996). O domínio a e a' da PDI são homólogos às tioredoxinas e cada um contém um sítio ativo independente. Cada sítio ativo contém duas cisteínas na sequência WCGHCK que media a atividade da PDI (EDMAN et al. 1985). Os domínios inativos (b e b') não são similares em sequência para as tioredoxinas. Os limites dos domínios são bem definidos pelo mapeamento e expressão proteolítica (DARBY; KEMMINK; CREIGHTON, 1996), e a eliminação e rearranjo de vários mutantes foram feitos (DARBY; PENKA; VINCENTELLI, 1998; XIAO et al., 2001). São disponíveis estruturas obtidas por ressonância (RMN) para os domínios a e b (KEMMINK et al., 1996; KEMMINK et al., 1997). O domínio a adota o esperado enovelamento característico de tioredoxina. Apesar da

falta de similaridade de sequência significativa, b também adota um enovelamento da tioredoxina (KEMMINK et al., 1997).

Figura. 4. Organização dos domínios da PDI.

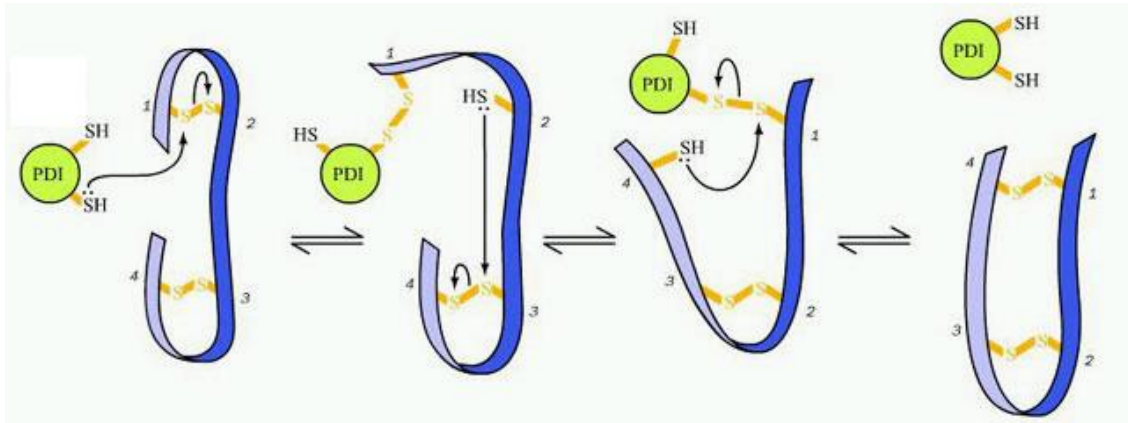


Fonte: KLAPPA et al., 1998.

Apesar da ausência de dados sobre a estrutura completa da PDI, evidências obtidas por velocidade de sedimentação e medidas de equilíbrio sugerem que esta proteína é um monômero alongado (WILKINSON; GILBERT, 2004) que apresenta duas atividades enzimáticas inter-relacionadas: (i) atividade de chaperona molecular, que assiste ao enovelamento de cadeias polipeptídicas nascentes e (ii) atividade de óxidorredutase, quando exerce catálise na formação, redução e isomerização de pontes dissulfeto intra- e/ou inter-moleculares.

O primeiro tipo de atividade catalítica, ilustrado na Figura 5, é essencial para evitar o enovelamento proteico incorreto, sendo que danos e erro de enovelamento às estruturas proteicas estão relacionados com patologias como doença de Alzheimer, enfisema pulmonar e infecções por príons (DOBSON, 2001). Recentemente foram descritas alterações no enovelamento proteico assistido por PDI no RE de células hepáticas associado ao diabetes insulino-dependente, onde as isoformas PDI58 e ERp57 mostraram-se com atividades catalíticas alteradas, fato diretamente ligado ao estado de óxido-redução de grupamentos tióis proteicos microsossomais (KERSTEEN; RAINES, 2003).

Figura 5. Esquema ilustrativo da atividade da PDI como chaperona molecular.

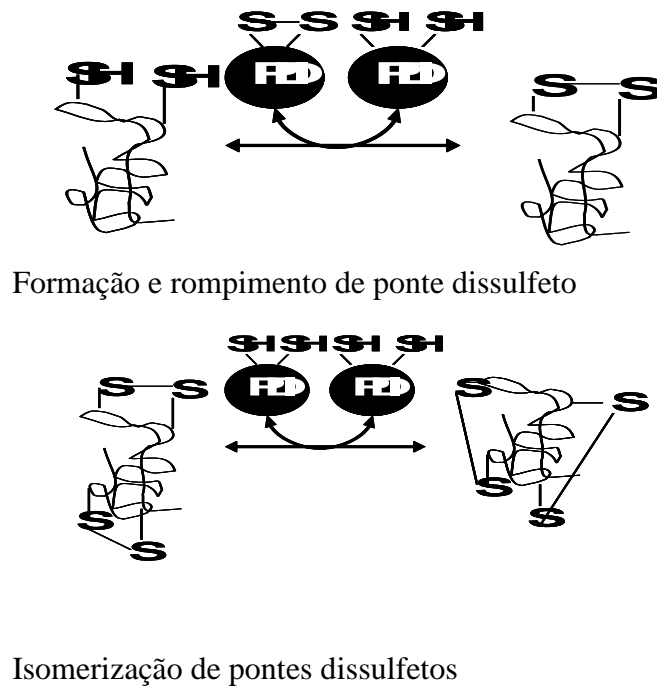


Fonte: www.bch.msu.edu/faculty

Nota: A cadeia polipeptídica nascente (esquerda) se re-enovela, atingindo a conformação correta (direita), através do reposicionamento de pontes dissulfeto intra-moleculares.

A atividade catalítica como oxidoreductase da PDI é atribuída ao domínio CXXC, característico das enzimas da família das ditiol/dissulfeto oxidoreductases. Durante a transferência de equivalentes oxidantes ou redutores para os substratos, o domínio CXXC posicionado em ambos os sítios ativos, passa pelo ciclo entre as formas reduzidas (ditiol) e oxidada (dissulfeto), onde a cisteína nucleofílica próxima à extremidade N-terminal da proteína inicia o ciclo catalítico da enzima (WALKER; LYLES; GILBERT, 1996). A atividade catalítica ocorre tanto na formação ou quebra quanto na isomerização de pontes dissulfeto em diferentes substratos, como mostrado na Figura 6. No primeiro caso, a PDI sofre uma mudança em seu estado de óxido-redução, enquanto que, no segundo evento enzimático, que requer a enzima com cisteínas em estado reduzido, não resulta em nenhuma oxidação na estrutura da PDI.

Figura 6. Atividade catalítica na formação e rompimento e na isomerização de pontes dissulfeto intra-moleculares catalisadas por PDI.



Fonte: Wilkinson; Gilbert, 2004.

A seqüência CXXC do sítio ativo, onde duas cisteínas catalizam a troca de uma ligação dissulfeto com os substratos ou dentro deles, é essencial para a função preliminar das PDI em promover o dobramento oxidativo da proteína no RE. Esse papel foi estendido em anos recentes para incluir papéis em outros processos tais como a degradação associada ao RE (ERAD), intercâmbio, homeostase do cálcio, apresentação do antígeno e a entrada de vírus em células eucarióticas. Algumas destas funções são executadas pelos membros catalíticos da família que carecem do sítio ativo das cisteínas.

Estresse de RE causa liberação de PDI, que pode dirigir-se à membrana plasmática, com conseqüentes alterações significativas em diferentes funções celulares. Este fato é claramente mostrado em células tratadas com tunicamicina (mistura de antibióticos homólogos extraídos de *Streptomyces sp.*, MM 844,95 g/mol), composto capaz de determinar estresse de RE através do bloqueio de glicosilação protéica (FUJITA et al., 2002) ou com tapsigargina, (ácido octanóico derivado de azuleno 4,5 β -furano, MM 650,75 g/mol) uma lactona sesquiterpênica que atua como potente liberador de cálcio intracelular de forma independente de inositol-3-fosfato, estressando o RE (OHUCHI et al., 1988).

2.3.1. Propriedades catalíticas da PDI e correlação com estados fisiológicos

Entre os muitos membros da superfamília tiorredoxina, as diferentes isoformas de PDI são as únicas que catalizam reações de isomerização, ou seja, reorganizam o posicionamento de pontes dissulfeto através de repetidos ciclos de oxidação e redução (ELLGAARD; RUDDOCK, 2005; FERRARI; SOLLING, 1999; NOIVA, 1999; WILKINSON; GILBERT, 2004) (Figura 6). A função clássica da PDI é promover o enovelamento proteico no RE (GRUBER et al., 2006). Esta função é assegurada pelo contínuo fornecimento de equivalentes oxidantes realizado pela Ero1 (*Endoplasmic reticulum oxidase - I*), uma oxidase residente do RE (APPENZELLER-HERZOG et al., 2008). Esta, por sua vez, é mantida na forma oxidada pela ação da glutatona oxidada (GSSG) oriunda do citossol (MOLTENI et al., 2004). De fato, a ação da PDI é consideravelmente influenciada pelo potencial redutor do meio, ou seja, pela razão entre as concentrações de glutatona reduzida/oxidada (GSH)/GSSG. No RE, dadas as condições relativamente oxidantes (razão GSH:GSSG~2-3:1), a PDI atua principalmente como uma oxidase, enquanto fora dele atua principalmente como uma redutase (razão GSH:GSSG>30-100:1) (WILKINSON; GILBERT, 2004). A PDI também possui atividade chaperona, auxiliando o enovelamento de proteínas destituídas de pontes dissulfeto (MOLTENI et al. 2004). Esta atividade está bem caracterizada como sendo independente dos tióis reativos da proteína (QUAN; FAN; WANG, 1995).

Há anos se conhece a ligação entre proteínas de RE e ativação fagocitária. Uma chaperona (ERp72) foi diretamente relacionada ao efeito de “priming” de neutrófilos (WEISBART, 1992). Além disso, sabe-se que um terço das proteínas celulares possuem pontes dissulfeto e, portanto, a degranulação neutrofílica correta é totalmente dependente do correto enovelamento proteico. Estresse de RE em neutrófilos está diretamente correlacionado a erros metabólicos, como disfunção de estoque de glicogênio tipo Ib (KIM et al., 2008).

A atividade chaperona de PDI foi recentemente mostrada como essencial à entrada rápida de $\cdot\text{NO}$ (óxido nítrico) em plaquetas, o que liga diretamente a atividade desta enzima ao evento de agregação plaquetária (SUSANNAH et al., 2007). No citado trabalho, bacitracina, óxido de fenilarsina (PAO) e anticorpo anti-PDI RL90, compostos inibidores de PDI, foram mostrados como capazes de inibir o acúmulo plaquetário de cGMP em resposta a vários doadores de $\cdot\text{NO}$, alterando sinalização bioquímica mediada por mecanismo radicalar .

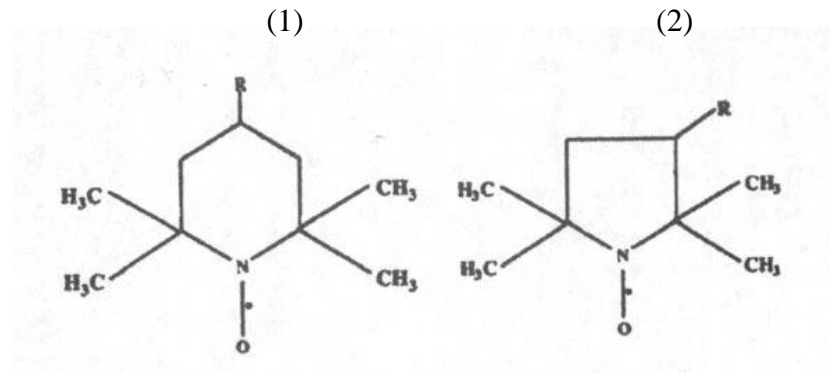
Relatos consistentes na literatura mostram uma das isoformas vasculares de NADPH oxidase, Nox1, diretamente relacionada à expressão e atividade de PDI. Células vasculares de músculos lisos de coelho transfectadas com cDNA para superexpressão de PDI produziram mais que o dobro do nível basal de ERO através de catálise de Nox1. Ainda, a expressão de componentes de outra isoforma vascular, Nox4, foi aumentada paralelamente à superexpressão induzida de PDI (FERNANDES et al., 2009).

2.4 NITRÓXIDOS CÍCLICOS

Os nitróxidos são quimicamente conhecidos como aminóxils ou nitroxils, que podem ser definidos como radicais livres sintéticos e estáveis, capazes de proteger células, tecidos e órgãos animais contra danos oxidativos (GOLDSTEIN et al., 2008).

Os representantes desse grupo possuem em sua estrutura um anel com cinco (pirrolidina, pirrolina ou oxazolidina) ou seis átomos (piperidina), sendo que um desses é de nitrogênio e os demais de carbono (Figura 7) (SOULE et al., 2007). Ao nitrogênio liga-se um átomo de oxigênio o qual possui elétron livre, fornecendo natureza radicalar a tais compostos. Ligados ao anel existem grupamentos metil, os quais conferem estabilidade ao prevenir a dismutação radical-radical e limitar o acesso de substâncias reativas que poderiam quelatar as espécies radicalares. O tamanho, as cargas e a lipofilicidade variam de acordo com os demais grupos substituintes que podem estar presentes no anel (GOLDSTEIN et al., 2003; ISRAELI et al., 2005; SAMUNI ; BARENHOLZ, 2003; SOULE et al., 2007).

Figura 7. Estrutura química dos nitróxidos cíclicos.



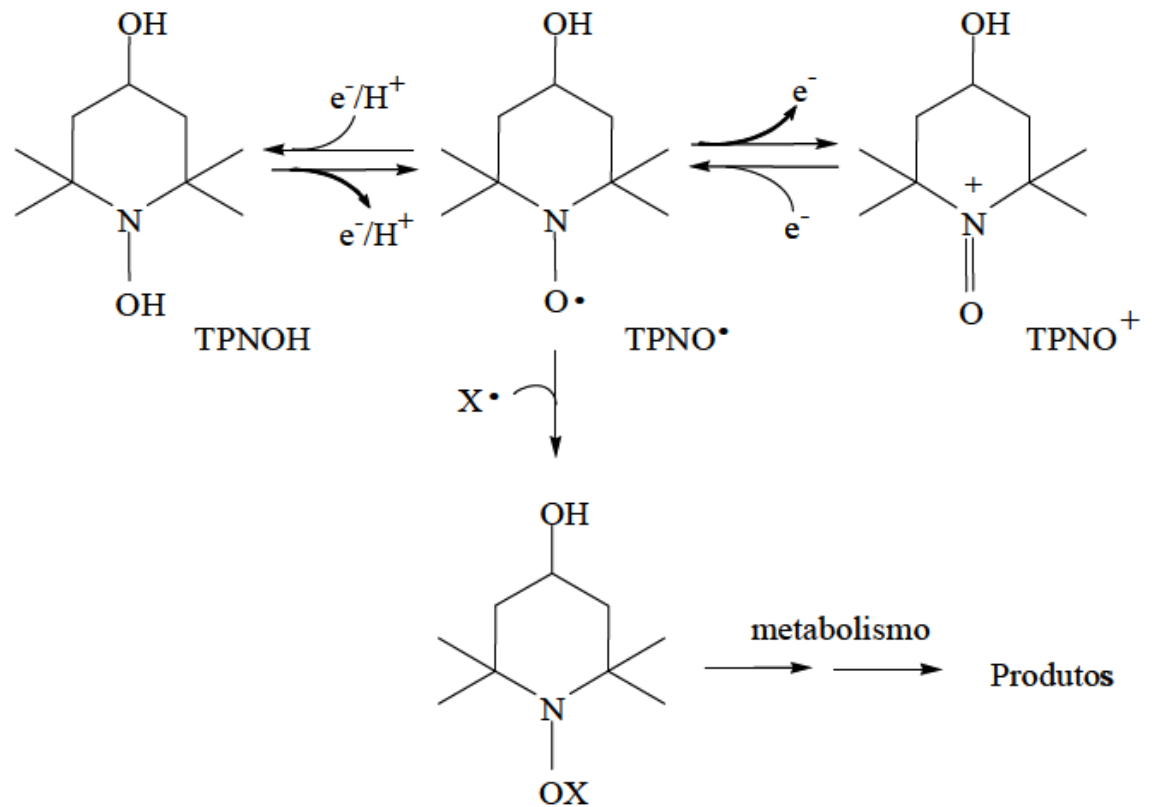
Fonte: HAHN et al (1994); SOULE et al (2007).

Nota: O composto (1) pertence ao grupo dos nitróxidos piperidina, cujo anel possui seis membros. Já (2) integra o grupo de nitróxidos pirrolidina, pirrolina ou oxazolidina, cujo anel é formado por cinco membros. Ressalta-se a existência de diferentes grupos substituintes (R), os quais podem conferir propriedades distintas a esses compostos.

Os diferentes tipos de anéis e substituintes produzem diferentes nitróxidos com propriedades físico-químicas distintas (KROLL; LANGNER; BORCHERT, 1999). Por apresentarem estabilidade química e propriedades paramagnéticas permanentes, os nitróxidos são empregados como sondas em estudos envolvendo Ressonância Paraleleletrônica (EPR) e são usados como agentes de contraste para imagem de ressonância magnética (MRI) (SOULE et al., 2007).

O tempol (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinoxil) e outros radicais nitróxidos estáveis são conhecidos há muito tempo por proteger animais de laboratório de injúrias associadas com uma variedade de condições de estresse oxidativo. Estes anti-oxidantes podem reagir com diversos oxidantes e redutores biológicos e serem reciclados através do cátion oxamônio (TPNO⁺) e derivado hidroxilamina (TPNOH) (Fig. 1). Os efeitos protetores dos nitróxidos têm sido atribuídos a sua atividade dismutásica mimética ao reagir com ânion radical superóxido. Outros mecanismos antioxidantes investigados incluem inibição de reações de formação de radicais mediadas por metais (Fenton), terminação de reações radicalares em cadeia e recebimento de elétrons da cadeia mitocondrial de transporte de elétrons (SOULE et al., 2007).

Figura 8. O processo redox de metabolização de nitróxidos.



Fonte: ISRAELI et al (2005).

Nota: Os nitróxidos passam por uma sequência de reações bioquímicas, formando hidroxilamina ou cátion oxoamônio.

O cátion oxoamônio é altamente oxidante e é responsável pelas atividades pró-oxidantes dos nitróxidos e seus efeitos colaterais (ISRAELI et al. 2005). Por outro lado, a hidroxilamina pode doar um átomo de hidrogênio funcionando como defesa antioxidante (SOULE et al., 2007).

2.4.1 Propriedades antioxidantes e antiinflamatórias dos nitróxidos

Durante os últimos anos, e com base nas propriedades descritas anteriormente, os nitróxidos têm sido amplamente investigados por sua capacidade antioxidante, mostrando-se capazes de defender células, tecidos, órgãos e animais de laboratório de danos induzidos por oxidantes. Assim, diversos estudos os apontam como candidatos eficientes a atuar contra os

danos tissulares causados pelas ações deletérias de células inflamatórias, cuja produção de ERO/ERN fuja ao controle da homeostase orgânica (HAHN; MITCHELL; SHACTER, 1997; ISRAELI et al. 2005; LAIGNIER et al. 2008; SOULE et al. 2007; TIMONER et al. 2008).

Aronovitch e colaboradores (2007) estudaram a natureza dual dos nitróxidos como pró- e antioxidantes, tendo levantado como uma das questões centrais de seu trabalho os possíveis efeitos derivados da capacidade oxidante dos cátions oxoamônio. Esses, na presença de nitróxidos, poderiam desencadear várias reações seletivas de oxidação de álcoois primários, açúcares, e outras biomoléculas, sendo então considerados os responsáveis pelos potenciais efeitos adversos da classe (DRAGUTAN ; MEHLHORN, 2007). Contudo, esses resultados apontaram que tais reações tenderiam a ocorrer em tecidos pobres em agentes redutores.

Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar como os nitróxidos são capazes de atenuar danos oxidativos, o que os difere consideravelmente dos antioxidantes monofuncionais, que desempenham a sua atividade através de uma única maneira de atuação. Ao contrário desses, os nitróxidos apresentam as habilidades que devem estar presentes em antioxidantes realmente efetivos, pois, podem atuar tanto em compartimentos hidrofílicos como lipofílicos; detoxificam uma ampla gama de espécies reativas oxidantes, impedindo o início e a propagação da cadeia oxidativa, além de atuarem de modo que o nitróxido utilizado nessa função possa ser, ao menos parcialmente, reciclado à sua estrutura original. Especificando, os meios pelos quais essa classe atua incluem (i) a dismutação de ânion superóxido, através de uma atividade mimética à da SOD, (ii) aumento da atividade semelhante à da catalase e de outras heme-proteínas, (iii) a detoxificação de espécies reativas formadas por xenobióticos, (iv) a capacidade de interagir com radicais inativando-os e (v) a modulação da sinalização redox da célula (LAIGNIER et al., 2008; KRISHNA et al., 1994; SAMUNI et al., 2002; TIMONER et al., 2008; ZHANG et al., 1999).

Uma das primeiras propriedades de interesse foi a capacidade de mimetizar as enzimas SOD, atividade observada inicialmente nos nitróxidos oxazolidina, e confirmada em outras classes. O mecanismo dessa atividade mimética é compreendido atualmente como fruto da atuação do par redox cátion oxoamônio/nitróxido, o qual forma um ciclo que tende a regenerar o nitróxido. Sendo assim, a forma radicalar é oxidada através da doação de um elétron do ânion superóxido, originando um cátion oxoamônio, o qual sofre redução através da doação de um elétron de outro ânion superóxido, restaurando o nitróxido e originando oxigênio molecular. Ou seja, de maneira similar à da SOD, os nitróxidos atuam como

catalisadores, e não são consumidos durante o processo de dismutação (SAMUNI et al., 2002; SOULE et al., 2007).

Apesar de o mecanismo permanecer obscuro, os nitróxidos são capazes de proteger a células de danos que possam ser induzidos pela presença do peróxido de hidrogênio (SAMUNI et al., 2001). Krishna e colaboradores (1994) demonstraram no ano de 1996 que eles aumentam o comportamento semelhante ao da catalase apresentado por algumas heme-proteínas. Adicionalmente, a interação entre nitróxidos e metais de transição se mostra importante, uma vez que eles são capazes de oxidar os metais que se encontram na forma reduzida, tais como Fe^{2+} e Cu^+ , tornando-os indisponíveis para a reação de Fenton, e evitando a produção de espécies muito oxidantes como o HO^\bullet . Nessa ação, ao contrário da apresentada na detoxificação de ferril derivados de heme-proteínas, eles atuam como oxidantes fracos, sendo convertidos à forma de hidroxilaminas (ARONOVITCH et al., 2007; SOULE et al., 2007).

Os nitróxidos também atuam como “scavengers” de radicais, realizando reações rápidas que produzem espécies não tóxicas e evitando os efeitos deletérios desses no organismo, podendo encerrar reações em cadeia, como a peroxidação lípidica (GLEBSKA et al., 2003). As interações entre nitróxidos e radicais, em muitos casos, ainda necessitam ser elucidadas. Um exemplo está na complexidade das interações entre esses compostos e as espécies derivadas do nitrogênio. O óxido nítrico $\bullet\text{NO}$ e peroxinitrito (ONOO^-) não reagem diretamente com os nitróxidos simples em pH neutro, mas eles podem ser oxidados por $\bullet\text{NO}_2$ formado durante a auto-oxidação do $\bullet\text{NO}$ ou da decomposição do ONOO^- . No entanto, reagem diretamente com nitróxidos nitronil, formando imino nitróxidos e $\bullet\text{NO}_2$ (GOLDSTEIN; SAMUNI; MERENYI, 2003).

A possibilidade de que os nitróxidos atuem diminuindo os danos causados por oxidantes produzidos por células efetoras da imunidade os coloca como possíveis antiinflamatórios. Em um trabalho de 1997, Hahn e colaboradores, propunham que os nitróxidos podiam atuar sobre as condições inflamatórias, exercendo uma ação protetora em células de plasmacitoma, RIMPC 2394, impedindo danos ao DNA causados pelas espécies reativas produzidas por neutrófilos estimulados com forbol.

Fernandes e colaboradores demonstraram em 2005 que a inibição da nitração de proteínas, a qual ocorre por mecanismos radiculares, pode ser responsável pela proteção que o Tempol (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil) fornece a tecidos e células em modelos de inflamação. Logo, uma hipótese que desperta atenção de nosso grupo de pesquisa, é a de

que nitróxidos possam atuar como “scavengers” de radicais tiila (RS^{\bullet}), especialmente glutathionila, impedindo modificações pós-traducionais de diferentes proteínas. O fato, a princípio, reduziria a atividade da quinases, diminuindo a permanência do estado de fosforilação das proteínas responsáveis pela sustentação da atividade do complexo Nox2 de fagócitos, levando a uma redução da produção de oxidantes formadas durante o processo inflamatório.

Quando administrados de forma sistêmica, os nitróxidos, em muitos casos, desencadeiam respostas acompanhadas de alterações da hemodinâmica, as quais envolvem o desenvolvimento de hipotensão e a inibição da agregação plaquetária. Contudo, existem nitróxidos que não causam essas manifestações, sendo ainda benéficas as atividades antioxidantes, antiinflamatórias e radioprotetoras apresentadas por esses (RAIKOV; RAIKOVA; ATANASOV, 2001).

A capacidade antioxidante de nitróxidos já se mostrou eficiente em auxiliar na recuperação e redução de danos causados pela isquemia e reperfusão em corações de ratos. Esses resultados podem ter sido atingidos, não só combatendo os danos causados por radicais formados sob essa circunstância, mas também potencializando os efeitos positivos ocasionados pela administração de L-arginina e posterior produção de $\bullet NO$, o qual pode atuar sem que os efeitos deletérios do $ONOO^-$ e derivados estivessem presentes (HOFFMAN et al., 2003).

Como já foi mencionado, a atividade antiinflamatória dos nitróxidos pode oferecer novas alternativas terapêuticas no tratamento de inúmeras patologias, principalmente aquelas que envolvem a participação de células fagocitárias e a produção de ERO/ERN. Dentre essas, pode-se citar a uveoretinite de origem auto-imune, que quando induzida em ratos de linhagem Lewis e tratada com Tempol, obteve redução de danos causados a nível clínico, bioquímico e histopatológico (ZAMIR et al., 1999). Alguns nitróxidos, como Tempo (2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil), Tempol e Tempamina (4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil), também foram capazes de proteger o cérebro, em modelos experimentais de injúria causada por trauma, sendo esse efeito antiinflamatório atribuído à atividade mimética à da SOD, à inibição da reação de Fenton e à capacidade de atuar neutralizando radicais (ZHANG; GOLDSTEIN; SAMUNI, 1999).

A maioria dos textos encontrados não descreve ou cita nenhuma evidência de que a classe dos nitróxidos possua ação mutagênica, carcinogênica ou teratogênica (SOULE et al., 2007). No entanto, Wang e colaboradores (1996) apontam o fato de que existem informações conflitantes a respeito da mutagenicidade dos nitróxidos, tendo sido observados tanto efeitos

citotóxicos, como mutagênicos em células de *S. typhimurium* sensíveis a danos oxidativos e expostas a doses elevadas. Ao contrário do esperado, os nitróxidos também demonstraram baixa capacidade de proteger células mutantes de *Escherichia coli* deficientes em genes de reparo do DNA, podendo potencializar a citotoxicidade do peróxido de hidrogênio e a ocorrência de danos oxidativos no material genético. Contudo, os resultados sugerem que a atividade observada não resulta da ação dos nitróxidos, mas sim da deficiência das células em questão.

Também é conveniente lembrar que existe a possibilidade de que o metabolismo de nitróxidos ocorra de maneira distinta, dependendo do tipo celular, sendo necessário conhecer as vias que ditam esse processo e como obter proveito dessas descobertas visando, por exemplo, diminuir a metabolização, o que repercutiria na duração e intensidade dos efeitos (NISHIMURA; SWARTZ, 1994).

Em geral, os nitróxidos apresentam grandes perspectivas em relação ao seu uso. No entanto, ainda existe a necessidade de que mais pesquisas sejam realizadas, a fim de que as propriedades mais adequadas de cada composto dessa classe sejam aplicadas de modo conveniente e seguro. Portanto, a compreensão das relações entre estrutura e atividade, metabolismo, modo com que eles efetivamente atuam e demais impactos do uso desses, se torna prioridade a partir do momento em que auxiliam grandemente na compreensão da sinalização redox da célula e despontam como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos.

3 OBJETIVOS

Avaliar o papel do nitróxido Tempol (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil) sobre a atividade do complexo NADPH oxidase de neutrófilos inflamatórios.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar o efeito do Tempol sobre a inibição de proteínas quinases associada à atividade de Nox2.

Verificar a capacidade do nitróxido Tempol em regular a atividade de Nox2 através da inibição da atividade catalítica da PDI.

4 PARTE EXPERIMENTAL

Todos os experimentos foram realizados de acordo com o Comitê de ética em pesquisa animal.

4.1 DECLARAÇÃO DE ÉTICA

Os experimentos foram aprovados pelo Comitê local de Ética em pesquisa (protocolo de aprovação nº 198/2008 – ANEXO A) e está em conformidade com um protocolo baseado na 2010/63/European Union directive.

4.2 OBTENÇÃO DOS NEUTRÓFILOS PROVENIENTES DE FOCO INFLAMATÓRIO

Camundongos machos Swiss (25-28 g, 6-8 semanas de idade) foram obtidos na Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, Brasil. Os animais foram alojados em gaiolas de plástico, com água e comida disponíveis ad libitum. Os neutrófilos foram obtidos e purificados (BRIGAGÃO, COLEPICOLO, 1996). Resumidamente, os animais foram injetados intraperitonealmente com 1,0 mL de caseinato de sódio 12% (p/v) e depois de 4 h, as células peritoneais foram coletadas em solução de tampão salina-fosfato (PBS, pH = 7,4). Após centrifugação (1000 g, 10 min), as células presentes no pelete foram ressuspensas em PBS-glicose (1,35 mg/ml de D-glucose), e o número de células foi determinado por contagem em um hemocítmetro (AO Spencer). A população de células obtida foi de 95% de neutrófilos com uma viabilidade superior a 90% (verificada por coloração May-Grunwald-Giemsa e ensaio de redução do MTT, respectivamente). Todos os experimentos foram realizados à partir de suspensões de células contendo 1×10^6 neutrófilos/ml.

4.3 EFEITOS DO TEMPOL NA EXPLOSÃO OXIDATIVA DE NEUTRÓFILOS

Com o intuito de analisar os efeitos do Tempol sobre o burst respiratório, foram realizados experimentos utilizando neutrófilos de foco inflamatório.

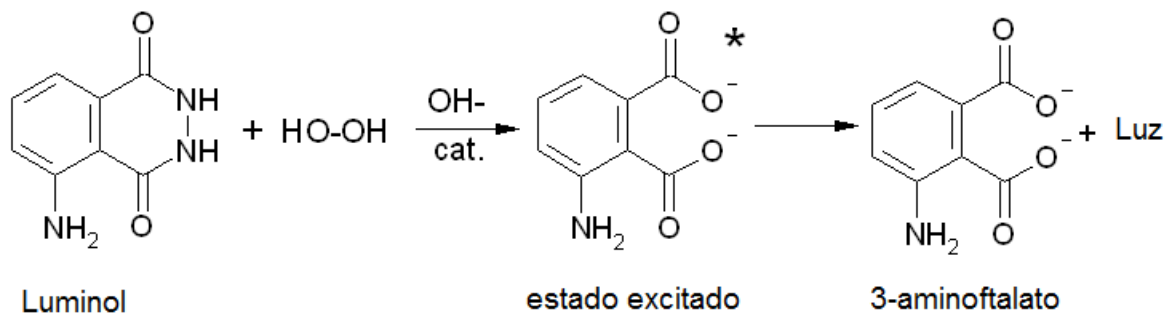
4.3.1 Consumo de oxigênio por neutrófilos inflamatórios

A relação entre o consumo de oxigênio pelos neutrófilos e a estequiometria da formação de $O_2^{\bullet-}$ (METCALF et al., 1986) conduziu a determinação das alterações nas concentrações de oxigênio com a capacidade dos fagócitos para produzir $O_2^{\bullet-}$, discriminando a atividade de Nox2 da atividade mimética de SOD do nitróxido. O consumo celular de oxigênio foi analisado medindo as alterações na tensão de oxigênio dos meios de reação, utilizando um eletrodo do tipo Clark. As células (10^6 neutrófilos/ml) foram incubadas com várias concentrações de Tempol (0-120 μ M, 10 min, 37 °C) na presença ou ausência do inibidor de Nox2 (DPI, 10 μ M), ou com os inibidores de proteínas quinases, a genisteína (100 μ M) ou estaurosporina (100 nM). Em seguida, a ativação de Nox2 foi desencadeada com PMA (100 ng) ou fMLP (1 μ M). Os dados gerados corresponderam à quantidade de oxigênio consumida por minuto por 10^6 neutrófilos, e os resultados foram expressos como a percentagem de inibição promovida por cada composto em relação a aquelas situações em que os fagócitos foram estimulados com fMLP ou PMA. Os estudos dos efeitos concentração-dependente do Tempol foram caracterizados e através deles foi obtida a concentração deste nitróxido que inibe efetivamente 50% do consumo de oxigênio nas células (IC_{50}). Os controles foram realizados para todos os experimentos usando neutrófilos dormentes incubados com veículo (tampão fosfato pH 7,4) sozinho.

4.3.2 Produção de oxidantes por neutrófilos avaliados pelo método de quimiluminescência

Suspensões de neutrófilos foram incubadas com Tempol como anteriormente mencionado, utilizando uma concentração de nitróxido que exerceu a inibição do consumo total de oxigênio (120 μM). Depois da adição de PMA ou fMLP, os oxidantes totais e extracelulares produzidos pelos fagócitos foram determinados utilizando um ensaio de quimioluminescência com luminol (Figura 9) ou isoluminol, como descrito em prévio estudos (COHEN; CHOVANIEC, 1978; LUNDQVIST; DAHLGREN, 1996). Alterações na quimiluminescência foram medidas em uma câmara termicamente controlada de um Luminômetro Promega Lomax 20/20. Os resultados foram comparados com os controles (neutrófilos estimulados com PMA ou com fMLP) e foram expressos como unidades de luz relativa (URL) (LUNDQVIST, DAHLGREN, 1996; DAHLGREN, KARLSSON, BYLUND, 2007).

Figura 9: Representação esquemática da geração de quimioluminescência do luminol na presença de peróxido de hidrogênio



Fonte: Chemistry Review

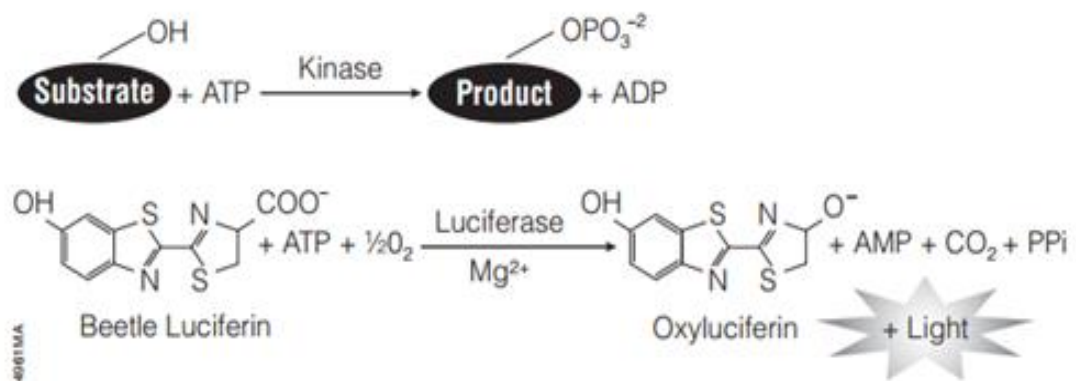
4.4 AÇÃO DO TEMPOL SOBRE QUINASES DE NEUTRÓFILOS

Foi analisada a capacidade do nitróxido Tempol em inibir a atividade das proteínas quinases em neutrófilos.

4.4.1 Avaliação da atividade de quinases medidas pelo consumo de ATP

Medidas da atividade de quinases foram realizadas utilizando-se o kit de ensaio Kinase-Glo® Luminescent Kinase Assay (Promega Corporation), para quantificação do ATP que permanece em solução após ocorrência de reações catalisadas por estas enzimas. A incubação de 10^6 neutrófilos/ml com Tempol ($120 \mu\text{M}$) foi realizada como descrito anteriormente. PMA (100 ng) ou fMLP ($1 \mu\text{M}$) foram utilizados para estimular a ativação do sistema Nox2 dos fagócitos ou foram conservadas no estado de repouso. As células foram lisadas em tampão (Tris 40 mM , pH $7,5$, MgCl_2 20 mM , $0,1 \text{ mg/mL}$ de albumina de soro bovino). O reagente quinase-Glo® foi adicionado a cada amostra, incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente, e, em seguida, a luminescência foi registrada utilizando um Luminômetro GloMax® 20/20. Os resultados representam a média de três experimentos independentes que expressam a relação entre o sinal luminescente e a quantidade de ATP no meio de reação para a atividade quinase.

Figura 10: Oxidação da luciferina em presença de ATP



Fonte: Boletim técnico do kit

4.4.2 Detecção de fosfoproteínas através da técnica de dot blot

Depois da incubação dos neutrófilos com ou sem Tempol ($120 \mu\text{M}$), as células foram lisadas (20 mM Tris, pH $7,4$, contendo $0,3\%$ de SDS, $0,1 \text{ mM}$ de fluoreto de sódio, e 1 mM de PMSF). As amostras foram aquecidas (10 min , 100°C) e transferidas para membranas de PVDF ($10 \mu\text{g}$ de proteína) por aplicação de vácuo. Os locais de ligação não específicos

foram bloqueados com 5% de leite desnatado seco em solução salina tamponada com Tris (120 min). As membranas foram coradas com Ponceau vermelho e posteriormente incubadas com anticorpo primário policlonal anti-fosfoserina/fosfotreonina ou anticorpos anti-fosfotirosina (policlonais de coelho, 1:2000, Abcam), as quais as amostras foram estimuladas com PMA ou fMLP, respectivamente. Após incubação com anticorpos secundários conjugados com peroxidase (HRP) correspondente (1:2.000, Abcam), os blots foram revelados utilizando o método de quimioluminescência (Amersham, Arlington Heights, IL). Os níveis de serina/treonina ou tirosina fosforiladas foram quantificados por densitometria (ImageQuant v5.2; Molecular Dynamics) (OPRANDY et. al., 1988).

4.5 EFEITOS DO TEMPOL SOBRE A ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE NEUTRÓFILOS

O fungo *Candida albicans* (ATCC 10231) foi mantido em Agar Dextrose-Sabouraud (Difco Laboratories, Detroit, Mich.). Após cultivo durante 16 horas em caldo Dextrose-Sabouraud (30 °C com agitação orbital, a 1,000 x g), a atividade antifúngica foi quantificada por determinação da perda de viabilidade de *C. albicans* co-cultivadas com neutrófilos isolados, com uma proporção final de fungos: neutrófilos de 10:1. Os neutrófilos foram incubados com Tempol (120 µM /10⁶ neutrófilos) ou veículo (tampão fosfato pH 7,4). Após a incubação os neutrófilos foram estimulados com fMLP ou PMA, seguido por adição de amostras de fungos. Após incubação de 10 min a 37°C, as alíquotas foram recolhidas e diluiu-se em água pH 11, a uma concentração final do fungo 50-100 UFCs por placa. Em seguida, as amostras foram vigorosamente agitadas em um vortex para dispersar os microrganismos e espalhada sobre o ágar Sabouraud e novamente submetidas a incubação (0, 10, 20, 40 e 60 min). As contagens do número de unidades formadoras de colônias (UFCs) de *C. albicans* foram realizadas (GREEN et al., 2007).

4.6 EFEITOS DO TEMPOL SOBRE A ATIVIDADE REDUTASE DE PDI

Foram realizados ensaios utilizando PDI recombinante e de neutrófilos para analisar a capacidade do Tempol atuar sobre essa proteína.

4.6.1 Análise da atividade redutase da PDI pelo método da insulina

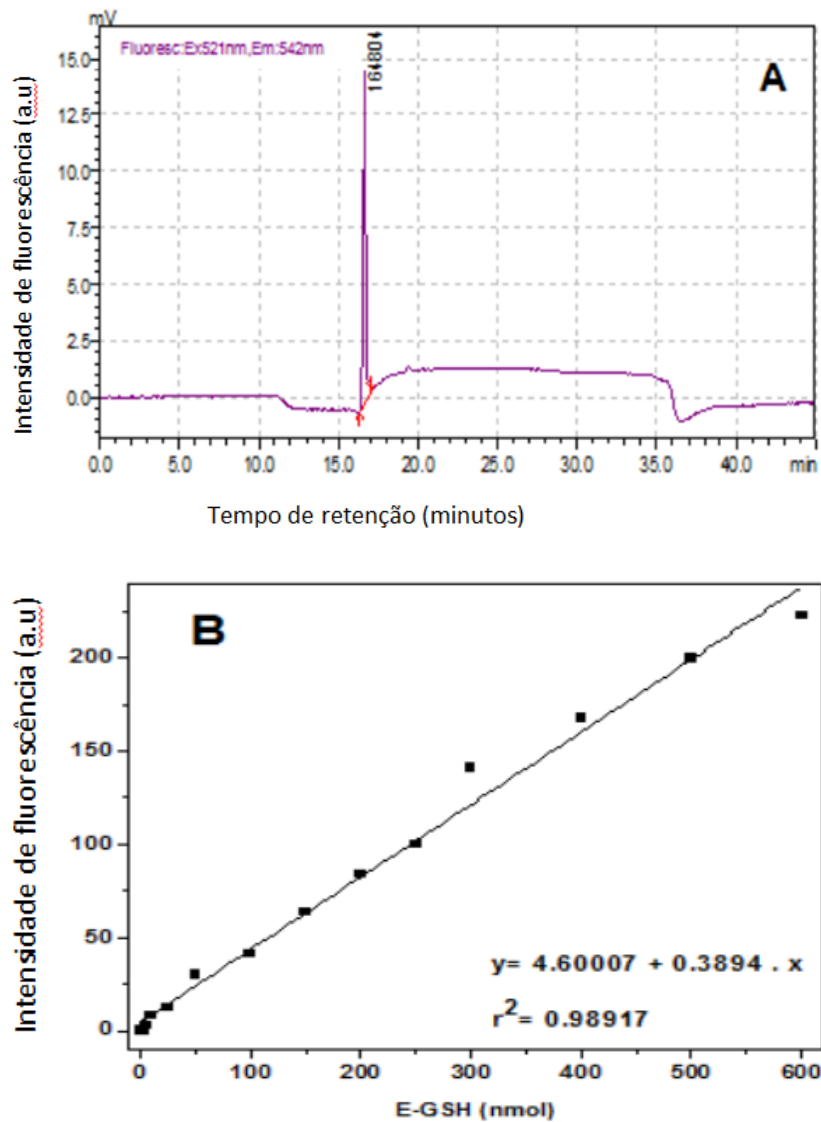
A atividade redutase da PDI foi avaliada espectrofotometricamente através da utilização do método da insulina, na ausência ou na presença de diferentes concentrações de Tempol. PDI recombinante humana (1 μM) foi incubada com Tempol (0-50 μM) em meio tamponado com PBS (pH 7,2, 100 mM) com EDTA (2 mM). A reação de precipitação foi iniciada por adição de DTT (1 μM) e 1 mg/ml de insulina, e a reação foi acompanhada por alterações na absorbância a 600 nm, utilizando um leitor de microplacas acoplado com um espectrofotômetro de placa (Varioskan). A atividade redutase da PDI foi obtida a partir das inclinações (slopes) iniciais da plotagem primária.

4.6.2 Preparação de uma sonda fluorescente para medir a atividade redutase PDI

Glutathiona oxidada (GSSG) foi incubada com um excesso (10 vezes) de eosina-5-isotiocianato em tampão de fosfato de potássio (100 mM, EDTA 2 mM, pH 8,8) durante 8 h à temperatura ambiente. O dímero resultante não fluorescente, a dieosina glutathiona (Di-EGSSG) foi cromatograficamente purificado (coluna Sephadex G-25, 100 mm x 10 milímetros, com tampão fosfato de potássio para eluição a 0,1 M, EDTA 2 mM, pH = 7, taxa de fluxo de 1 ml·min⁻¹) e utilizado como um pseudosubstrato para a atividade redutase da PDI (Figura 11). As alíquotas (5 a 10), que foram eluídas com altos valores de absorbância a 521 nm, foram reunidas e quantificadas ($\epsilon = 88,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Para monitorar a clivagem enzimática de Di-E-GSSG, um gráfico padrão foi gerado com PDI bovina comercial obtida de fígado. Este lote foi usado para quantificar qualquer redução de Di-EGSSG a E-GSH, o que foi visível através da liberação de radicais eosina devido a uma redução das ligações de dissulfeto. E-GSH foi detectado utilizando um espectrofotômetro de fluorescência Varian Cary Eclipse ($\lambda_{\text{exc}} = 521 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emi}} = 542 \text{ nm}$) após incubações (37°C, 10 minutos) de várias concentrações de Di-E-GSSG (5-300 nM), com PDI (20 nM) em tampão D-PBS-G com DTT (5 μM , 10 minutos, 37 ° C). Os resultados foram expressos em nM de E-GSH produzido por minuto. A eficiência da produção de E-GSH para este método foi avaliada a partir de alíquotas da reação enzimática utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Tal como descrito por Anderson et al. (1999) (com modificações), compostos tiólicos foram

identificados e quantificados. A coluna (C-18 Shimpack VP-ODS, 4,6 mm x 25 cm, ligados em série com C18 modelo pré-coluna Shim-pack GVP-ODS, 4,6 mm x 10 mm) foi pré-equilibrada com 100% de tampão (tampão de acetato a 87% e 14% de metanol) a uma taxa de fluxo de 1 ml·min⁻¹. A eluição foi realizada com tampão A e tampão B (tampão de acetato a 10% e 90% de metanol). Após a injeção da amostra (alíquotas de 20 µl filtrada com membranas Millipore® de 0,45 µm), a eluição foi realizada no modo de gradiente (75% tampão A e 25% tampão B durante 10 minutos; 25% tampão A e 75% tampão B durante 20 minutos). A identificação de E-GSH foi realizada comparando os tempos de retenção deste composto com o tempo de retenção dos padrões autênticos de GSH marcados com eosina-5-isotiocianato, com a utilização de um detector de fluorescência (modelo RF-10A, $\lambda_{exc} = 521$ nm e $\lambda_{emi} = 542$ nm).

Figura 11. Determinação da atividade da PDI por HPLC.



Fonte: Da Autora.

Nota: (A) A atividade da PDI foi determinada por HPLC após a clivagem do composto não fluorescente Di-E-GSSG pela PDI. A atividade da PDI levou à formação do produto fluorescente, a E-GSH ($\lambda_{exc} = 521\text{nm}$, $\lambda_{emi} = 542\text{nm}$). A reação da di-E-GSSG com a PDI exibiu um único pico fluorescente (tempo de retenção = 16,48 minutos), identificado como E-GSH. (B) A curva de calibração para a quantificação do composto E-GSH foi realizada para monitorar a intensidade de fluorescência de E-GSH resultantes da clivagem de Di-E-GSSG (5-300 nM) com PDI (20 nM) em tampão D-PBS-G com a DTT (5 μM). Estas curvas foram posteriormente usadas para quantificar a atividade da PDI em neutrófilos.

4.6.2.1 Ação do Tempol sobre a atividade redutase da PDI em neutrófilos

Em neutrófilos, a atividade redutase da PDI foi detectada utilizando um ensaio semelhante ao anteriormente descrito para a PDI isolada (MARGARITIS et al., 2011). As suspensões celulares (10^6 neutrófilos/ml) em tampão PBS, com 5 μ M de DTT (para manter a PDI no estado reduzido), foram mantidas no estado de repouso ou estimuladas com PMA após uma pré-incubação (10 minutos, 37° C) com Tempol (5-120 μ M) ou bacitracina (2 mM). Os ensaios de atividade de redutase da PDI foi realizada imediatamente após a adição de Di-E-GSSG (150 nM) nas suspensões de fagócitos. A variação na intensidade de fluorescência foi quantificada utilizando um espectrofluorímetro ($\lambda_{exc} = 521$ nm, $\lambda_{emi} = 542$ nm). Para verificar se o Tempol mantinha a sua capacidade de inibição da atividade redutase da PDI após a reação com tióis, nós inativamos o Tempol incubando o nitróxido com glutathione (GSH) em conformidade com o sistema anteriormente descrito por Borisenko et al. (2004), com algumas modificações. Resumidamente, a reação química consistiu em GSH (0, 7,5 ou 10 μ M) acrescido de fenol (2,5 μ M), peroxidase (HRP 0,2 U / mL), Tempol (10 μ M) e H₂O₂ (10 μ M), levando à geração de radicais glutathionil catalisada por peroxidase através da reciclagem de radicais fenoxil. A modificação química da porção nitróxido foi monitorizada por desaparecimento do sinal EPR característica de Tempol. As medições de sinal EPR foram realizadas num espectrômetro Bruker EMX com uma cavidade padrão, operando numa frequência de banda-X, e utilizando uma célula de quartzo que foi cheia com 80 μ L de amostra da reação. O espectro característico de Tempol foi visto sob as seguintes condições: campo 335.7 mT, banda de passagem 8 mT, modulação e campo 0.32 mT, emissão de microondas 10 mW, tempo constante de detecção 0.1 s, tempo de varredura de 1 minuto. Tempol obtido após a reação sob estas condições experimentais foi utilizado na análise da atividade redutase de PDI, bem como os estudos em neutrófilos.

4.7 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA DA PDI MODIFICADA POR TEMPOL

PDI recombinante humana reduzida foi obtida através da incubação da enzima com DTT em uma proporção de 10:1 durante 30 minutos à temperatura ambiente. O conteúdo de

tióis reduzidos da proteína foi medido pelo ensaio de Ellman's ($\epsilon_{412} = 14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Ellman, 1959). Em seguida, PDI (1 μM) foi incubada na ausência ou na presença do Tempol (6 μM) durante 1 h à temperatura ambiente. A proteína foi analisada num espectrômetro de massa triplo quadrupolo (QTrap 4500, ABSciex, Framingham, MA). A separação das proteínas foi realizada em uma coluna C4 (5 μm , 150 x 1mm de Grace Vydac, Hesperia, CA), com eluição em solvente A (ácido fórmico 0,1%) e Solvente B (0,1% de ácido fórmico em acetonitrilo) com uma taxa de fluxo de 0,1 ml/min, utilizando o seguinte gradiente de solvente: 0-2 minutos, 5% de solvente B; 2-10 minutos, 5 a 50% de solvente B; 10-20 minutos, 50% de solvente B; 20-21 minutos, 50-5% de solvente B. A tensão de eletropulverização foi de 5 kV e a temperatura capilar foi de 300 °C. O modo de íons positivo foi utilizado para realizar análise de massa da proteína; os dados foram adquiridos e analisados utilizando o software 1.6.1 Analyst (ABSciex, Framingham, MA). Os resultados foram processados usando o software Peak View (ABSciex, Framingham, MA) para obtenção do peso molecular da proteína.

Para determinar o local de ligação covalente, tripsinização da enzima, seguida por espectrometria de massa em tandem com hifenização a cromatografia líquida (LC/MS-MS) foi realizada. PDI reduzida tratada ou não com Tempol foi digerida durante a noite em 50 mM de tampão de pirofosfato, pH 7,4, com tripsina utilizando uma proporção de enzima e substrato de 1:50 (p/p). Os peptídeos foram separados numa coluna de fase inversa (5 m, 2,1 x 150 mm, 300 Å, de Grace Vydac, Hesperia, CA) e eluiu-se com o solvente A (0,1% de ácido fórmico) e solvente B (ácido fórmico a 0,08% em acetonitrilo). Os peptídeos foram eluídos a 40 °C a uma taxa de fluxo de 0,25 mL/min com um gradiente linear de solvente B (2-60% em 105 minutos). A tensão de eletropulverização foi de 5 kV, e a temperatura de 8 capilares foi de 260 °C. As análises dos peptídeos por MS e MS/MS usando o QTRAP4500 foram realizadas no modo de íons positivos utilizando um intervalo de massas de 100-2000. A análise dos peptídeos e as séries y- e b- foram obtidas usando o software Pico View, e a proteína foi identificada por comparação dos peptídeos obtidos com os dados de MASCOT (Matrix Ciência, UK).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram expressos como os valores médios \pm desvio padrão (D.P.). As comparações entre os diferentes grupos foram realizadas utilizando a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram aceitos como estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

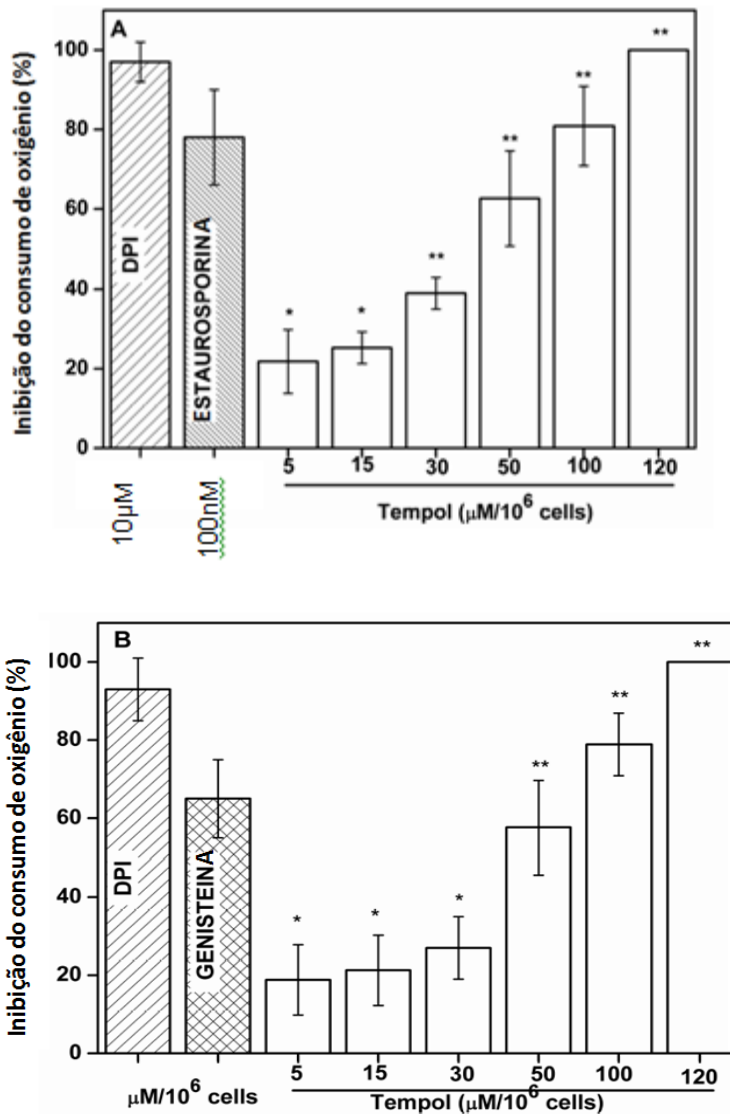
Nesta seção serão descritos os resultados obtidos pela realização dos testes dispostos na metodologia.

5.1 EFEITO DO TEMPOL SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO POR NEUTRÓFILOS ATIVADOS

Foi analisado o efeito do Tempol sobre o consumo de oxigênio em neutrófilos ativados pelo sistema Nox2 (Figuras 12A e 12B). O PMA desencadeou forte atividade deste sistema e causou substancial consumo de oxigênio (6.5 ± 0.6 nmol/min). Quando a estimulação de neutrófilos foi feita por adição do peptídeo quimiotático fMLP, a quantidade máxima de consumo de oxigênio foi equivalente a $4,3 \pm 0,2$ nmol/min. O prévio tratamento dos neutrófilos com Tempol causou uma inibição do consumo de oxigênio em neutrófilos de um modo dependente da concentração, quando as células foram estimuladas quer com PMA (Figura 12A) ou fMLP (Figura 12B), com um IC_{50} próximo de $45 \mu M$, em ambos os casos. Quando as células foram pré-incubadas com $120 \mu M$ de Tempol, a inibição total do consumo de oxigênio foi observada, tendo sido os neutrófilos estimulados com PMA ou fMLP (Figuras 12A e 12B, respectivamente). A participação de Nox2 no burst oxidativo induzido por PMA (Figura 2A) ou fMLP (Figura 2B) foi demonstrada pela inibição do consumo de oxigênio exercida pelo inibidor deste sistema, o DPI. Estaurosporina (inibidor da proteína quinase C), a 100 nM, mostrou uma inibição da atividade de Nox2 semelhante àquela apresentada pelo

Tempol na concentração de 100 μM (Figura 12A). Por outro lado, 100 μM de genisteína (proteína inibidora da tirosina quinase) inibiu a atividade de Nox2 tão eficaz como o IC_{50} do Tempol (Figura 12B).

Figura 12. Efeito do Tempol e de conhecidos inibidores das proteínas quinases sobre a atividade do sistema Nox2 de neutrófilos.



Fonte: Da Autora.

Nota: As células ($10^6/\text{ml}$) foram incubadas com diferentes concentrações de Tempol, Estaursporina (100 nM), ou Genisteína (100 μM) durante 10 minutos (37 °C) e, após a estimulação do sistema Nox2 com PMA (100 ng) ou fMLP (1 μM), o consumo de oxigênio foi monitorizado polarograficamente, como é apresentado em A (PMA) e B (fMLP). A análise de regressão linear entre as concentrações de Tempol e a inibição do consumo de oxigênio mostrou um IC_{50} próximo de 45 $\mu\text{M}/10^6$ neutrófilos. Os resultados são apresentados como a média \pm D.P. de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicada. * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$.

Vários estudos mostram o Tempol como um composto mimético de SOD e que consequentemente, participa ativamente na detoxificação de oxidantes (SOULE et al., 2007), nós hipotetizamos que este composto poderia modular a sinalização celular em neutrófilos e também, por conseguinte, alterar mais drasticamente a atividade do sistema Nox 2. Os nossos resultados mostraram que Tempol é capaz de suprimir o consumo de oxigênio em neutrófilos ativados por PMA ou fMLP de uma forma dependente da concentração (Figura 12).

Divergentemente, Queiroz et al. (2012) relataram que Tempol não alterou o consumo de oxigênio em neutrófilos. Estas diferenças nos resultados podem ser atribuídas ao fato de que os autores mencionados utilizaram neutrófilos humanos dormentes, enquanto que neste estudo nós utilizamos neutrófilos previamente sensibilizados de camundongos, e, além disso, devido as diferentes concentrações de Tempol (1,5 μ M) utilizadas nestes estudos.

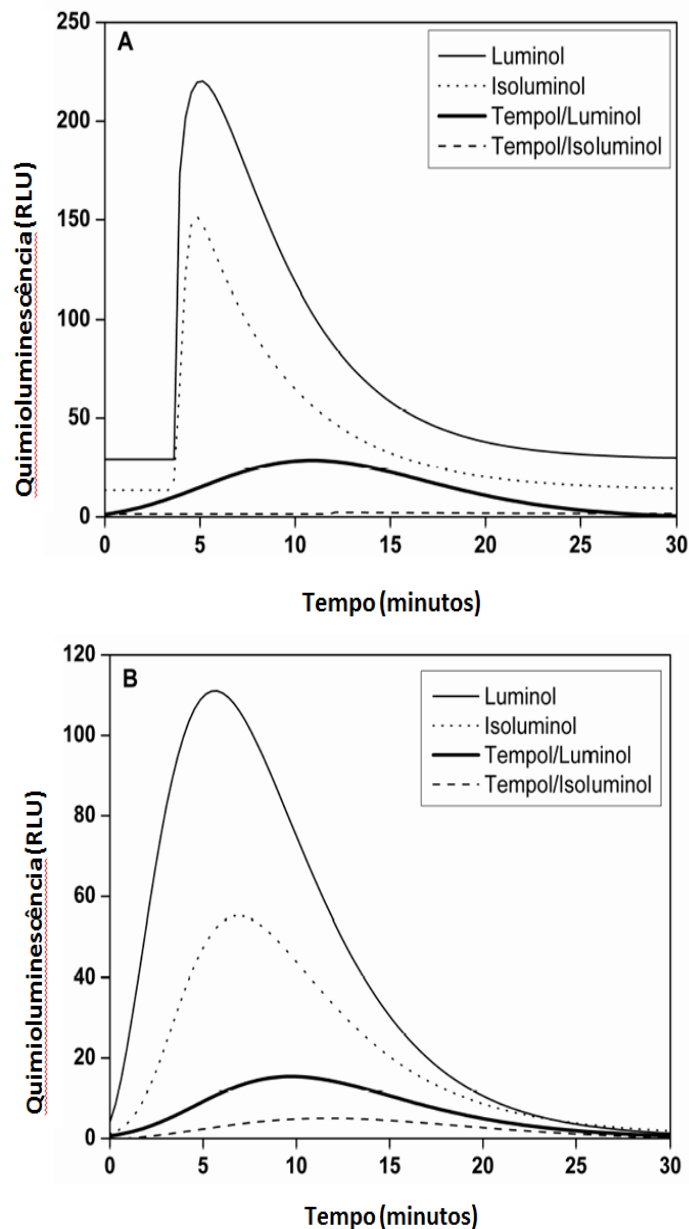
O sistema Nox2 existe em diferentes estados (em repouso, “prontamente preparado” [do inglês primed], ativado ou inativado), em que o estado “prontamente preparado” pode ser induzido, *in vivo*, principalmente por citocinas pró-inflamatórias. Sobre o estado “prontamente preparado”, os neutrófilos são sensibilizados para responder mais rapidamente e mais intensamente a um segundo estímulo (EL-BENNA, DANG, 2008). Portanto, o chamado priming de neutrófilos altera o seu fenótipo para uma forma que não necessariamente determina a posterior ativação do sistema Nox2, mas torna os fagócitos mais propensos para uma resposta mais forte contra um específico agente indutor.

5.2. PRODUÇÃO DE OXIDANTES PELOS NEUTRÓFILOS

Para investigar o efeito do nitróxido na produção de oxidantes totais e extracelulares produzidas por fagócitos foram realizados ensaios utilizando o sistema luminol/isoluminol. Tempol, a uma concentração que inibiu completamente o consumo de oxigênio (120 μ M), exerceu uma diminuição de 90% na produção de EROs totais, em neutrófilos estimulados por PMA, em comparação com o grupo não tratado. Além disso, a formação extra-celular de EROs foi quase totalmente inibida pelo Tempol sob condições experimentais semelhantes (Figura 13A). Em comparação com PMA, fMLP elicitou uma resposta menos exacerbada durante o burst oxidativo dos neutrófilos. Ainda, Tempol exerceu os mesmos efeitos inibidores na produção de oxidantes em neutrófilos (Figura 13 B). Importante notar que, para os neutrófilos tratados com Tempol, foi observado um maior período lag para o início do

burst oxidativo em resposta a PMA ou fMLP. O pré-tratamento dos neutrófilos com este nitróxido levou os fagócitos a mostrarem um atraso na resposta que representa quase o dobro do tempo quando comparado com células não tratadas (Figura 13 A e B).

Figura 13. Produção de oxidantes totais e extracelulares por neutrófilos provenientes de focos inflamatórios tratados com Tempol.



Fonte: Da Autora.

Nota: A quimioluminescência amplificada por luminol ou isoluminol foi medida durante 30 minutos depois da estimulação dos fagócitos com PMA (A) ou fMLP (B) na ausência ou presença de Tempol ($120 \mu\text{M}/10^6$ células). Curvas cinéticas são representativas de 4 experimentos independentes.

Luminol bem como o isoluminol podem ser utilizados para monitorizar a atividade do sistema Nox2 dos neutrófilos, sendo excitado por EROs, assim emitindo luz quando voltam para o estado não excitado (DAHLGREN, KARLSSON, BYLUND, 2007). Estes compostos foram usados para determinar a capacidade do Tempol exercer uma ação inibidora sobre o burst oxidativo (Figura 13, A e B).

Muitos compostos químicos e peptídeos são conhecidos por inibir a produção de EROs pelo sistema Nox2 (SANTOS et al., 2016). Estes compostos, incluindo o nitróxido Tempol, não são inibidores químicos específicos para o complexo NADPH oxidase dos fagócitos, o sistema Nox2. No entanto, ao contrário dos outros compostos, Tempol tem poucos efeitos indesejáveis porque é metabolizado para o cátion oxoamônio ou hidroxilamina, dependendo do estado redox e taxa metabólica das células (WILCOX, PEARLMAN, 2008). É bem conhecido que a elicitação do burst oxidativo leva primeiramente a produção intracelular de $O_2^{\bullet-}$ e posteriormente de outros oxidantes (EROs/ERNs) e, que eles, podem atuar como segundos mensageiros para sinalizar vias bioquímicas específicas implicadas na manutenção e desencadeamento da atividade do próprio sistema Nox2 (DAHLGREN, KARLSSON, 1999). Tempol é um eficiente antioxidante que permeia membranas biológicas tendo a capacidade de sequestrar radicais $O_2^{\bullet-}$, radicais peroxil e tióis, entre muitos outros EROs/ERNs (WILCOX, PEARLMAN, 2008). Este nitróxido pode exercer uma efetiva ação antioxidante e, assim, desacelerar cascatas de sinalização essenciais para a atividade do sistema Nox2.

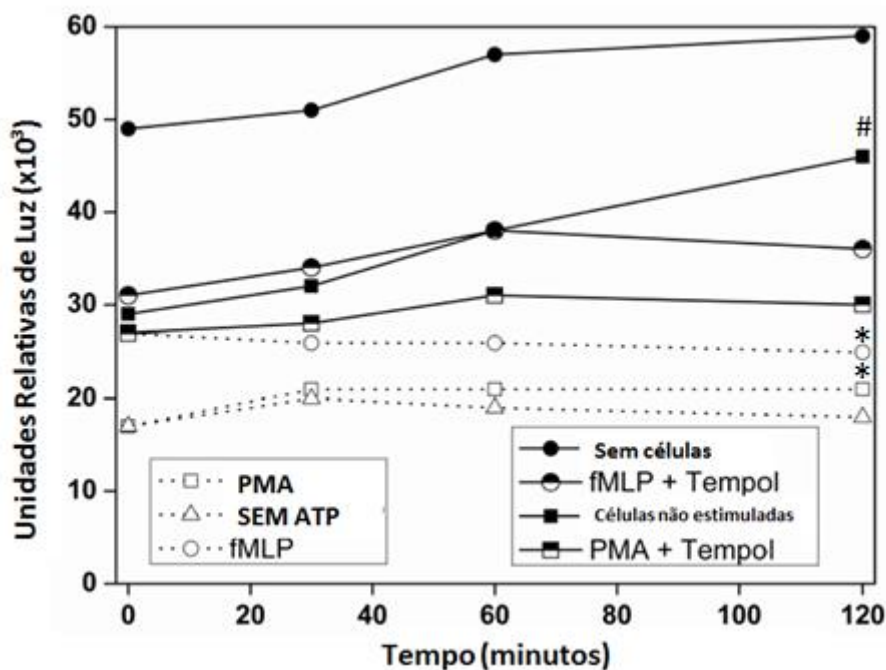
Neste estudo, nós detectamos que Tempol, além de gerar uma diminuição na resposta de neutrófilos preparadas a partir de focos inflamatórios via atuação sobre o sistema Nox2, este nitróxido também foi capaz de provocar um atraso no tempo de latência da resposta para ambos os estímulos de Nox2 dos neutrófilos, o PMA e fMLP (Figura 13A e B).

5.3. EFEITO DO TEMPOL SOBRE A ATIVIDADE DAS PROTEÍNAS QUINASES DOS NEUTRÓFILOS ATIVADOS

Examinamos se a ação do Tempol sobre a atividade de Nox2 de neutrófilos estava associada com a atividade das quinases destas células. Tempol (120 μ M) diminuiu a atividade de quinases em neutrófilos estimulados por PMA ou fMLP (Figura 14). As condições experimentais foram definidas para usar o remanescente de ATP como um substrato pela

ultra-Glo Luciferase™, para catalisar a mono-oxigenação de luciferina. A reação de luciferase produz um foton de luz por rotação; assim, a luminescência está inversamente relacionada à atividade de quinase. A redução da atividade das quinases em neutrófilos tratados com Tempol e estimulados com PMA foi próximo à 40%, enquanto que os fagócitos estimulados por fMLP mostraram uma diminuição de aproximadamente 35% (Figura 14). É interessante notar que, de forma consistente com nossos resultados prévios para a atividade de Nox2 (Figura 12) PMA induziu uma resposta mais exacerbada que fMLP, até mesmo para a atividade das quinases (Figura 14).

Figura 14: Detecção da atividade de quinases dos neutrófilos após tratamento com Tempol



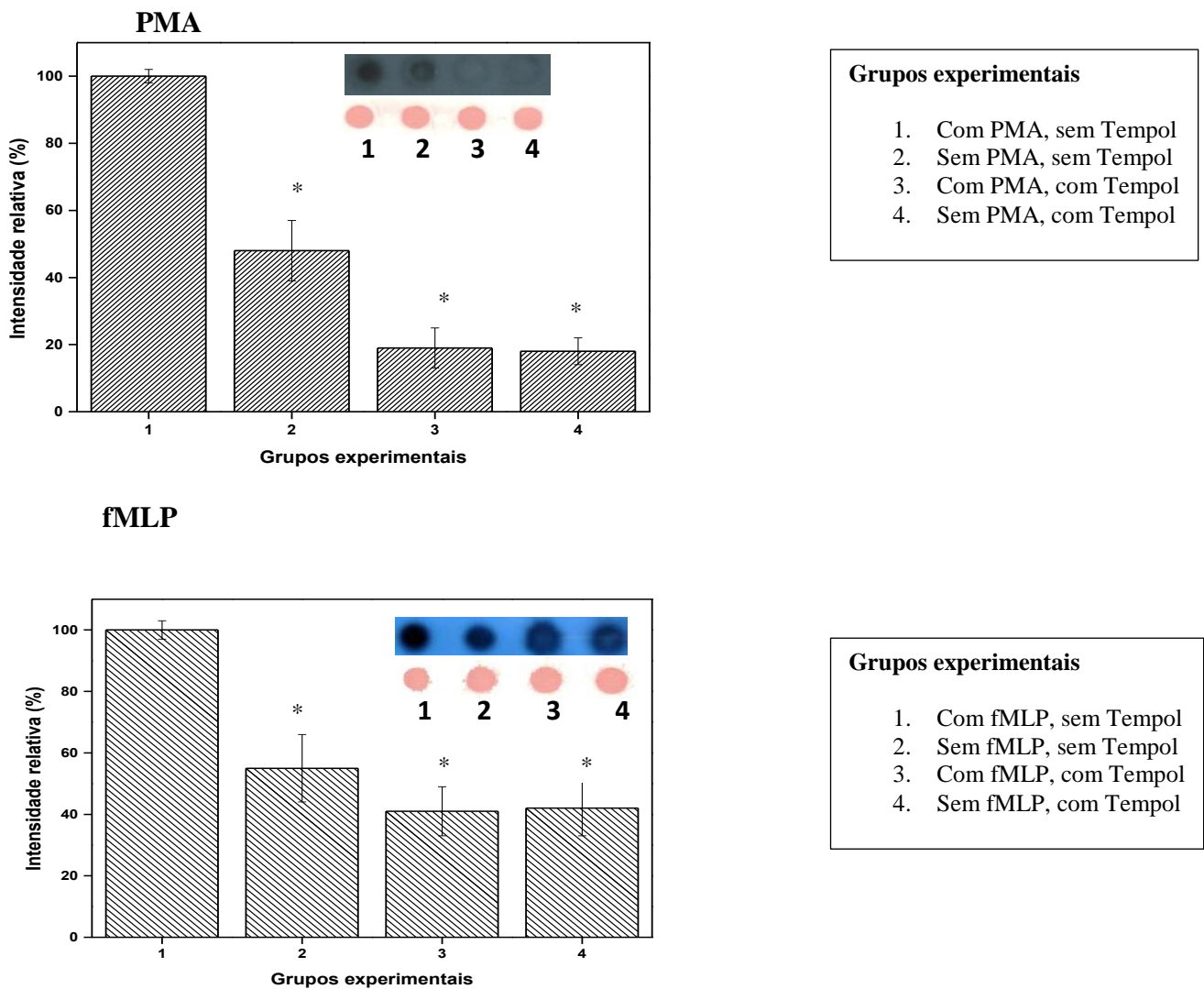
Fonte: Da Autora

Nota: A atividade de proteínas quinases foi determinada por sistema quimioluminescente, no qual as Unidades Relativas de Luz são diretamente proporcionais à concentração de ATP presente no meio. * $p < 0,01$ comparado ao respectivo grupo tratado com Tempol ($120 \mu\text{M}/10^6$ células). Os resultados expressam a cinética representativa de três experimentos independentes. # $p < 0,001$ comparado aos grupos estimulados com PMA ou com fMLP, previamente tratados ou não com Tempol.

Os resultados do presente estudo mostraram que Tempol é capaz de diminuir a fosforilação de proteínas em neutrófilos ativados (Figura 14), dados estes que suportam uma prevenção da ativação de Nox2, como observado por uma diminuição do consumo de oxigênio e da formação de oxidantes.

Foi demonstrado por análise de *dot blotting* que a estimulação das células com o PMA induziu maior fosforilação da proteína quando comparado com a estimulação causada por fMLP. Notavelmente, em neutrófilos ativados, Tempol foi capaz de diminuir a fosforilação de proteínas, independentemente do estímulo utilizado para a ativação do sistema Nox2 (PMA ou fMLP) (Figura 15).

Figura 15. Efeito do Tempol sobre a fosforilação de aminoácidos serina/treonina e análise do conteúdo de fosfotirosina detectados nos neutrófilos provenientes de focos inflamatórios.



Fonte: Da Autora.

Nota: Dados de *dot blotting* são apresentados em termos de densidade relativa como médias \pm D.P de três experimentos independentes. A intensidade do sinal detectado a partir da estimulação com PMA ou fMLP foi considerada como 100%, para comparação com as amostras correspondentes. Inserido: Filme revelado por sistema luminescente com anticorpos anti-fosfoserina/treonina (A) ou com anticorpos anti-fosfotirosina (B) e as respectivas amostras coradas com vermelho de Ponceau. * $p < 0,001$ comparado ao respectivo grupo estimulado sem tratamento com Tempol.

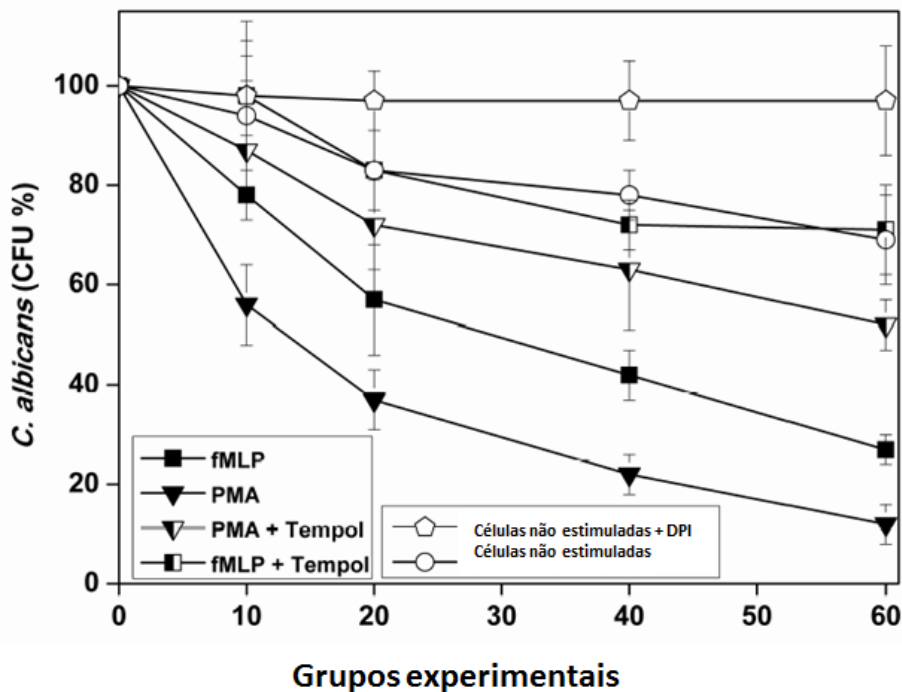
Após tratamento das células fagocíticas com Tempol, houve uma diminuição significativa na atividade das quinases, tal como detectado por quimioluminescência (Figura 14) e por análises usando dot blotting (Figura 15). Um considerável número de quinases têm sido propostas por ativar o sistema Nox2 (EL-BENNA et al., 2008). Estudos relatam que Tempol impediu a ativação de PKC (COPPEY et al., 2003) e preveniu a fosforilação de proteínas alvo nos túbulos proximais de ratos (BANDAY et al., 2007) e em células pulmonares previamente estimuladas com um modulador redox, a quinolona “paraquat” (KUO et al., 1995). No entanto, a conclusão de que Tempol afeta o aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular, e a constrição dos pericitos depois da estimulação de PKC pelo agonista forbol 12,13-dibutirato demonstram que o Tempol pode atuar em vias de sinalização dependentes de PKC (ZHANG et al., 2004). Além disso, Tempol melhora a encefalomielite viral murina por diminuir a inflamação (TSUHAKO et al., 2010). Adicionalmente, Tempol e alguns dos seus análogos atenuam a inflamação induzida por carragenina, principalmente pela diminuição da migração de neutrófilos e o dano resultante mediado por mieloperoxidase (QUEIROZ et al., 2012), bem como a prevenção da secreção de citocinas inflamatórias (KIM et al., 2015), como testado em diferentes modelos animais.

5.4. EFEITO DO TEMPOL NO KILLING DE *C. Albicans* POR NEUTRÓFILOS ATIVADOS

Tempol (120 μ M) não apresentou atividade inibitória in vitro frente *C. albicans*, bem como DPI (10 μ M), em todas as condições experimentais utilizadas neste estudo (resultados não mostrados). A Figura 16 mostra o número de UFCs de *C. albicans* nas diferentes condições experimentais. Depois da estimulação de neutrófilos com PMA ou fMLP, o número de UFCs de *C. albicans* diminuiu significativamente. Após 60 minutos, os fagócitos estimulados com PMA mostraram uma capacidade de matar *C. albicans* de 88%, o que corresponde a cerca de três vezes a capacidade de neutrófilos não estimulados. Os neutrófilos estimulados por fMLP mostraram uma capacidade fungicida menor que aqueles estimulados com PMA, cerca de 73% maior que fagócitos dormentes. A pré-incubação dos neutrófilos com Tempol (120 μ M) exerceu uma inibição da capacidade fungicida dos fagócitos, independente do estímulo para ativar o sistema Nox2. O pré-tratamento dos

neutrófilos com Tempol promoveu uma diminuição de aproximadamente 35% da capacidade fungicida quando comparado com os neutrófilos estimulados com PMA ou fMLP. Curiosamente, tal como mostrado na Figura 16, quando os neutrófilos foram estimulados por fMLP e pré-tratados com Tempol, a atividade fungicida foi praticamente idêntica à apresentada pelos fagócitos não estimuladas (30%). Por outro lado, mesmo nesta situação, os neutrófilos estimulados com PMA permaneceram com capacidade fungicida significativa (50%).

Figura 16. Papel do Tempol na capacidade fungicida dos neutrófilos provenientes de focos inflamatórios.



Fonte: Da Autora.

Nota: *C. albicans* foram cultivadas com neutrófilos (1×10^6 células/ml) a uma razão de fungos: neutrófilos de 10:1, após os fagócitos serem simplesmente mantidos no estado de repouso ou previamente tratados com o DPI (10 μ M). Paralelamente, neutrófilos foram estimulados com PMA (100 ng) ou fMLP (1 μ M) para desencadear a atividade do sistema Nox2 e, para examinar se Tempol está envolvido na atividade de *Killing*, os fagócitos foram incubados com Tempol (120 μ M/ 10^6 células, 10 min, 37 °C). Os resultados são expressos como médias das unidades formadoras de colônias (UFCs) \pm D.P. de culturas em triplicata.

Relatos mostram que Tempol é capaz de prevenir a formação e despreendimento para o espaço extracelular de armadilhas extracelulares de neutrófilos (do inglês NETs, neutrophils extracellular traps), uma estrutura formada por cromatina descondensada associada a várias proteínas, algumas das quais com potente ação microbicida, e que tem sido

demonstrada que a indução e despreendimento destas complexas estruturas são na maioria dos casos mediadas por EROs (HOSSEINZADEH et al., 2012; VOROBEVA, PINEGIN, 2016).

Neutrófilos usam os mecanismos do burst oxidativo para a produção de oxidantes e para o Killing de uma vasta gama de microrganismos. A deficiência do complexo NADPH oxidase resulta em severas doenças, tais como a doença granulomatosa crônica (DGC), que está associada com um extraordinário aumento da susceptibilidade do hospedeiro à infecção invasiva por fungos, destacando a importância deste complexo no controle da doença infecciosa por *C. albicans*. Outra característica específica de neutrófilos é a sua capacidade de liberar grânulos que medeiam morte extracelular. Esses grânulos contêm ao lado do complexo NADPH oxidase, mieloperoxidase e outras proteínas com propriedades antimicrobianas, como lisozimas, lactoferinas, elastases, defensinas, gelatinases, ou catepsina G (ABBAS, LICHTMAN, 2005).

Fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), fosfolipase C (PLC), a GTPase Rho e proteína quinase C (PKCs) são enzimas importantes para a regulação da atividade fagocítica (UNDERHILL, OZINSKY, 2002). Nós demonstramos que a pré-incubação de neutrófilos com Tempol levou a uma diminuição na liberação de oxidantes em neutrófilos ativados, tanto quando elicitados com PMA ou fMLP, sugerindo que uma mudança na produção de oxidantes, por si só, está correlacionada com a atividade microbicida.

O killing de *Staphylococcus aureus* e *C. albicans* por neutrófilos envolve a adesão dos microrganismos, fagocitose, e uma ação colaborativa de EROs e componentes dos grânulos específicos. Os mecanismos microbicidas oxidativo de neutrófilos são de grande importância contra fungos (HATANO et al., 2002), e nós avaliamos o efeito do Tempol na produção destes oxidantes por neutrófilos.

A ativação da proteína quinase C δ em neutrófilos desencadeia a produção de EROs e aumenta a fagocitose e morte intracelular de *C. albicans* (LI et al., 2016). Além disso, alguns agentes antifúngicos, como a micafungina, um composto solúvel em água derivado de *Coleoptima empedri*, tem sido demonstrado capaz de melhorar o burst oxidativo de neutrófilos e por aumentar a eficácia fungicida de neutrófilos contra *C. albicans* e *C. dubliniensis* (CHANDRASEKAR, SOBEL, 2006). A aminoguanidina, um inibidor de glicação das proteínas, aumenta a atividade do sistema Nox2 paralelo a atividade fungicida contra *C. albicans* (FERREIRA et al., 2016).

Destacando a importância do controle metabólico de Nox2, uma regulação endógena do burst oxidativo de neutrófilos foi claramente demonstrada por Kasahara et al. (2016) que relatou que monócitos que derivam macrófagos por estímulo com fator estimulante de

colônias (GM-CSF), uma citocina pleitrópica, é capaz de reforçar a atividade do sistema Nox2, e paralelamente, estimular a resposta fungicida contra *Aspergillus fumigates*.

Previamente, Linares et al. (2008) relataram que Tempol promove um ambiente favorável a proliferação de *Leishmania amazonensis*, por regulação da expressão de iNOS, facilitando a ação scavenger de oxidantes derivados do óxido nítrico, que conduz a significativo aumento da carga parasitária em um modelo animal. Em acordância com estes resultados, nós demonstramos aqui que, em ensaios in vitro, o Tempol altera a sinalização de neutrófilos associado à atividade de Nox2, determinando diminuição na eficácia fungicida.

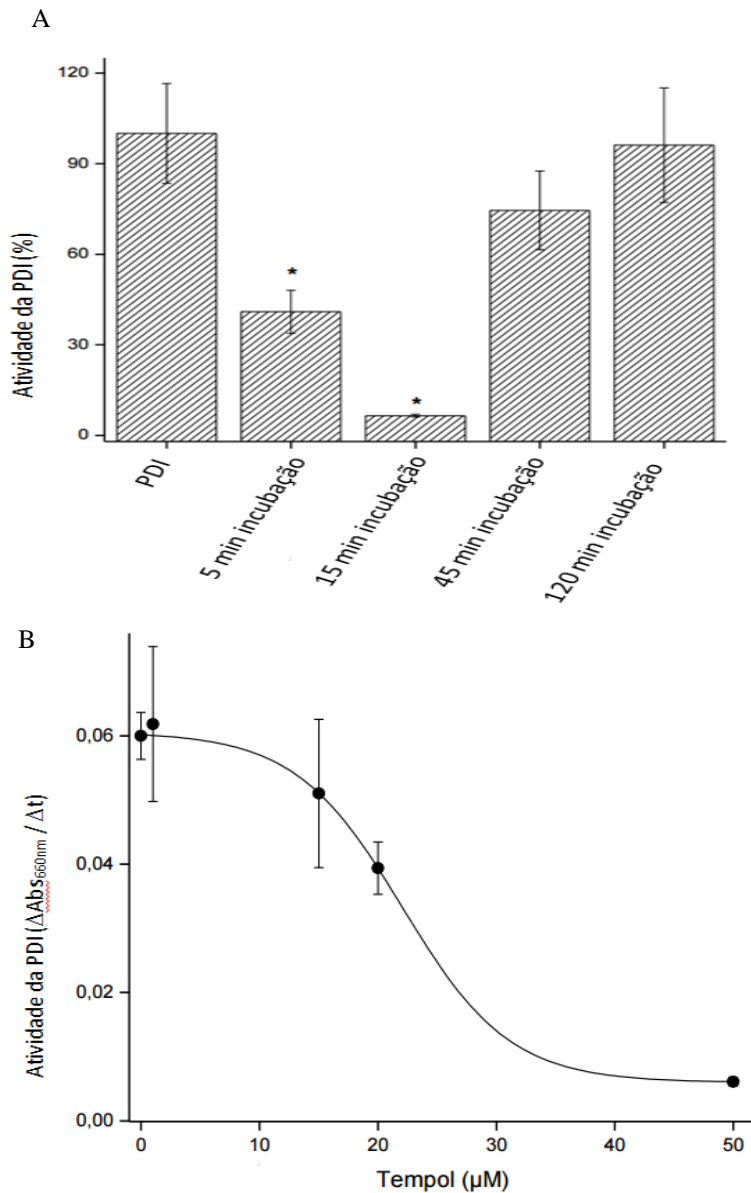
5.5 INIBIÇÃO DA ATIVIDADE REDUTASE DA PDI PELO TEMPOL

O efeito do Tempol sobre a atividade da PDI foi analisado pela atividade enzimática da enzima.

5.5.1 Tempol inibe atividade redutase da PDI recombinante

O efeito do Tempol na atividade redutase da PDI in vitro foi avaliada pela precipitação de insulina, mensurada espectrofotometricamente (Figura 17). A pré-incubação da enzima recombinante humana com diferentes concentrações de Tempol, causou uma inibição da atividade de redutase PDI de um modo dependente da concentração do nitróxido (Figura 17B). A diminuição observada na atividade redutase da PDI foi máxima quando pré-incubados com a enzima durante 15 minutos antes da avaliação da atividade de redutase desta enzima (Figura 17A).

Figura 17. Modulação da atividade da PDI por Tempol.



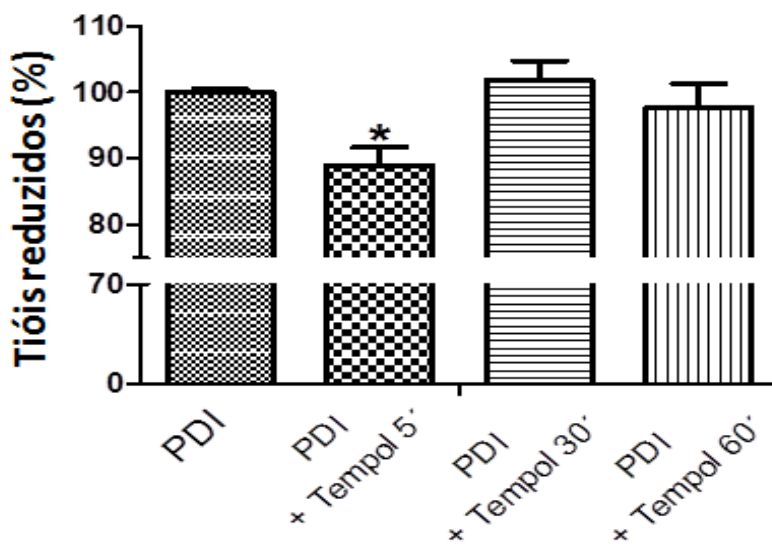
Fonte: Da Autora.

Nota: A atividade redutase da PDI foi monitorada pela aplicação do método de insulina. Para isso, PDI recombinante humana (1 μM) foi incubada com DTT (1 μM) e, em seguida, a reação foi iniciada com a adição de insulina (1 mg/mL). A atividade redutase foi avaliada a 600 nm durante 180 minutos. Em todos os casos, a condição sem Tempol correspondeu a 100% da atividade da enzima. A) A enzima foi incubada com Tempol (35 μM) em diferentes tempos de pré-incubação, e, em seguida, DTT e insulina foram adicionados para iniciar a atividade da enzima. Os resultados expressam média ± DP de 3 experimentos independentes **P* < 0,05. B) O efeito dependente da concentração de Tempol foi analisado utilizando-se concentrações de 0-50 μM do nitróxido. A enzima foi pré-incubada com Tempol durante 15 minutos e, em seguida, determinou-se a atividade da PDI. O gráfico mostra um experimento representativo de três experimentos independentes.

Tempol foi demonstrado em diversos estudos por exercer uma marcante eliminação de EROs/ERNs (SAMUNI, BARENHOLZ, 2003; SOULE et al., 2007; WILCOX, PEARLMAN, 2008). Nos últimos anos, a PDI foi sugerida para desempenhar um papel na ativação do complexo NADPH oxidase, sendo, portanto, um alvo de inibição para diminuir a formação de EROs, como por exemplo, durante os processos inflamatórios. Nesse estudo, nós determinamos a capacidade do Tempol em inibir a atividade redutase da PDI. A inibição da enzima foi demonstrada através do método de insulina (Figura 17). Um efeito máximo de Tempol foi observado após pré-incubação da PDI com o nitróxido durante 15 minutos. Com tempos de pré-incubação mais longos observou-se efeitos inferiores de inibição (Figura 17A). Estes resultados sugerem que a inibição exercida pelo Tempol sobre a PDI pode ser reversível.

Foi observada uma redução do conteúdo de tióis em tempos de pré-incubação da PDI com Tempol mais curtos com um retorno às condições iniciais após 30 minutos (Figura 18).

Figura 18: Efeito do Tempol no conteúdo de tióis livres da PDI



Fonte: Da Autora

Nota: PDI foi incubada na presença ou ausência de Tempol sob as mesmas condições que na figura 17. Após diferentes tempos de incubação, o teor de tiol reduzido da proteína foi determinado usando DTNB. Como mostrado na figura, há uma diminuição do teor de tiol reduzido em tempos anteriores, quando a enzima é inibida por Tempol, enquanto se inverte em tempos de incubação maiores, de acordo com os resultados obtidos para a atividade da enzima. Os resultados apresentados correspondem à média \pm DP com um $n = 3$.

Como esperado, o número de tióis livres reduzidos em PDI diminuiu em tempos mais curtos retornando às condições iniciais em tempos de incubação semelhantes aos observados

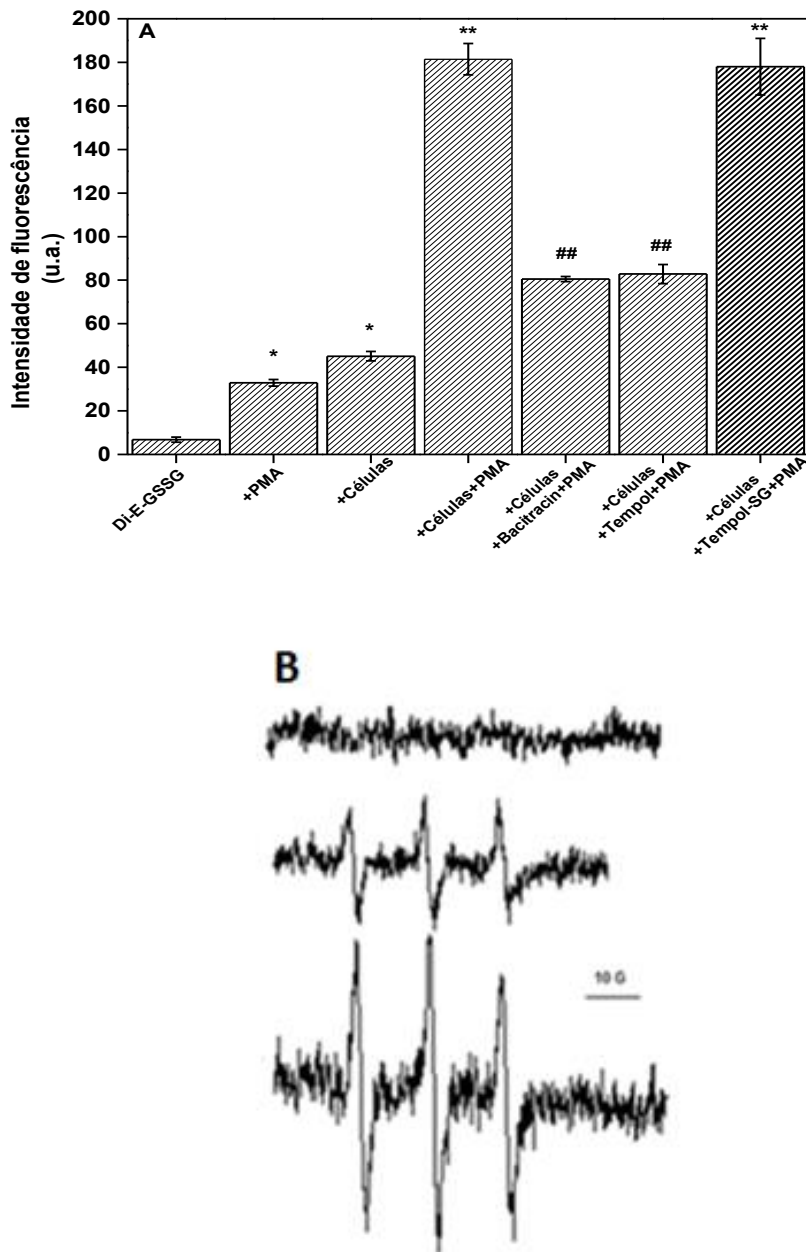
para a reversão da ação inibitória de Tempol (Figura 17A). Além disso, é bem descrito na literatura que a reação de nitróxidos com tiolatos é reversível, em um mecanismo proposto como aquele responsável pela proteção que nitróxidos exercem sobre tióis, na presença de ERN ou ERO (GOLDSTEIN et al., 2008). A formação de um aduto entre o tiol e o nitróxido é instável sob condições fisiológicas que conduzem à decomposição não-tóxica do aduto (GOLDSTEIN et al. 2008) que está de acordo com a ação reversível de Tempol (Figura 17A).

5.5.2 Tempol afeta a atividade da PDI em neutrófilos

A atividade da PDI em neutrófilos foi avaliada usando o pseudo-substrato da PDI, o Di-E-GSSG. A PDI reduzida cliva as ligações dissulfeto do Di-E-GSSG para liberar o produto fluorescente (E-GSH). Os neutrófilos ativados mostram um aumento de 4 vezes na fluorescência em comparação com as células não ativadas (Figura 19). Neutrófilos foram pré-incubados durante 15 minutos com Tempol (15 μ M) e, em seguida, as células foram ativadas com PMA. Sob estas condições experimentais, Tempol foi capaz de diminuir a emissão de fluorescência cerca de 50% (Figura 19A) e esta diminuição foi considerada como sendo um efeito dependente das concentrações utilizadas do nitróxido (Figura 20). O efeito observado foi similar ao obtido com o inibidor da PDI, a bacitracina. Os controles com células não-ativadas ou ativadas com PMA na ausência de neutrófilos não apresentaram interferência significativa nos experimentos, monitorada pela emissão de fluorescência nas mesmas condições de ensaio (Figura 19).

O aduto Tempol-SG obtido por modificação química da porção nitróxido foi confirmada por desaparecimento do sinal EPR (Figura 19 B). Observou-se o decaimento do sinal de EPR característico do Tempol na presença de radicais tiila no sistema onde radicais glutacionila foram produzidos por meio da reciclagem de radicais fenoxila gerados pelo sistema peroxidase/H₂O₂. Não ocorreram alterações na atividade de PDI com o uso de Tempol-SG, indicando que o nitróxido pré-reagido com GSH foi inativo na atividade redutase de PDI de neutrófilos (Figura 19A).

Figura 19. Tempol inibe a PDI em neutrófilos ativado.



Fonte: Da Autora.

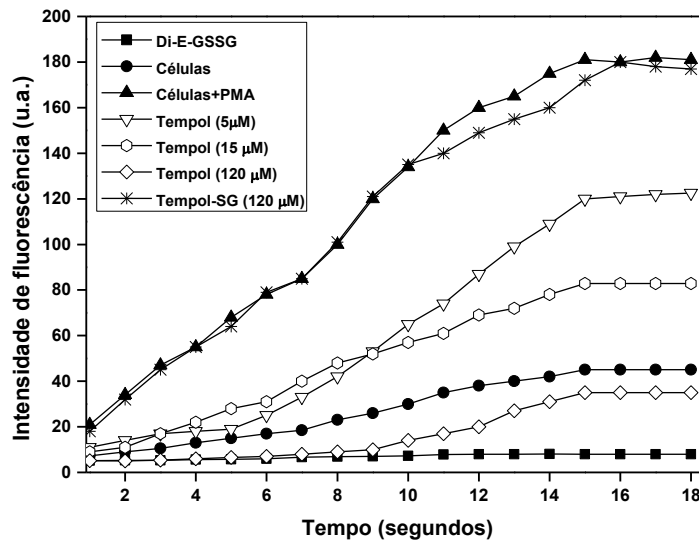
Nota: A. Suspensões de neutrófilos (10^6 células / ml) foram mantidas em estado de repouso ou ativadas com PMA (100 ng / 10^6 células) após 10 minutos de pré-incubação com bacitracina (2 mM), Tempol (15 μ M) ou Tempol-SG (120 μ M) a 37 ° C. Em seguida, foi adicionado dicarbonato de di-E-GSSG (150 nM) e a atividade de PDI de neutrófilos foi avaliada. Os resultados apresentados correspondem à média \pm S.D. de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata. * P <0,05 vs Di-E-GSSG; ** P <0,001 vs Di-E-GSSG + células; ## P <0,001 vs Di-E-GSSG + células + PMA e vs Di-E-GSSG + células + Tempol-SG + PMA. B. Sinal de EPR do Tempol modificado com GSH. O espectro inferior mostra a banda característica sem adição de GSH; o registro do meio foi obtido com a adição de 7,5 μ M de GSH; o espectro superior foi registrado após a adição de 10 μ M de GSH. Fenol (2,5 μ M), peroxidase (HRP 0,2 U / ml), Tempol (10 μ M) e H₂O₂ (10 μ M) foram mantidos nas mesmas concentrações em todos os experimentos.

Com base na interação do nitróxido com radicais tiila (BORISENKO et al., 2004), observou-se que o espectro paramagnético do nitróxido foi alterado (Figura 19B). Uma vez que o aduto formado nestas condições experimentais é instável (GOLDSTEIN et al., 2008), foram analisados os efeitos do Tempol inativado imediatamente após a reação na presença de GSH/HRP/H₂O₂. O produto resultante, Tempol-SG, foi utilizado para demonstrar que o bloqueio do grupo $> N = O \cdot$ pela formação de aduto (Figura 19B) não teve nenhum efeito sobre a atividade redutase da PDI (Figura 19A).

Ditiol oxidoredutases, especialmente aquelas que pertencem à superfamília tioredoxina, são conhecidas por ser importante nos mecanismos de sinalização redox (ARRIGO, 1999; CLISSOLD, BICKNELL, 2003; WILKINSON, GILBERT, 2004). Dentro da superfamília tioredoxina, PDI e os seus análogos catalisam reações de isomerização que rearranjam as posições das ligações de dissulfeto através de ciclos repetidos de oxidação e redução (FERRARI, SOLING, 1999). Leucócitos, apesar de sua meia-vida curta e baixos níveis de ribossomos e RE, expressam PDI abundantemente e liberam-na na forma solúvel, quando estimulados com ésteres de forbol, tais como PMA (BASSUK et al., 1990).

Para analisar a atividade redutase da PDI dos neutrófilos, realizamos ensaios de fluorescência, seguindo a formação do composto fluorescente de E-GSH, gerado pela quebra das pontes de dissulfeto de di-E-GSSG por PDI (Figura 1). A ativação dos neutrófilos com PMA levou a um aumento de até 4 vezes na intensidade de fluorescência que pode ser atribuível a atividade da PDI e esta atividade foi fortemente inibida pelo Tempol e bacitracina. E-GSH e PMA sozinhos não mostraram interferência significativa nos ensaios (Figura 19). Notavelmente, a diminuição da atividade redutase da PDI por Tempol foi mais eficiente do que pela bacitracina, confirmando a sua marcante capacidade para modular não apenas o burst oxidativo, mas também a atividade desta enzima, isto em baixas concentrações (μ M).

Figura 20: Detecção por fluorescência da atividade redutase da PDI em neutrófilos provenientes de focos inflamatórios.



Fonte: Da Autora.

Nota: A atividade da PDI foi monitorada em um estado de repouso ou com células estimuladas por PMA (100 ng de PMA/10⁶ células), pela produção de E-GSH. Di-E-GSSG (150 nM) foi utilizado como um substrato. Tempol (5, 15 e 120 µM) ou Tempol-SG (120 µM) foi adicionado antes da estimulação celular e a atividade da PDI foi acompanhada durante o *burst* respiratório. Os resultados apresentados são representativos de pelo menos três experimentos separados.

Tempol foi capaz de inibir a atividade catalítica da PDI desencadeada pelo PMA (Figura 20). A intensidade de fluorescência mostrou uma fase de retardamento, na presença de Tempol, e a inibição foi quase 100% na maior concentração testada (Figura 20). A PDI participa da montagem do complexo NADPH oxidase em células fagocíticas, portanto, influenciando na resposta imune; por exemplo, alterando os níveis dos complexos NADPH oxidase (BENHAM, 2012; LAURINDO et al., 2008). Tempol pode ser considerado, in vivo, uma molécula com efeitos pleiotrópicos, especialmente devido à sua atividade antioxidante (SAMUNI, BARENHOLZ, 2003; SOULE et al., 2007; TEKE et al., 2008; WILCOX, PEARLMAN, 2008). Desde que Tempol é capaz de inibir a atividade da PDI, algumas considerações clínicas são relevantes. Em primeiro lugar, Tempol poderia interferir com os processos fisiológicos regulados pela PDI (LAURINDO et al., 2008). Além disso, os níveis da atividade da PDI têm de ser reduzidas em algumas situações clínicas, para as quais o Tempol poderia apresentar um efeito benéfico.

As aplicações terapêuticas da inibição da PDI podem ser consideradas usando Tempol, uma vez que ele inibe a atividade da PDI, como demonstrado neste estudo, e pelo

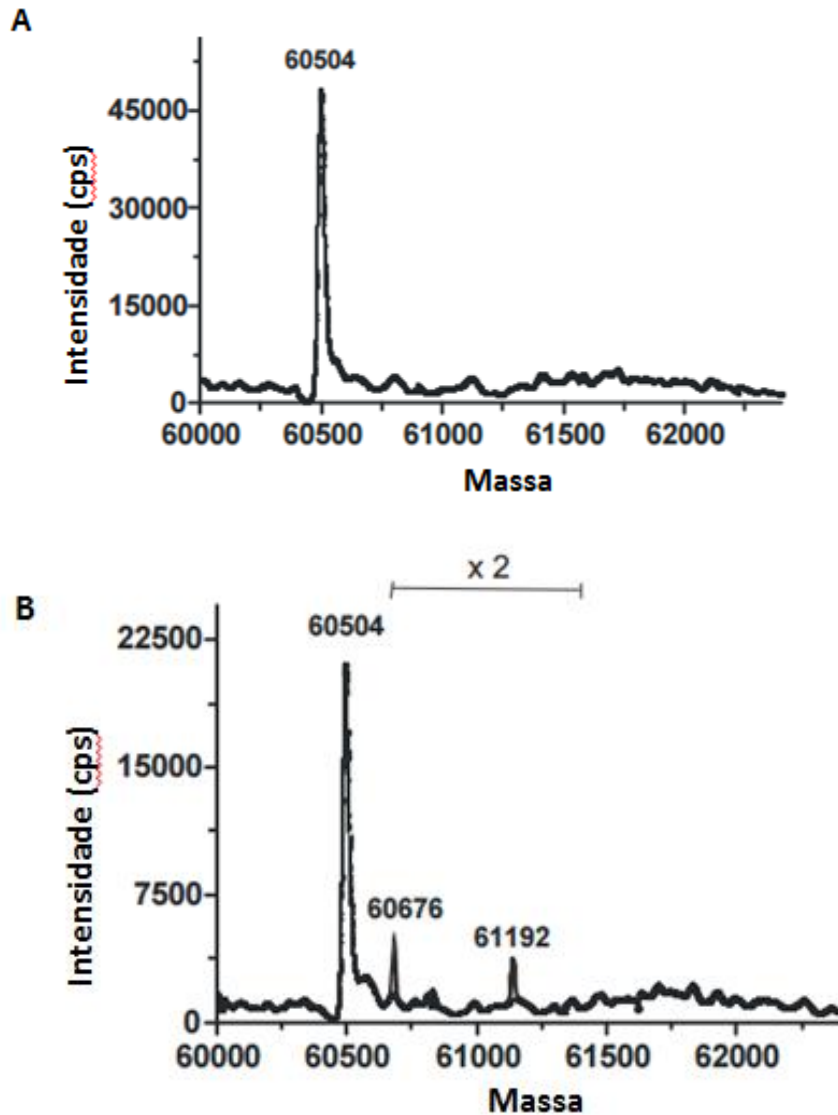
fato deste composto apresentar baixa toxicidade, bem como excelentes parâmetros farmacocinéticos *in vivo* (SAMUNI, BARENHOLZ, 2003; SOULE et al., 2007; WILCOX, PEARLMAN, 2008); Além disso, PDI como um alvo terapêutico foi estudada através de anticorpos monoclonais como uma terapia associada com um inibidor desta enzima, a bacitracina, em que foram observadas a inibição da migração celular e da invasão tumoral, o que implica que a PDI da superfície celular pode estar envolvida na mediação como sinalizadora de vias apoptóticas (GOPLIN et al., 2006; GREK, TOWNSEND, 2014).

Raturi e Mutus (2007) relataram que se PDI é mantida em um estado reduzido usando uma concentração baixa de DTT que é insuficiente para reduzir a sonda, a atividade de redutase da PDI pode ser explorada na superfície celular. A elevada afinidade de Di-E-GSSG foi atribuída, pelo menos em parte, para os anéis aromáticos de eosina, que facilitam uma interação hidrofóbica com PDI perto do seu sítio ativo, que resulta em alta afinidade. Esta hipótese é considerada porque ditióis na tioredoxina estão rodeados por regiões hidrofóbicas naquele sítio ativo. É razoável supor que Tempol pode causar uma inibição direta da PDI por ligação às regiões hidrofóbicas desta enzima.

5.6 TEMPOL SE LIGA NO SÍTIO ATIVO a' DA PDI

A fim de se analisar os mecanismos envolvidos na inibição *in vitro* da atividade redutase da PDI pelo Tempol, foram realizados estudos de massa da enzima recombinante incubada com Tempol (Figura 21). Como mostrado, a enzima reduzida apresentou uma massa de 60504 Da. Quando incubada com Tempol, dois picos de 60676 e 61192 Da foram observados, correspondentes à adição de uma e quatro moléculas de Tempol, respectivamente (Figura 21 B).

Figura 21. Análise por MS da ligação do Tempol à PDI.



Fonte: Da Autora.

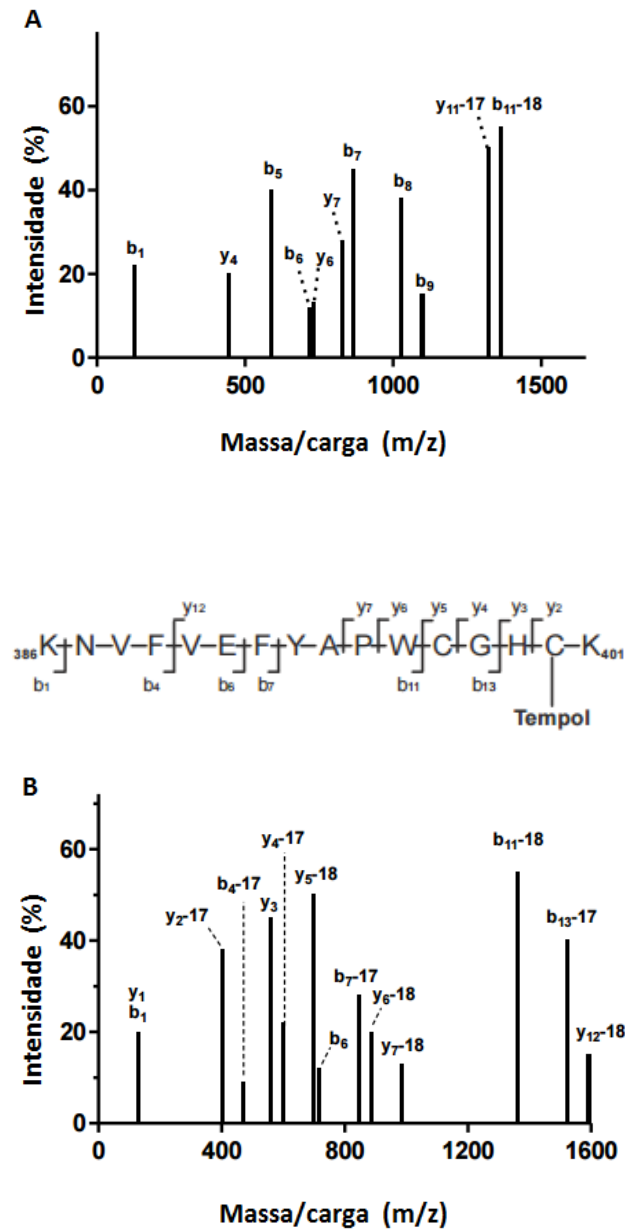
Nota: A ligação do Tempol à PDI foi analisada por LC-MS, tal como explicado na seção de Materiais e Métodos. PDI no estado reduzido (A, 60504 Da) foi incubada com Tempol durante 60 minutos à temperatura ambiente em uma proporção molar 1:6. (B) Os espectros de massa mostraram a presença de ions correspondentes à adição de 1 (60676 Da) ou 4 (61192 Da) moléculas de Tempol. Os resultados apresentados são representativos de três experimentos independentes.

Para analisar o potencial de modificação dos sítios ativos da PDI por Tempol, realizamos estudos utilizando espectrômetro de massa usando a PDI humana recombinante. A enzima recombinante exibiu uma massa de 60504 Da, que está de acordo com prévios relatos na literatura, utilizando o mesmo plasmídeo para expressar a proteína (Figura 21A). Quando incubada com Tempol, além da proteína não modificada, dois outros picos apareceram, que

correspondem à soma de 1 ou 4 moléculas de Tempol a enzima (Figura 21B). Estes resultados são compatíveis com a reversibilidade que sugeriu a inibição observada na Figura 17, em que a inibição diminui com tempos de pré-incubação mais longos. Assim, foi realizada a tripsinização da PDI não modificada e modificada por Tempol para identificar as modificações covalentes, que finalmente explicam os resultados previamente observados.

Devido à presença de quatro resíduos de cisteína no sítio ativo da enzima, nós analisamos se a ligação foi observada de forma covalente e onde esta interação ocorre. Quando PDI recombinante foi tripsinizada, observou-se uma cobertura superior a 70% (ANEXO B). Para este fim, utilizou-se a forma reduzida da enzima. Além da PDI recombinante isolada tripsinizada (ANEXO B) nós incubamos a PDI recombinante com maleimida (ANEXO C) e/ou Tempol (ANEXO D e E) e analisamos os peptídeos resultantes da tripsinização. Quando os peptídeos foram analisados, somente um foi encontrado por ser modificado em comparação com a enzima não-tratada. Este peptídeo continham Cys397 e Cys400 no sítio ativo a' (Figura 22). A análise da série y e b mostram que apenas Cys400 foi covalentemente modificada pelo Tempol, sugerindo a formação de interações não-covalentes entre a PDI recombinante e Tempol para além da ligação à Cys400. Isto é confirmado pela variação da massa de 172 Da dos fragmentos contendo Cys400, enquanto que nenhuma diferença em massa foi observada quando este resíduo se encontra ausente. O tipo de interação com as outras três moléculas de Tempol não pôde ser determinada, o que sugere uma ligação fraca para a enzima.

Figura 22. Detecção da ligação covalente do Tempol ao sítio ativo da PDI através da análise de LC-MS/MS.



Fonte: Da Autora.

Nota: PDI reagiu com Tempol como explicado na seção Materiais e Métodos, seguido por digestão com tripsina. Os peptídeos contendo Cys₄₀₀ e Cys₃₉₇ foram analisados por MS/MS para determinar a modificação covalente pelo Tempol. Os espectros mostram a série y e b para cada peptídeo.

Após análise da Figura 22, podemos concluir que Tempol se liga covalentemente à PDI. Em primeiro lugar, a partir dos peptídeos obtidos pela digestão da proteína, apenas o peptídeo que inclui o sítio ativo a' (${}_{386}\text{KNVFVEFYAPWCGHCK}_{401}$) foi modificado e apenas por uma molécula de Tempol (Figura 22). Da série y e b, observamos que apenas Cys400 foi covalentemente modificada por Tempol. Os fragmentos que contêm este resíduo mostram um aumento de massa em 172 Da (correspondente a uma molécula de Tempol) em contraste com aqueles contendo apenas Cys397, cuja m/z não se alterou em qualquer um dos fragmentos detectados (Figura 22). A ligação covalente de mais moléculas de Tempol à PDI não foi detectada e, mais importante, não há outros resíduos de Cys que foram modificados na proteína (dados não apresentados). Como expresso anteriormente, uma vez que está relatado que o aduto formado pelo nitróxido é instável (GOLDSTEIN, 2008) não podemos descartar que outros adutos são transitoriamente formados durante a inibição da PDI participando no mecanismo de inibição da enzima mediada por Tempol.

Em resumo, os nossos resultados suportam o fato de que a ativação de neutrófilos induz a atividade redutase da PDI na membrana plasmática dos neutrófilos e que Tempol é capaz de inibir a atividade redutase da chaperona. O sítio ativo a' da PDI foi recentemente demonstrado ser importante para a função da enzima em plaquetas (grupo Essex JCI, 2015). Assim, a capacidade do Tempol em modificar covalentemente a Cys400 pode ter relevância biológica e clínica. Finalmente, se a PDI é relatada em processos patológicos, a proteína pode representar um importante alvo farmacológico para a intervenção terapêutica com Tempol.

6. CONCLUSÕES

Os nossos resultados suportam o fato de que a ativação de Nox2 de neutrófilos é modulada por pelo menos dois mecanismos mediados pelo Tempol:

(i) inibição da ativação de Nox2 paralela à atividade redutase da PDI na membrana plasmática dos neutrófilos, evidenciada através de análises por espectrometria de massa. A capacidade do Tempol em modificar covalentemente a Cys₄₀₀ pode ter relevância biológica e clínica, que deve ser ainda melhor avaliada. Se PDI é implicada em processos patológicos ela pode representar um importante alvo farmacológico para a intervenção terapêutica com Tempol.

(ii) os resultados apoiam um papel central das proteínas quinases para a sinalização celular na produção de oxidantes e o mecanismo fungicida de fagócitos mesmo não permitindo discriminar entre as isoformas de proteínas quinases dos neutrófilos afetadas pela ação envolvendo o Tempol na ativação de Nox2.

Assim, as estratégias terapêuticas propostas fundamentadas na utilização de nitróxidos cíclicos devem levar em conta o risco potencial de alterar a resistência do hospedeiro à infecção por fungos.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia celular e molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier, 2005.

AGGARWAL, B. B.; VIJAYALEKSHMI, R. V.; SUNG, B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. **Clin. Cancer Res.**, v. 15, p.425–430, 2009.

ANDERSON, M. T. et al. An improved monobromobimane assay for glutathione utilizing Tris-(2-carboxyethyl) phosphine as the reductant. **Analytical Biochemistry**, v. 272, p. 107–109; 1999.

APPENZELLER-HERZOG, C. et al. A novel disulphide switch mechanism in Ero1alpha balances ER oxidation in human cells. **EMBO J.**, v. 27, p. 2977-2987, 2008.

ARONOVITCH, Y. et al. Dual activity of nitroxides as pro- and antioxidants: Catalysis of copper-mediated DNA breakage and H₂O₂ dismutation. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 42, p. 1317-1325, 2007.

ARRIGO, A. P. Gene expression and the thiol redox state. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, p. 936-944; 1999.

BABIOR, B.M. NADPH oxidase. **Current Opinion in Immunology**, v. 16, p. 42-47, 2004.

BABIOR, B.M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, v. 93, p. 1464-1476, 1999.

BABIOR, B.M. Phagocytes and oxidative stress. **Am. J. Med.**, v. 109, p. 33-44, 2000.

BABIOR, B.M. The respiratory burst oxidase. **Adv. Enzymol.**, v. 65, p. 49-95, 1992.

BALDRIDGE, C.W.; GERARD, R.W. The extra respiration of phagocytosis. **Am. J. Physiol.**, v. 103, p.235-236, 2000.

BANDAY AA, FAZULI FR, LOKHANDWALA MF. Oxidative stress causes renal dopamine D1 receptor dysfunction and hypertension via mechanisms that involve nuclear factor kB and protein kinase c. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.18, p. 1446-1457; 2007.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p.113-123, 2006.

BARTOSZ, G. Reactive oxygen species: destroyers or messengers? **Biochemical Pharmacology**, doi: 10.1016/j.bcp.2008.11.009, 2008.

BASSUK, J. A.; CAPODICCI, C.; Berg, R. A. Protein disulphide isomerase from human peripheral blood neutrophils. **Journal of Cellular Physiology**, v. 144, p. 280-286; 1990.

BENHAM, A. M. The protein disulfide isomerase family: key players in health and disease. **Antioxid Redox Signal**, v. 16, p. 781-9; 2012.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista Nutrição**, v. 12, p. 123-130, 1999.

BLANCK, J. et al. Cytochrome P-450 spin state and leakiness of the monooxygenase pathway. **Xenobiotica**, v. 21, p.121– 135, 1991.

BORISENKO, G. G. et. al. Nitroxides Scavenge Myeloperoxidase-Catalyzed Thiyl Radicals in Model Systems and in Cells. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 126, p. 9221-9232, 2004.

BORREGAARD N. **The Respiratory Burst: An Overview**. In: The respiratory burst and its physiologic significance. Ed. Anthony J. Sbarra, Robert R. Strauss. 1-33, Plenum Press, New York; 1998.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia Geral**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

BRIGAGÃO M.R.P.L., COLEPICCOLO P. Oscillations in superoxide anion release by polymorphonuclear leukocytes and its inhibition by human saliva. **Biol. Rhythm. Res.**, v. 27, p. 269-280, 1996.

BRIGAGÃO, M.R.P.L., BARROSO, A.S., COLEPICCOLO, P. **Fluctuation of reactive oxygen species released by inflammatory cells**. Driessche T.V. (Ed). In: The Redox State and Circadian Rhythms. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000.

CALDEFIE-CHEZÉT, F. et al. Anti-inflammatory effects of Melaleuca alternifolia essential oil on human polymorphonuclear neutrophils and monocytes. **Free Radical Research Communication**, London, v.38, n.8, p.805-811, 2004.

CHANDRASEKAR, P.H., SOBEL J.D.. Micafungin: A New Echinocandin. **Clinical Infectious Diseases**. v. 42, p. 1171-1178, 2006.

CHRISTOPHER S. WILCOX AND ADAM PEARLMAN. Chemistry and Antihypertensive Effects of Tempol and Other Nitroxides. **Pharmacol Rev**, v. 60, p. 418–469, 2008.

CIRCU, M.L. et al. Contribution of glutathione status to oxidant-induced mitochondrial DNA damage in colonic epithelial cells. **Free Rad. Biol. Med.** v. 47, p. 1190-1198, 2009.

CLISSOLD, P. M.; BICKNELL, R. The thioredoxin-like fold: hidden domains in protein disulfide isomerases and other chaperone proteins. **BioEssays**, v. 25, p. 603-611; 2003.

COHEN HJ, CHO VANIEC ME. Superoxide generation by digitonin-stimulated guinea pig granulocytes: a basis for a continuous assay monitoring superoxide production and for the study of the activation of the generating system. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 61, no.4, p. 1081–1087; 1978.

COPPEY L.J. et al. Preventing superoxide formation in epineurial arterioles of the sciatic nerve from diabetic rats restores endothelium-dependent vasodilation. **Free Radical Research**, v.37, no.1, p. 33-40; 2003.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins patologia estrutural e funcional**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

CROSS, A. The participation of the hemes of flavocytochrome b245 in the electron transfer process in NADPH oxidase. **Blood**, v. 93, p. 4449, 1999.

CURY, A. **Pais brilhantes, professores fascinantes**, Sextante, 2003.

CUZZOCREA S. et al. Effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model of carrageenan-induced pleurisy. **European Journal of Pharmacology**, v.390, no.1-2, p. 209-222; 2000.

DAHLGREN C, KARLSSON A, BYLUND J. **Measurement of respiratory burst products generated by professional phagocytes**. Totowa, New Jersey: Humana press; 2007.

DAHLGREN C. KARLSSON A. Respiratory burst in human neutrophils. **Journal of Immunological Methods**, v.232, no.1-2, p. 3–14; 1999.

DALE DC, BOXER L, LILES WC. The phagocytes: neutrophils and Monocytes. **Blood**, v.112, no.4, p. 935-945; 2008.

DALLE-DONNE, I. et al. S-glutathionylation in protein redox regulation. **Free Radical Biology & Medicine**, v.43, p.883-898, 2007.

DANG, P.M.; CROSS, A.R.; BABIOR, B.M. Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: a direct interaction between p67PHOX and cytochrome b558 II. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 98, n. 7, p 3001-3005,

DANG, P.M.et al. Protein kinase C zeta phosphorylates a subset of selective sites of the NADPH oxidase component p47phox and participates in formyl peptidemediated neutrophil respiratory burst. **J. Immunol.**, v. 166, n. 2, p. 1206-1213, 2001.

DANG, P.M.et al. Phosphorylation of the NADPH oxidase component p67(PHOX) by ERK2 and P38MAPK: selectivity of phosphorylated sites and existence of an intramolecular regulatory domain in the tetratricopeptide-rich region. **Biochemistry**, v. 42, n. 15, p. 4520-4526, 2003.

DARBY, N.J.; KEMMINK, J.; CREIGHTON, T.E. Identifying and characterizing a structural domain of protein disulfide isomerase, **Biochemistry**, v. 35, p.10517– 10528, 1996.

DARBY, N.J.; PENKA, E.; VINCENNELLI, R. The multi-domain structure of protein disulfide isomerase is essential for high catalytic efficiency. **J. Mol. Biol.**, v. 276, p. 239–247, 1998.

DINAUER, M.C. et al. Human neutrophil cytochrome b light chain (p22-phox). Gene structure, chromosomal location, and mutations in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease. **J. Clin. Invest.**, v. 86, p.1729-1737, 1990.

DINAUER, M.C. et al. The glycoprotein encoded by the X-linked chronic granulomatous disease locus is a component of the neutrophil cytochrome b complex. **Nature**, v. 327, p.717-720, 1987.

DOBSON, C.M. Protein folding and its linking with human disease. In: **Biochem. Soc. Symp.**, p.1-26, 2001.

DRAGUTAN, I., MEHLHORN, R. J. Modulation of oxidative damage by nitroxide free radicals. **Free Radic. Research**, v. 41, p. 303-315, 2007.

DYKE, K.V. **Soluble and insoluble activators of neutrophil chemiluminescence. Jesaitis, A.J.; Dratz, E.A.** (Ed). In: *The Molecular Basis of Oxidative Damage by Leukocytes*. Montana: Big Sky, 1991.

EDMAN, J.C. et al. Sequence of protein disulphide isomerase and implications of its relationship to thioredoxin, **Nature**, v. 317, p.267– 270, 1985.

EL-BENNA J, DANG PM, GOUGEROT-POCIDALO MA. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. **Semin Immunopathol**, v. 30, p. 279-289; 2008.

EL-BENNA J., DANG, P.M., YAFFE, M.B. . The Phagocyte NADPH Oxidase: Structure and Assembly of the Key Multicomponent Enzyme of Innate Immunity. Reference Module in Biomedical Sciences, from **Encyclopedia of Cell Biology**, v. 3, p. 702-709; 2016.

EL-BENNA, J. et al. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. **Arch. Immunol. Ther. Exp.** (Warsz), v. 53, n. 3, p. 199-206; 2005.

EL-BENNA, J.; RUEDI, J.M.; BABIOR, B.M. Cytosolic guanine nucleotide binding protein Rac2 operates in vivo as a component of the neutrophil respiratory burst oxidase. Transfer of Rac2 and the cytosolic oxidase components p47phox and p67phox to the submembranous actin cytoskeleton during oxidase activation. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 9, p. 6729- 6734, 1994.

ELLGAARD, L.; RUDDOCK, L.W. The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. **EMBO Rep.**, v. 6, p. 28-32, 2005.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch Biochem Biophys** v. 82, p. 70-77, 1959.

FERNANDES, D. C. et al. Protein disulfide isomerase overexpression in vascular smooth muscle cells induces spontaneous preemptive NADPH oxidase activation and Nox1 mRNA expression: Effects of nitrosothiol exposure. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 484, p.197–204, 2009.

FERNANDES, D. C. Tempol diverts peroxynitrite/carbon dioxide reactivity toward albumin and cells from protein-tyrosine nitration to protein-cysteine nitrosation. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 38, p. 189–200, 2005.

FERNANDES, D. C.; MEDINAS, D. B.; ALVES, M. J. M.; Augusto, O. Tempol diverts peroxynitrite/carbon dioxide reactivity toward albumin and cells from protein-tyrosine nitration to protein-cysteine nitrosation. **Free Radical Biology & Medicine** v. 38, p. 189-200; 2005.

FERRARI, D. M.; SOLING, H. D. The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds. **The Biochemical Journal**, v. 339, p. 1-10; 1999.

FERREIRA C.S. et al. Aminoguanidine treatment increased NOX2 response in diabetic rats: Improved phagocytosis and killing of *Candida albicans* by neutrophils. **European Journal of Pharmacology**, v. 772, p. 83-91; 2016.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997.

FUJITA, E. et al. Caspase-12 processing and fragment translocation into nuclei of tunicamycin-treated cells., **Cell Death Differ.**, v. 9, p.1108-1114, 2002.

GLEBSKA, J. et al. Pro oxidative activity of nitroxides in their reactions with glutathione. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 35, p. 310-316, 2003.

GOLDBERGER R.F.; EPSTEIN C.J.; ANFINSEN C.D. Acceleration of reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by a microsomal system from rat liver. **J. Biol. Chem.**, v. 238, p.628-635, 1963.

GOLDSTEIN S. et al. **The Journal of Chemistry physical** A 112 (37): 8600-8605; De 2008.

GOLDSTEIN, S. et al. Kinetics of the Reaction between Nitroxide and Thiyl Radicals: Nitroxides as Antioxidants in the Presence of Thiols. **J. Phys. Chem. A**, v. 112, p.8600-8605, 2008.

GOLDSTEIN, S.; SAMUNI, A.; MERENYI. G. Reactions of Nitric Oxide, Peroxynitrite, and Carbonate Radicals with Nitroxides and Their Corresponding Oxoammonium Cations. **Chemical Research in Toxicology**, v. 17, p. 250-257, 2003.

GOPALAKRISHNA R, JAKEN S. Protein kinase C signaling and oxidative stress. **Free Radic Biol Med.** v. 1;28(9), p. 1349-61; 2000.

GOPLEN, D. et al. Protein disulfide isomerase expression is related to the invasive properties of malignant glioma. **Cancer Res**, v. 66, p. 9895–9902; 2006.

GORSKY, L.D.; KOOP, D.R.; COON, M.J. On the stoichiometry of the oxidase and monooxygenase reactions catalyzed by liver microsomal cytochrome P-450. Products of oxygen reduction. **J. Biol. Chem.**, v. 259, p.6812– 6817, 1984.

GREEN JN, WINTERBOURN CC, HAMPTON MB. **Analysis of neutrophil bactericidal activity**. Totowa, New Jersey: Humana press; 2007.

GREK, C.; TOWNSEND, D. M. Protein Disulfide Isomerase Superfamily in Disease and the Regulation of Apoptosis. **Endoplasmic Reticulum Stress Dis**, v. 1, p. 4–17; 2014.

GRISHAM, M.B. Reactive oxygen species in immune responses. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, p. 1479-1480, 2004.

GROEMPING, Y. et al. Molecular basis of the phosphorylation-Induced Activation of the NADPH Oxidase. **Cell**, v. 113, p. 343-355, 2003.

GROEMPING, Y.; RITTINGER, K. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. **Biochem. J.**, v. 386, p. 401-16, 2005.

GRUBER, C.W. et al. Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding. **Trends Biochem. Sci.**, v. 31, p. 455-464, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDG, J.M.C. **Free Radic. Biol. Med.** 4. ed. New York: Oxford University Press., 2007.

HAMERS, M.N. et al. Complementation in monocytes hybrids revealing genetic heterogeneity in chronic granulomatous disease. **Nature**, v. 307, p.553-555, 1984.

HAMPTON MB, KETTLE AJ, WINTERBOURN CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood**, v. 92, no.9, p. 3007–3017; 1998.

HANH, S. M.; MITCHELL, J. B.; SHACTER, E. Tempol inhibits neutrophil and hydrogen peroxide-mediated DNA damage. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 38, p. 879-884, 1997.

HARPER, A.M.; CHAPLIN, M.F.; SEGAL, A.W. Cytochrome b-245 from human neutrophils is a glycoprotein. **Biochem. J.** v. 227, p.783-788, 1985.

HATANO K, MORISHITA Y, NAKAI T, IKEDA F.. Antifungal mechanism of FK463 against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **J Antibiot**, Tokyo, v. 55, p. 219-222; 2002.

HIRAN TS, MOULTON PJ, HANCOCK JT. In situ detection of superoxide anions within porcine articular cartilage. **British Journal of Biomedical Science**, v. 55, no. 3, pp. 199–203; 1998.

HOFFMAN, A. et al. Effect of nitric oxide and nitroxide SOD-mimic on the recovery of isolated rat heart following ischemia and reperfusion. **Biochem. Pharmacol.**, v. 66, p. 1279-1286, 2003.

HOSSEINZADEH, A.; MESSER, P. K.; URBAN, C. F. Stable Redox-Cycling Nitroxide Tempol Inhibits NET Formation. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 391; 2012.

HURST, N.P. Molecular basis of activation and regulation of the phagocyte respiratory burst. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 46, p. 265–272; 1987.

ISOGAI, Y.; IZUKA, T.; SHIRO, Y. The mechanism of electron donation to molecular oxygen by phagocytic cytochrome b558. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 7853-7, 1995.

ISRAELI, A., et al. Kinetics and mechanism of the comproportionation reaction between oxoammonium cation and the hydroxylamine derived from cyclic nitroxides. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 38, p. 317-324, 2005.

JESAITIS, A.J. et al. **The Molecular Basis of Oxidative Damage by Leukocytes**. A.J., Dratz E.A. (Ed) Montana: Big Sky, 1991.

JIANG F., ZHANG, Y., DUSTING G.J. NADPH Oxidase-Mediated Redox Signaling: Roles in Cellular Stress Response, Stress Tolerance, and Tissue Repair. **Pharmacol. Rev.**, v. 63, p. 218–242; 2011.

JONES, R.D. HANCOCK, J.T.; MORICE A.H. NADPH oxidase: a universal oxygen sensor. **Free Radic Biol. Med.**, v. 29, p. 416–424, 2000.

KASAHARA S., JHINGRAN A., DHINGRA S., SALEM A., CRAMER R.A., HOHL T.M. Role of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Signaling in Regulating Neutrophil Antifungal Activity and the Oxidative Burst During Respiratory Fungal Challenge. **J Infect Dis.** V. 213(8), p. 1289-98; 2016.

KHAN, H.A.; MUTUS, B. Protein disulfide isomerase a multifunctional protein with multiple physiological roles. **Front. Chem.**, v. 2, p. 70, 2014.

KEMMINK J. et al. Structure determination of the N-terminal thioredoxin-like domain of protein disulfide isomerase using multidimensional heteronuclear ¹³C/¹⁵N NMR spectroscopy. **Biochemistry**, v. 35, p. 7684–7691, 1996.

KEMMINK J. et al. The folding catalyst protein disulfide isomerase is constructed of active and inactive thioredoxin modules. **Curr. Biol.**, v. 7, p. 239–245, 1997.

KERSTEEN, E.A.; RAINES, R.T. Catalysis of protein folding by protein disulfide isomerase and small-molecule mimics. **Antiox. Redox Signal.**, v. 5, p. 413-424, 2003.

KHATTAB MM. TEMPOL, a membrane-permeable radical scavenger, attenuates peroxynitrite- and superoxide anion-enhanced carrageenan-induced paw edema and hyperalgesia: A key role for superoxide anion. **European Journal of Pharmacology**, v. 548, no.1-3, p. 167-173; 2006.

KIM C.H.J. et al. The nitroxide radical TEMPOL prevents obesity, hyperlipidaemia, elevation of inflammatory cytokines, and modulates atherosclerotic plaque composition in apoE (-/-) mice. **Atherosclerosis**, v. 240, no., p. 234-241; 2015.

KIM, S. et al. Neutrophil stress and apoptosis underlie myeloid dysfunction in glycogen storage disease type Ib. **Blood.**, v. 111, p. 5704-5711, 2008.

KLAPPA P., et al. The b' domain provides the principal peptide-binding site of protein disulfide isomerase but all domains contribute to binding of misfolded proteins. **EMBO J.**, v. 17, p. 927–935, 1998.

KOJDA, G.; HARRISON, D. Interactions between NO and reactive species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. **Cardiovascular Research**, v. 43, p. 562-571, 1999.

KRISHNA, M. C. et al. Modulation of streptonigrin cytotoxicity by nitroxide sod mimics. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 17, p. 379-388, 1994.

KROLL, C., LANGNER, A., BORCHERT, H. H. Nitroxide metabolism in the human keratinocyte cell line HaCaT. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 26, p. 850-857, 1999.

KUO ML, LEE KC, LIN JK, HUANG TS. Pronounced activation of protein kinase C, ornithine decarboxylase and c-jun proto-oncogene by paraquat-generated active oxygen species in WI-38 human lung cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1268, no.2, pp.229-236; 1995.

LAIGNIER, E. P. et al. Papel de radicais tiila na produção de oxidantes por macrófagos: busca de novos alvos bioquímicos para o controle do estresse oxidativo na inflamação. In: **SIMPÓSIO MINEIRO DE ESTRESSE OXIDATIVO**, 1, 2008, Alfenas. CD-ROM.

LAMBETH JD, KRAUSE KH, CLARK RA. NOX enzymes as novel targets for drug development. **Seminars in Immunopathology**, v.30, no.3, p. 339-363; 2008.

LAMBETH, J.D.; KAWAHARA, T.; DIEBOLD, B. Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 43, p. 319, 2007.

LAURINDO, F. R. et al. Novel Role of Protein Disulfide Isomerase in the Regulation of NADPH Oxidase Activity: Pathophysiological Implications in Vascular Diseases. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 10, p. 1101-1113; 2008.

LETO, T.L. et al. Cloning of a 67K neutrophil oxidase factor with similarity to a noncatalytic region of p60c-src. **Science**, v. 248, p. 727-730, 1990.

LI, X. CULLERE, X. NISHI H., SAGGU, G., DURAND E., MANSOUR M. K., TAM J.M., SONG X., LIN X., VYAS, J.M.; MAYADAS, T. PKC- δ activation in neutrophils promotes fungal clearance. **Leukoc Biol.** 2016

LIN, W.W.; KARIN, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. **J. Clin. Invest.**, v. 117, p. 1175-1183, 2007.

LINARES E., GIORGIO S., AUGUSTO O. Inhibition of in vivo leishmanicidal mechanisms by tempol: nitric oxide down-regulation and oxidant scavenging. **Free Radic Biol Med.** 44(8):1668-76; 2008.

LOMAX, K.J. et al. Recombinant 47-kD cytosol factor restores NADPH oxidase in chronic granulomatous disease. **Science**, v. 245, p. 409-412, 1989.

LUNDQVIST H, DAHLGREN C. Isoluminol-enhanced chemiluminescence: a sensitive method to study the release of superoxide anion from human neutrophils. **Free Radical Biology & Medicine**, v.20, no.6, 785-792; 1996.

MARGARITIS, A. et al. The role of protein sulfhydryl groups and protein disulfides of the platelet surface in aggregation processes involving thiol exchange reactions. **Pharmacological Research**, v. 63, p. 77-84; 2011.

METCALF JA, GALLIN JI, NAUSEEF WM, ROOT RK. **Laboratory manual of neutrophil function**. New York: Raven, p. 96-100; 1986.

MITTAL M. et al. Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. **Antioxid Redox Signal**. V. 20(7), p. 1126–1167; 2014.

MOLTENI, S.N. et al. Glutathione limits Ero1-dependent oxidation in the endoplasmic reticulum. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 32667-73, 2004.

MOREL, I. et al. Repair of oxidized DNA by flavonoid myricetin. **Methods in Enzymology**, v. 335, p. 308-316, 2001.

NIE, G. et al. Polyphenol protection of DNA against damage. **Methods in Enzymology**, v. 335, p. 232-244, 2001.

NISHIMURA, T. S., SWARTZ, H. M. Reduction of lipid-soluble nitroxides in cho cells and macrophage tumor cells. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 17, p. 473-479, 1994.

NISIMOTO, Y.; MOTALEBI, S.; HAN, C.H.; LAMBETH, J.D. The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558). **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 33, p. 2999-3005, 1999.

NOIVA, R. Protein disulfide isomerase: the multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum. **Semin. Cell Dev. Biol.**, v. 10, p. 481-93, 1999.

OHSHIMA, H. et al. Prevention of human cancer by modulation of chronic inflammatory processes. **Mutation Research**, v. 591, p. 110-122, 2005.

OHUCHI, K. et al. Preparation of immunoaffinity mini-columns for the analysis of platelet activating factor (PAF) in biological samples. **Br. J. Pharmacol.**, v. 94, p. 917, 1988.

OPRANDY, J.J., OLSON, J.G., SCOTT, T.W. A rapid dot immunoassay for the detection of serum antibodies to Eastern equine encephalomyelitis and St. Louis encephalitis viruses in sentinel chickens. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 38 (1), p. 181-186; 1988.

PARKOS, C.A. et al. Primary structure and unique expression of the 22-kilodalton light chain of human neutrophil cytochrome b. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 85, p. 3319–3323, 1988.

QUAN, H.; FAN, G.; WANG, C.C. Independence of the chaperone activity of protein disulfide isomerase from its thioredoxin-like active site. **J.Biol. Chem.**, v. 270, p. 17078-17080, 1995.

QUEIROZ R. F. et al. Nitroxides attenuate Nitroxides attenuate carrageenan-induced inflammation in rat paws by reducing neutrophil infiltration and the resulting myeloperoxidase-mediated damage. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 53, no.10, p. 1942–1953; 2012.

RAAD, H., M. H. PACLET, et al. "Regulation of the phagocyte NADPH oxidase activity: phosphorylation of gp91phox/Nox2 by protein kinase C enhances its diaphorase activity and binding to Rac2, p67phox, and p47phox." **FASEB J** 23, v.4, p. 1011-1022; 2009.

RACHECK, L.I. et al. Troglitazone, but not rosiglitazone, damage mitochondrial DNA and induces mitochondrial dysfunctions and cell death in human hepatocytes. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 240, p. 348-354, 2009.

RAIKOV, Z. D., RAIKOVA, E. T., ATANASOV, A.T. Nitric oxide and free stable nitroxyl radicals in the mechanism of biological action of the spin-labeled compounds. **Medical Hypotheses**, v. 57, p. 302-305, 2001.

RATURI, A.; MUTUS, B. Characterization of redox state and reductase activity of protein disulfide isomerase under different redox environments using a sensitive fluorescent assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 43, p. 62-70; 2007.

RIBEIRO, S. M. R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Journal of Biosciences**, v. 21, p. 133-149, 2005.

ROYER-POKORA, B. et al. Cloning the gene for an inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location. **Nature**, v. 322, p. 32-38, 1986.

RUBIN, E. et al. **Patologia: bases clinicopatológicas da medicina**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SAMUNI, A. et al. Kinetics and Mechanism of Hydroxyl Radical and OH-Adduct Radical Reactions with Nitroxides and with Their Hydroxylamine's. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, p. 8719-8724, 2002.

SAMUNI, A. M. et al. Cellular sites of H₂O₂-induced damage and their protection by nitroxides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1525, p. 70-76, 2001.

SAMUNI, A. M.; BARENHOLZ, Y. Site-activity relationship of nitroxide radical's antioxidative effect. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 34. p. 177-185; 2003.

SANTOS G.B., CERDEIRA C.D., BRIGAGAO M.R.P.L. Inhibitors of the NAD(P)H Oxidase Complex: Implications for Control of Oxidative Stressrelated Diseases. **Journal of Pharmaceutical Biology**, v. 6(1), p. 40-53; 2016.

SCHETTER, A. J.; HEEGAARD, N. H.; HARRIS, C. C. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. **Carcinogenesis**, v. 31, p. 37-49, 2010.

SEGAL, A.W. The function of the NADPH oxidase of phagocytes and its relationship to other NOXs in plants, invertebrates, and mammals. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 40, p. 604-618, 2008.

SEGAL, B.H. et al. Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. **Medicine**, v. 79, p. 170-200, 2000.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 27, p. 916-921, 1999.

SOBOLEWSKI C, LEGRAND N, MORCEAU F, DIEDERICH M. Inflammation: novel arrows for an ancient target. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, no.12 , p. 1769-1770; 2010.

SOULE, B. P. et al. The chemistry and biology of nitroxide compounds. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 42, p. 1632-1650, 2007.

SUMIMOTO, H.; MIYANO, K.; TAKEYA, R. Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 338, p. 677-86, 2005.

SUSANNAH E. et al. Protein disulfide-isomerase mediates delivery of nitric oxide redox derivatives into platelets. **Biochem. J.**, v. 403, p. 283–288, 2007.

TEAHAN, C. et al. The X-linked chronic granulomatous disease gene codes for the β -chain of cytochrome b245. **Nature**, v. 327, p. 720-721, 1987.

TEAHAN, C.G. et al. Purification of the 47 kDa phosphoprotein associated with the NADPH oxidase of human neutrophils. **Biochem. J.**, v. 267, p. 485-489, 1990.

TEKE, Z. et al. Effects of Tempol, a Membrane-Permeable Radical Scavenger, on Local and Remote Organ Injuries Caused by Intestinal Ischemia/Reperfusion in Rats. **The Journal of Surgical Research**, v. 149, p. 259-27; 2008.

THALER S. et al. Neuroprotective effects of tempol on retinal ganglion cells in a partial optic nerve crush rat model with and without iron load. **Experimental Eye Research**, v. 90, no.2, p. 254-260; 2010.

TIMONER, B.E. et al. Efeito do nitróxido Ac-Tempo sobre o burst respiratório e S-glutinação de proteínas de macrófagos. In: **SIMPÓSIO MINEIRO DE ESTRESSE OXIDATIVO**, 1, 2008, Alfenas. CD-ROM.

TSUHAKO M. H. et al. Tempol ameliorates murine viral encephalomyelitis by preserving the blood–brain barrier, reducing viral load, and lessening inflammation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 48, no.5, 704-712; 2010.

UNDERHILL DM, OZINSKY A. **Phagocytosis of microbes: complexity in action**. V. 20, p. 825-52; 2002.

VOLPP, B.D. et al. Cloning of the cDNA and functional expression of the 47-kilodalton cytosolic component of human neutrophil respiratory burst oxidase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 7195-7199, 1989.

VOROBEVA NV1, PINEGIN BV2. Effects of the antioxidants Trolox, Tiron and Tempol on neutrophil extracellular trap formation. **Immunobiology**. v. 221(2), p. 208-19; 2016.

WALKER, K.W., LYLES M.M., GILBERT H.F. Catalysis of oxidative protein folding by mutants of protein disulfide isomerase with a single active-site cysteine. **Biochem.**, v. 35, p. 1972-1980, 1996.

WANG, G. et al. Opposing effects of nitroxide free radicals in Escherichia coli mutants deficient in DNA repair. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1305, p. 71-78, 1996.

WEISBART, R.H. An antibody that binds a neutrophil membrane protein, ERp72, primes human neutrophils for enhanced oxidative metabolism in response to formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. Implications for ERp72 in the signal transduction pathway for neutrophil priming. **The Journal of Immunology**, v. 148, p. 3958-3963, 1992.

WIENJES, F.B.; SEGAL, A.W. NADPH oxidase and the respiratory burst. **Cell biology**, v. 6, p. 357-365, 1995.

WILCOX, C. S.; PEARLMAN, A. Chemistry and Antihypertensive Effects of Tempol and Other Nitroxides. **Pharmacological Reviews**, v. 60, p. 418-469; 2008.

WILKINSON, B.; GILBERT, H. F. Protein disulfide isomerase. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1699, p. 35-44; 2004.

XIAO, R. et al. Combinations of protein-disulfide isomerase domains show that there is little correlation between isomerase activity and wildtype growth, **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 27975-27980, 2001.

YAMAGUCHI, T. et al. Purification and some properties of the small subunit of cytochrome b558 from human neutrophils. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 112-118, 1989.

ZAMIR, E. et al. Nitroxide stable radical suppresses autoimmune uveitis in rats. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 27, p. 7-15, 1999.

ZHANG Z. et al. ANG II signaling in vasa recta pericytes by PKC and reactive oxygen species. **American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology**, v. 287, no.2, H773-H781; 2004.

ZHANG, R.; GOLDSTEIN, S.; SAMUNI, A. Kinetics of superoxide-induced exchange among nitroxide antioxidants and their oxidized and reduced forms. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 26, p. 1245-1252, 1999.

ZHUKOV, A.; INGELMAN-SUNDBERG, M. Relationship between cytochrome P450 catalytic cycling and stability: fast degradation of ethanol- inducible cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in hepatoma cells reductase. **Biochem. J.**, v. 340, p. 453– 458, 1999.

ZHUKOV, A.A.; ARCHAKOV, A.I. Complete stoichiometry of free NADPH oxidation in liver microsomes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 109, p. 813– 818, 1982.

ANEXOS

ANEXO A – Protocolo de aprovação do comitê de ética

ANEXO B - Peptídeos da PDI recombinante após tripsinização

Mascot Search Results: PDIA1_HUMAN - Windows Internet Explorer

http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=...%2Fdata%2F20141230%2F77g5eev5.dat_mscoreflags=3130_mscoreflag2=266;ave_thresh=44;db_id=1;hit=PDIA1_HUMAN;px=1;sessionID=guest_guestsession

Mascot Search Results: PDIA1_HUMAN

MATRIX SCIENCE MASCOT Search Results

Protein View: PDIA1_HUMAN

Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens GN=P4HB PE=1 SV=3

Database: SwissProt
 Score: 947
 Nominal mass (M_r): 57081
 Calculated pI: 4.76
 Taxonomy: [Homo sapiens](#)

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of PDIA1_HUMAN against nr](#).

Search parameters

MS data file: maa0746.cmp
 Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.

Protein sequence coverage: 81%

Matched peptides shown in **bold red**.

```

1 MLRRALLGLA VAAVVRADAF EEDRHVIVLR KSNFARALAA HKYLLVEFIA
51 FWCGRKALA FEYAKRAGKL EGAGSRIRLA KVDATPESDL AQGVVGRVYF
101 TIKFFRNGDT ASPKRYTAGR EADDIVNMLK KRTGPAATTL PDGAAARSIV
151 ESSEVAVIQF FKDVRSDSAR QPLQAARALD DIPPQITSNS DVFSYQLDK
201 DQVIVLEKFD EGSNVESEV TENLLDFIR HNQLDVIIE TQQTAKIFG
251 GEIKTHLLLF LFKSVSDIDG KLSNFKTAAR SPKGIILFIP IDSDHTDWR
301 IIEFFPLKQK ECPAVRLITL EEMTKYKPE SESLTAERIT EPCRFLEGR
351 IKPHLSQEL PEWDKQPVK VLVGKPFEDV AFDEKKNVY EYFAWCGRC
401 RQLAPMDKL GETYDRENI VIAADSTAN EVAVKVHSP PTLKFFPASA
451 DRYVIDYNGE RTLDGFKKFL ESGGQDAGD DQDLEDLEA EEPDMERDDQ
501 QWAVTDEL

```

Unformatted sequence string: **508 residues** (for pasting into other applications).

Sort peptides by Residue Number Increasing Mass Decreasing Mass

Show predicted peptides also

Query	Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calo)	Delta M Score	Expect	Rank	U	Peptide	
#645	31 - 42	429.6123	1285.8150	1285.6778	0.1371	1	50	0.0013	1	U R. KSNFARALAAHK .Y
#579	32 - 42	1158.6466	1157.6393	1157.5829	0.0565	0	36	0.023	1	U K.SNFARALAAHK .Y
#580	32 - 42	579.8410	1157.6674	1157.5829	0.0846	0	75	1.9e-05	1	U K.SNFARALAAHK .Y
#444	58 - 65	862.3911	861.3839	861.4596	-0.0757	0	26	0.97	2	U K.ALAPYAK .A
#445	58 - 65	431.8705	861.7264	861.4596	0.2668	0	29	0.14	1	U K.ALAPYAK .A
#548	70 - 78	501.8136	1001.6127	1001.5505	0.0622	1	46	0.038	1	U K.LKAGSRIR.L

Internet | Protected Mode: Off

3:59 PM
12/30/2014

Fonte: Da Autora

ANEXO C - Peptídeos da PDI recombinante após tratamento com maleimida e tripsinização

MASCOT Search Results
Protein View: PDIA1_HUMAN
 Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens GN=P4HB PE=1 SV=3

Database: SwissProt
 Score: 830
 Nominal mass (M_r): 57081
 Calculated pI: 4.76
 Taxonomy: [Homo sapiens](#)

Sequence similarity is available as an [NCBI BLAST search of PDIA1_HUMAN against nr](#).

Search parameters
 MS data file: masFDF7.tmp
 Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.

Protein sequence coverage: 68%
 Matched peptides shown in **bold red**.

```

1 MLRRALLCIA VAALVRADAP EEDDHVIVLR KSNFAEALAA HRYLLIVEFYA
51 FWCGRCKALA PEYAKRAGKL KAGSEIRLRL KVDATRESDL AQQGVGRVGF
101 TIKFFRNGDT ASPEYTAGR EADDIVNMLR KFTGPAATLL EDGAAARSILV
151 ESSEVAVIQF FQVRESDSAR QPLQAAEALD DIFPGITSNL DVPSYQLDR
201 DGVVLFKRFD EGRNMFGEV TRHNLLDFIR HMQLLPVIIE TEQTAKPIFG
251 GRIKTEILLF LPKSVSDYDG KLSNFKYAR SFKGRILFIP IDSDHTDNR
301 ILEFPGLKKE ECFAVRLIYL EEMTKYKRF SEELTAERIT EFCRFLGKR
351 IKPHLMSQEL PEDWDQFVR VLWGRNFEV AFDEKKNVVF EFYAFWCGRC
401 EQLAPINDKL GETYDRENI VIAMDSTAN EVDKVVNSP PTLKFFPASA
451 DRYVIDYNGE RTLDGFEFL ESQQQGAGD DDDLEDLEA EEPMEEDDD
501 QAVVDEEL
    
```

Unformatted sequence string: **508 residues** (for pasting into other applications).

Sort peptides by Residue Number Increasing Mass Decreasing Mass

Show predicted peptides also

Query	Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta M	Score	Expect	Rank	U	Peptide
295	58 - 65	862.4739	861.4667	861.4596	0.0071	0	19	1.4	4	K.ALAPEYAK.A
296	58 - 65	862.4874	861.4802	861.4596	0.0206	0	28	0.13	1	K.ALAPEYAK.A
297	58 - 65	431.8031	861.5916	861.4596	0.1320	0	46	0.021	1	K.ALAPEYAK.A
390	70 - 78	501.8373	1001.6600	1001.5505	0.1095	1	38	0.12	1	K.LKAGSEIR.L
391	70 - 78	501.8524	1001.6902	1001.5505	0.1397	1	26	1	5	K.LKAGSEIR.L
392	70 - 78	501.9931	1001.9717	1001.5505	0.4212	1	36	0.14	1	K.LKAGSEIR.L

Fonte: Da Autora

ANEXO D - Peptídeos da PDI recombinante após tratamento com Tempol e tripsinização

Mascot Search Results: PDIA1_HUMAN - Windows Internet Explorer

http://www.matrixscience.com/cgi/protein_view.pl?file=...%2Fdata%2F20141231%2F2FTTgpinTR.dat_mscresflag=3138_mscresflag=266;ave_thresh=44;db_idx=1;hit=PDIA1_HUMAN;p=1;sessionID=guest_session

Mascot Search Results: PDIA1_HUMAN

MATRIX SCIENCE MASCOT Search Results

Protein View: PDIA1_HUMAN

Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens GN=P4HB PE=1 SV=3

Database: SwissProt
 Score: 818
 Nominal mass (M_n): 57081
 Calculated pI: 4.76
 Taxonomy: [Homo sapiens](#)

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of PDIA1_HUMAN against nr](#).

Search parameters

MS data file: mas385F.tmp
 Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.

Protein sequence coverage: 68%

Matched peptides shown in **bold red**.

```

1 MLRRALLCLA VVALVRADAP EEDHVLVLR KSNFABALAA HKYLIVEFYA
51 FWGCHCRALA PEYAKAAGKL KAGOSEIRLA KVDATBESDL AQQYGVGVYF
101 TIKFFRMGDT ASPEEYTAGR EADDIVMLK KRTGPAATTL PDGAAARSLV
151 ESSEVAVIGF EKDVESDSAK QFLQAABAD DIRPGITSNS DVESKYLDR
201 DGVVLEKFFD EGRNVEGEV TKNLLDFIK HNLPLVIEF TEQTAPKIFG
251 GEIKTHILLP LPKSVSDYDG KLSNFKAAE SFRGKILFIP IDSDHYDQQR
301 ILEPFGKKE ECFARVLTIL EEMTKYKPE SEBLTAERIT EFCRFLIEGK
351 IKPHLSQEL PEDWDKQPVK VLVGKNFEDV APEDEKQVVF EFYAFWCGHC
401 KQLAPIMDKL GETYKDEHNI VIARDSTAN EYEAVKVHSF PTLKFFPASA
451 DRTVIDYNGE RFLDGFKKFL ESGGQDAGD DDDLEDLEA EEPOMEEDDD
501 QKAVKDEL

```

Unformatted sequence string: [508 residues](#) (for pasting into other applications).

Sort peptides by Residue Number Increasing Mass Decreasing Mass

Show predicted peptides also

Query	Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	M	Score	Expect	Rank	U	Peptide
#697	31 - 42	429.6705	1285.9897	1285.6778	0.3119	1	45	0.004	1	U	R.KSNFABALAAHK.Y
#637	32 - 42	579.8311	1157.6476	1157.5829	-0.0647	0	72	2.3e-05	1	U	K.SNFABALAAHK.Y
#511	58 - 65	431.2543	860.4939	861.4596	-0.9656	0	44	0.024	1	U	K.ALAPYAK.A
#514	58 - 65	862.3919	861.3847	861.4596	-0.0749	0	23	0.43	1	U	K.ALAPYAK.A
#602	70 - 78	501.8274	1001.6402	1001.5505	0.0897	1	44	0.054	1	U	K.LKAGSEIR.L
#813	82 - 97	890.8769	1779.7393	1779.8275	-0.0882	0	90	1.2e-07	1	U	K.VDATBESDLAQQYGVYR.G

Done

Internet | Protected Mode: Off

11:27 AM
12/31/2014

Fonte: Da Autora

ANEXO E - Peptídeos da PDI recombinante após tratamento com Tempol e Maleimida seguido de tripsinização

MASCOT Search Results
Protein View: PDIA1_HUMAN
 Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens GN=P4HB PE=1 SV=3

Database: SwissProt
Score: 828
Nominal mass (M_r): 57081
Calculated pI: 4.76
Taxonomy: [Homo sapiens](#)

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of PDIA1_HUMAN against nr](#).

Search parameters
MS data file: mas528E.tmp
Enzyme: Trypsin; cuts C-term side of KR unless next residue is P.
Variable modifications: [maleimide \(C\)](#)

Protein sequence coverage: 68%
 Matched peptides shown in **bold red**.

1 MRRRLICGLA VAAIVRADAP EEEEDVVLIR ESNFAEALAA HTYLLVEFYA
 51 FWCGRCKALA **PEYAGAGLK** **K**ABGSEIRLA RVDATRESDL AQQYGRVYFP
 101 IIEFFRNGDT **ASPEEYTAGR** **R**ADDIVNMLK RRTQGAATLL PDGAAAESIV
 151 **ESSEAVVIGP** **PEQVSDGAK** **Q**FLQAABAD DIPPGLTNSN DVFSKYQLDK
 201 DGVVLPKRFQ EGRNHEGEVY **T**ENLLDFIK HNLPLVIEF TQQTARKIPG
 251 **GRITHEILLP** **L**PKSVSDYDQ **K**LSNFKTAAE **S**FRGKILFIF IDSDHTDWR
 301 **ILFFPLKQKE** **E**CPAVRLIYL **E**EDMTKRFPE **S**BELTARRIT EFCRFLLEGK
 351 IEPHLSQDEL **PEMDRQEVK** **V**LVGNRFQDV **A**FDERRVRFV EYFAFWGHC
 401 **FQLAPINDKL** **G**RTYDQHEMT **V**LARDSTAN **R**YBAVKVRSF **P**TLKFFPASA
 451 **DRTVIDVNGE** **R**YLDGPKKPL **E**SGQDQAGD **D**DDLELEEA **E**EPQMEEDDD
 501 **Q**AVYDEEL

Unformatted sequence string: [508 residues](#) (for pasting into other applications).

Sort peptides by Residue Number Increasing Mass Decreasing Mass

Show predicted peptides also

Query	Start - End	Observed	Mr (exp't)	Mr (calc)	Delta M Score	Expect	Rank	U	Peptide	
#300	58 - 65	862.4739	861.4667	861.4596	0.0071	0	19	1.4	4	V K.ALAFFETAK.A
#301	58 - 65	862.4874	861.4802	861.4596	0.0206	0	29	0.13	1	V K.ALAFFETAK.A
#302	58 - 65	431.8031	861.5916	861.4596	0.1320	0	46	0.021	1	V K.ALAFFETAK.A
#395	70 - 78	501.8373	1001.6600	1001.5505	0.1095	1	38	0.12	1	V K.LKABGSEIR.L
#396	70 - 78	501.8524	1001.6902	1001.5505	0.1397	1	26	1	6	V K.LKABGSEIR.L

Fonte: Da Autora