



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

“Mecanismos e a influência de ferro lábil em processos nitrosativos intracelulares utilizando o indicador fluorescente 4,5 diamino fluoresceína”

Fernando Cruvinel Damasceno

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

RIBEIRÃO PRETO -SP

2015

FERNANDO CRUVINEL DAMASCENO

“Mecanismos e a influência de ferro lábil em processos nitrosativos intracelulares utilizando o indicador fluorescente 4,5 diamino fluoresceína”

VERSÃO CORRIGIDA

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

Área: Química

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Toledo Júnior

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

RIBEIRÃO PRETO -SP

2015

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

## FICHA CATALOGRÁFICA

Damasceno, Fernando Cruvinel

Mecanismos e a influência do ferro lábil em processos nitrosativos intracelulares utilizando o indicador fluorescente 4,5 diamino fluoresceína. Ribeirão Preto, 2015.

158 p.: il. ; 30 cm

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: química

Nome: DAMASCENO, Fernando Cruvinel

Título: “Mecanismos e a influência de ferro lábil em processos nitrosativos intracelulares utilizando o indicador fluorescente 4,5 diamino fluoresceína”

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## *Dedicatória*

*Dedico este trabalho à minha família,  
aos meus amigos, e a todas as pessoas  
que se recusam a entregar este mundo  
aos saqueadores.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. José Carlos Toledo Junior, pela oportunidade, paciência, auxílio, por tudo que me ensinou e, principalmente, por ter me apresentado a química e a pesquisa sob uma nova perspectiva.

À minha família por todo apoio e incentivo ao longo desta jornada.

À Fran, pelo companheirismo, paciência e por toda ajuda concedida nesta etapa final.

Aos meus colegas Rômulo, Thalita, Fernando, Carol, Angélica e André por toda ajuda que deram na execução do trabalho e por dividirem comigo a responsabilidade fastidiosa de cuidar das culturas de células nos finais de semana e nos feriados.

Às colegas, Caroline, Cristina, Dayane, Fernanda, Giuliana, Laura e Roberta, pela amizade, pelo convívio prazeroso e claro, por terem organizado festas e me suportado em estado de consciência alterado.

À professora Dr.<sup>a</sup> Maria Lúcia Arruda de Moura Campos

A todos os docentes, técnicos e funcionários do Departamento de Química que tornaram possível a realização do trabalho.

À FAPESP pelo financiamento do projeto de pesquisa

À CAPES pela bolsa concedida

À Universidade de São Paulo.

“Não deixe sua chama se apagar com a  
indiferença.  
Nos pântanos desesperançosos do ainda, do  
agora não.  
Não permita que o herói na sua alma padeça  
frustrado e solitário com a vida que ele  
merecia, mas nunca foi capaz de alcançar.  
Podemos alcançar o mundo que desejamos.  
Ele existe.  
É real.  
É possível.  
É seu.”

Ayn Rand

## RESUMO

DAMASCENO, F. C. **Mecanismos e a influência de ferro lábil em processos nitrosativos intracelulares utilizando o indicador fluorescente 4,5 diamino fluoresceína**. 2015. 156 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Neste trabalho foram investigados os mecanismos e o perfil cinético de processos nitrosativos do ponto de vista da nitrosação do indicador 4,5-diamino fluoresceína (DAF2) em células do tipo RAW 264.7. Também foi investigado o papel que ferro lábil (LIP) exerce em tais processos. O estudo cinético mostrou que a nitrosação do DAF2 é dependente de superóxido intracelular e se processa por dois mecanismos distintos denominados nitrosilação oxidativa e nitrosação. Observou-se que o perfil cinético da nitrosação do DAF2 sofre uma transição passando de dependente para independente com relação à concentração de  $\bullet\text{NO}$ , quando a concentração de  $\bullet\text{NO}$  se aproxima de 100-110nM. Este perfil está relacionado com a dinâmica de recombinação entre  $\bullet\text{NO}$  e  $\text{O}_2^{\bullet-}$  que dispara todo o processo de nitrosação do DAF2. No trabalho fica claro que processos nitrosativos que ocorrem pelos mesmos mecanismos podem apresentar perfis cinéticos completamente diferentes dependendo da localização onde ocorre a recombinação entre  $\bullet\text{NO}$  e  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . O ponto mais interessante foi a constatação de que quelantes permeáveis à membranas biológicas estimulam a nitrosação do DAF2 intracelular. Este efeito é decorrente da remoção de LIP intracelular que, surpreendentemente, apresenta papel antinitrosativo nas condições experimentais estudadas. O papel incomum antinitrosativo apresentado por LIP é analisado do ponto de vista da reação entre LIP e  $\text{ONOO}^-$  que tem como produto nitrito, uma espécie não nitrosante. Estes resultados podem alterar a forma como LIP é visto em processos oxidativos e nitrosativos.

Palavras-chave: Óxido nítrico, nitrosação, células RAW 264.7, ferro lábil, peroxinitrito, nitrosilação oxidativa



## ABSTRACT

DAMASCENO, F.C. **Mechanisms and the role of labile iron pool in intracellular nitrosative processes using 4,5 diaminofluorescein as a probe.** 2015. 156 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

In this work, we investigated the mechanisms and kinetic profiles of nitrosative processes using fluorescent indicator 4,5-diaminofluorescein (DAF2) in RAW 264.7 cells. The labile iron pool (LIP) influence in nitrosative processes was also evaluated. Intracellular DAF2 nitrosation is superoxide dependent and proceeds by two distinct mechanisms: Oxidative nitrosylation and nitrosation. The former mechanism is the most relevant under all experimental conditions tested. Interestingly, the DAF2 nitrosation rate increases linearly with  $\bullet\text{NO}$  concentration of up 100-110 nM but thereafter undergoes a sharp transition and becomes insensitive to  $\bullet\text{NO}$ . This peculiar kinetic behavior has never been reported and it is linked with  $\bullet\text{NO}$  and superoxide recombination dynamics. When  $\bullet\text{NO}$  reaches a concentration capable to outcompete superoxide dismutase for superoxide, the rate of DAF2 nitrosation becomes insensitive to  $\bullet\text{NO}$ . The most striking finding is the LIP's influence in nitrosative processes. LIP removal by cell membrane permeable metal chelators increases DAF2 nitrosation rate significantly, suggesting that LIP can act as an anti-nitrosant species. This increase is probably related with LIP's direct reaction with peroxynitrite, which produces non-nitrosant species like nitrite. This controversial LIP's anti-nitrosative role in cellular systems is rather interesting since it can change the way we understand its role in nitrosative and oxidative processes.

Keywords: Nitric Oxide, Labile iron pool, peroxynitrite, superoxide, nitrosation, oxidative nitrosylation, RAW 264.7 cells.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diagrama qualitativo de orbitais moleculares da molécula de óxido nítrico.....	18
Figura 2 – mecanismo de produção de •NO, a partir de L-arginina.....	26
Figura 3 – Estrutura do DAF2-DA e conversão a DAFT .....	35
Figura 4 – Avaliação do número de células para realização dos ensaios de fluorescência .....	56
Figura 5 – Variação da taxa de aumento de fluorescência em células tratadas com diferentes concentrações de DAF2-DA .....	57
Figura 6 – Variação da fluorescência em função da concentração de sper/NO.....	58
Figura 7: Concentração de •NO no estado estacionário para diferentes concentrações de sper/NO.....	61
Figura 8 – Dependência da formação de DAFT com a concentração de oxigênio e consumo celular de O <sub>2</sub> .....	64
Figura 9 – A formação de DAFT depende da concentração intracelular de superóxido .....	68
Figura 10 – Efeito de captadores ( <i>scavengers</i> ) de peroxinitrito na taxa de formação de DAFT.....	70
Figura 11 – Efeito do aumento da concentração de CO <sub>2</sub> na taxa de formação de DAFT.....	72
Figura 12 – Efeito de captadores de radicais livres extracelulares na formação de DAFT .....	74
Figura 13 – Efeito da alteração de antioxidantes endógenos na formação de DAFT.....	77
Figura 14 – A formação de DAFT em células ativadas e efeito da antioxidantes na formação s-nitrosotiois.....	78
Figura 15 – Esquema para formação de DAFT intracelular .....	83
Figura 16 – Determinação da estequiometria do complexo Fe[(SIH) <sub>2</sub> ] e estrutura do ligante e do complexo .....	92
Figura 17 – Efeito da remoção de ferro quelatável na taxa de formação de DAFT.....	93
Figura 18 – Utilização de 2,2 bipirdinina (BIPY) como quelante intracelular.....	95
Figura 19 – Saturação do efeito do SIH na taxa de formação de DAFT.....	96

Figura 20 – Influência do SIH na formação de DAFT em células tratadas com PEG-SOD por 24 horas .....	97
Figura 21 – Efeito do SIH na formação de DAFT em condições de hipóxia.....	98
Figura 22 – Efeito de SIH na presença de antioxidantes .....	99
Figura 23 – Influência do aumento da concentração de CO <sub>2</sub> na taxa de formação de DAFT na presença e na ausência de SIH .....	100
Figura 24 – Espectro de fluorescência do DAF2 na presença de Fe <sup>2+</sup> (50µM) e do complexo [Fe(SIH) <sub>2</sub> ].....	102
Figura 25 – Efeito da presença de Fe <sup>2+</sup> e do complexo [Fe(SIH) <sub>2</sub> ] na fluorescência de DAFT .....	103
Figura 26 – Variação da concentração de [NO] <sub>est</sub> na presença de SIH .....	104
Figura 27 – Redução de citocromo c férrico na presença de [Fe(SIH) <sub>2</sub> ].....	105
Figura 28 – Oxidação de DHE na presença e ausência de SIH .....	107
Figura 29 – Efeito de captadores de peroxinitrito na formação de DAFT na presença e ausência de SIH.....	109
Figura 30 – Efeito da remoção de peroxinitrito com ebselen .....	110
Figura 31 – Ação de boronatos na taxa de formação de DAFT na presença e na ausência de SIH .....	111
Figura 32 – Aceleração da nitroação de DAF-2 promovida por SIH em condições onde há fluxo de ONOO .....	115
Figura 33 – O efeito do SIH é dependente da presença de células.....	117
Figura 34 – LIP protege citocromo C de ser oxidado por outras espécies.....	118

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP-----	Trifosfato de adenosina
BIPY-----	2,2 Bipyridina
BSO-----	Butionina Sulfoximina
cAMP-----	Monofosfato cíclico de adenosina
CC-----	Componentes celulares
Ccox-----	citocromo C oxidase (Ccox)
CCoxid-----	Componentes celulares oxidados
cGMP-----	monofosfato cíclico de guanosina
DAF2-----	4,5 diamino fluoresceína
DAF2-DA-----	4,5 diamino fluoresceína diacetato
DAFT-----	4,5 diamino fluoresceína triazol
DHE-----	Dihidroetídio
DMNQ-----	2,3-dimetoxi-1,4-naftoquinona
DMSO-----	Dimetil sulfóxido
DNIC-----	Complexos de ferro dinitrisosilo
E+-----	Etídio
FCN-----	Hexacianoferrato de potássio
FDRE-----	Fator de relaxamento derivado do endotélio
GSH-----	Glutathione
GTP-----	Trifosfato de Guanosina
HbO <sub>2</sub> -----	Oxi-hemoglobina
LIP-----	Ferro lábil ( <i>labile iron pool</i> )
LPS-----	Lipopolisacarídeo de <i>Escherichia Coli</i> 0111:B4
NEM-----	N-etil maleimida
NHE-----	Eletrodo normal de hidrogênio

NOS-----Óxido nítrico sintase  
[NO]<sub>est</sub> -----Concentração de •NO no estado estacionário  
PBS-----Tampão de fosfato salino  
PEG-SOD-----Polietilenoglicol superóxido dismutase  
proli/NO-----1-(hidroxi-NNO-azoxi)-L-prolinato de dissódio  
PSH-----Proteína genérica com destaque para um grupo tiol  
PSNO-----Proteína genérica s-nitrosilada  
RNS-----Espécies reativas de nitrogênio  
RSO-----Espécies reativas de oxigênio  
RPE-----Ressonância paramagnética eletrônica  
sGC-----Guanilato ciclase solúvel  
SOD-----Superóxido dismutase  
sper/NO----- (N-[4-[1-(3-aminopropil)-2-hidroxi-2-itosohidrazino]butil-1,3-  
propanodiamina)  
X-----Xantina  
XO-----Xantina Oxidase

## Sumário

Universidade de São Paulo .....	1
1. Introdução .....	16
1.1. Óxido nítrico: Propriedades Básicas.....	17
1.2. Óxido nítrico: Reatividade .....	19
1.3. Síntese endógena de •NO .....	25
1.4. Óxido nítrico: Mecanismo de sinalização e funções fisiológicas.....	28
1.5. Óxido nítrico: s-nitrosação .....	30
1.6. Mecanismos conhecidos de formação de s-nitrosotióis.....	32
1.7. Estudos de processos nitrosilativos utilizando indicadores fluorescentes. ....	34
2. Objetivo e Justificativa .....	38
3. Parte experimental.....	40
3.1. Reagentes e soluções .....	41
3.2. Cultura de células .....	41
3.3. Doadores de óxido-nítrico Spermine NONOate (sper/NO) e Proli NONOate (proli/NO) .....	42
3.4. Tratamento das células com 4,5 diamino fluoresceína diacetato (DAF2-DA) .....	43
3.5. Experimentos de fluorescência .....	43
3.6. Fluorescência de amostras tratadas com DAF2-DA .....	44
3.7. Análise cinética de nitrosação de DAF2 .....	45
3.8. Estudos de fluorescência de DAF2 e DAFT .....	45
3.9. Fluorescência do 2-hidroxi etídio (2-OH-E) <sup>+</sup> .....	46
3.10. Oxidação do ácido cumarino-7-borônico (CBA) por peroxinitrito .....	46
3.11. Síntese do complexo [Fe(SIH) <sub>2</sub> ] .....	47
3.12. Quantificação de s-nitrosotiol total .....	47
3.13. Determinação do teor proteico total .....	48
3.14. Acompanhamento amperométrico das concentrações de O <sub>2</sub> e •NO.....	49
3.15. Oxidação de citocromo C por peroxinitrito.....	49
3.16. Espectroscopia na região UV-VIS. ....	50
4. Resultados e discussão.....	51
4.1. Parte I – Mecanismos de nitrosação de DAF2 intracelular a partir de •NO livre. ....	52
4.1.1. Modelo de estudo .....	52
4.1.2. Estabelecimento de condições experimentais.....	53
4.1.3. Cinética de formação de DAFT intracelular em função da concentração de DAF2 .....	57
4.1.4. Cinética de formação de DAFT intracelular em função da concentração de •NO.....	58

4.1.5.	Formação de DAFT é dependente de superóxido.....	62
4.1.6.	O envolvimento de peroxinitrito na formação de DAFT.....	68
4.1.7.	Efeito de captadores de radicais e de espécies nitrosantes.....	73
4.1.8.	Formação de DAFT em diferentes condições de estresse oxidativo.....	76
4.1.9.	Formação de DAFT em células ativadas com LPS e formação de s-nitrosotiol.....	77
4.1.10.	Discussão – Parte I.....	80
4.2.	Parte II: Influência do ferro quelatável em processos nitrosativos.....	90
4.2.1.	Adição de quelantes aumenta a taxa de formação de DAFT.....	91
4.2.2.	LIP não introduz um novo mecanismo de nitrosação de DAF2.....	96
4.2.3.	Hipóteses para a aceleração de formação de DAFT na presença de quelantes.....	101
4.2.4.	Avaliação da reação entre LIP e peroxinitrito: Experimentos com competidores.....	108
4.2.5.	LIP previne processos nitrosativos em condições de <i>stress</i> ?.....	114
4.2.6.	O efeito de SIH é dependente de células?.....	116
4.2.7.	LIP, um possível agente antioxidante?.....	117
4.2.8.	Discussão – Parte II.....	119
5.	Conclusão.....	128
6.	Referências Bibliográficas.....	131
	Apêndice.....	150
	Cinética de formação de DAFT.....	151

# 1. Introdução

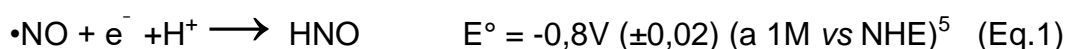


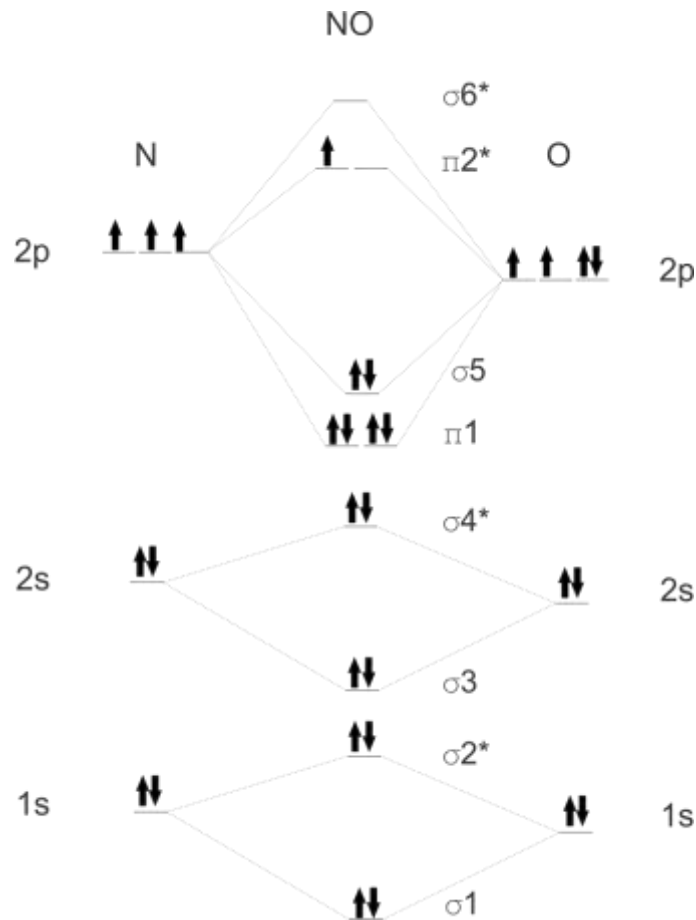
## 1.1. Óxido nítrico: Propriedades Básicas

Monóxido de nitrogênio (óxido nítrico, •NO) é uma molécula inorgânica diatômica, descoberta em 1772 por Joseph Priestly<sup>1</sup>. É um gás incolor com ponto de fusão de -163° C e ponto de ebulição -151,8°C a 1atm e solubilidade em água próxima à do gás oxigênio, entre 2-3 mM,<sup>2;3</sup>.

A análise do diagrama qualitativo de orbitais moleculares da molécula de •NO (Figura 1) revela características que explicam várias importantes propriedades químicas. Os dois orbitais moleculares de mais baixa energia  $\sigma_1$  e  $\sigma_2^*$  são pouco relevantes. Os orbitais ligantes  $\sigma_3$ ,  $\pi_1$  e  $\pi_2$  e o orbital antiligante  $\pi_2^*$  contribuem efetivamente para a ligação entre os átomos de nitrogênio e oxigênio. Formalmente, •NO apresenta ordem de ligação igual a 2,5, consistente com o comprimento de ligação de 1,15 Å, intermediário entre os comprimentos de ligações triplas e duplas da molécula de N<sub>2</sub> (1,06 Å) e da molécula de O<sub>2</sub> (1,18 Å)<sup>4</sup>, respectivamente. O diagrama mostra ainda a presença de um elétron desemparelhado no orbital  $\pi_2^*$ , revelando que •NO é um radical e justificando seu paramagnetismo.

Apesar de ser um radical livre •NO é uma molécula relativamente estável quando comparada a outros radicais. De fato, pode ser estocada em cilindros e é comercializada desta forma. O elétron desemparelhado ocupa o orbital  $\pi_2^*$  que apresenta considerável caráter do átomo de nitrogênio, o que é um fator importante e determinante da sua reatividade. Por exemplo, as reações de recombinação com outros radicais ou com metais de transição que possuem elétrons desemparelhados ocorrem via átomo de nitrogênio. Os potenciais de redução e oxidação de •NO oferecem informações relevantes relativas à energia do orbital antiligante no qual o elétron desemparelhado se localiza. A semi-reação para a redução monoeletrônica do •NO é mostrada na equação 1

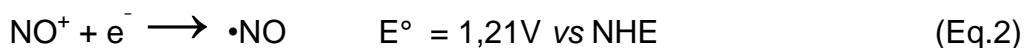




**Figura 1** – Diagrama qualitativo de orbitais moleculares da molécula de óxido nítrico.

Bartberger et al.<sup>5</sup> relata que a redução monoeletrônica do  $\bullet\text{NO}$  deve acontecer prioritariamente para a forma triplete, pois a redução para forma singlete ( ${}^1\text{NO}^-$ ) requer um potencial de  $-1,7\text{ V vs (NHE)}$ , o que torna a formação desta espécie desfavorável. Além disso, o pKa da forma reduzida, estimado a partir destes potenciais, é de cerca de  $11,6\text{ V } (\pm 3,4\text{ V})$ , o que faz com que o íon nitroxila exista essencialmente na sua forma protonada HNO em meio aquoso e pHs fisiológicos. A dificuldade de redução do  $\bullet\text{NO}$  é especialmente importante para sistemas biológicos, pois a produção de HNO seria um enorme problema, já que esta espécie apresenta reatividade completamente diferente da apresentada por  $\bullet\text{NO}$ , sendo inclusive tóxica em condições onde  $\bullet\text{NO}$  é necessário. De modo semelhante  $\bullet\text{NO}$  também se apresenta resistente à oxidação direta, apresentando potencial redox em solução aquosa de cerca de  $1,21\text{ V vs NHE}$ . O potencial seria ainda mais elevado nas baixas concentrações encontradas em sistemas biológicos, tornando sua oxidação pouco

acessível às reações de oxidação. Entretanto, oxidantes fortes como aqueles gerados como intermediários do ciclo catalítico de peroxidases (mielo peroxidase, eosinófilo peroxidase, *horseradish peroxidase*) são capazes de oxidar  $\bullet\text{NO}$  ao cátion  $\text{NO}^+$ .<sup>6</sup>



A análise dos potenciais redox do  $\bullet\text{NO}$  revela que este composto não atua como um bom oxidante, nem como um bom redutor, além disso, por ser uma molécula neutra,  $\bullet\text{NO}$  também não é um bom nucleófilo ou eletrófilo. De fato,  $\bullet\text{NO}$  não reage diretamente com moléculas orgânicas ou inorgânicas, exceto por aquelas que também possuem elétrons desemparelhados como outros radicais e metais de transição e somente via recombinação radicalar. Por outro lado, estas recombinações são geralmente muito rápidas. A estabilidade e a relativa seletividade reacional são de grande importância biológica e sem dúvida foram determinantes para a evolução deste radical como um mensageiro secundário.

## 1.2. Óxido nítrico: Reatividade

A reação de  $\bullet\text{NO}$  com  $\text{O}_2$  é conhecida como reação de auto-oxidação de  $\bullet\text{NO}$ . Embora muitos tenham se referido e ainda se refiram à auto-oxidação de  $\bullet\text{NO}$  para explicar processos oxidativos dependentes de  $\bullet\text{NO}$ , muito provavelmente ela é irrelevante na maioria das situações devido às suas características cinéticas. Experimentalmente, o estudo cinético da reação de auto-oxidação de  $\bullet\text{NO}$  em fase gasosa revela que a velocidade da auto-oxidação aumenta com o quadrado da concentração de  $\bullet\text{NO}$  e é proporcional a concentração de  $\text{O}_2$ . Isto é, é um processo de segunda ordem cinética com relação à  $\bullet\text{NO}$  e terceira ordem global (equação 6).

A dependência quadrática com  $\bullet\text{NO}$  faz com que a velocidade da reação seja altamente dependente de sua concentração; a reação é rápida para concentrações elevadas de  $\bullet\text{NO}$ , porém, quando a concentração de  $\bullet\text{NO}$  é baixa, a velocidade também diminui drasticamente.

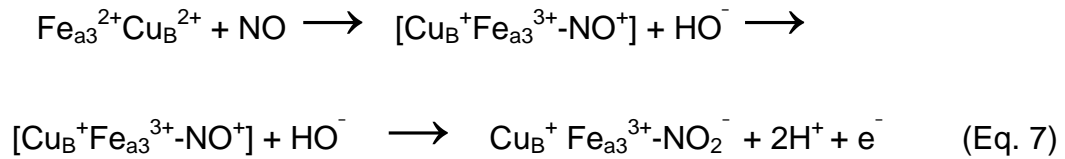


Analogamente,  $\bullet\text{NO}$  pode se auto-oxidar em ambiente aquoso, porém, ao contrário do que acontece no ar,  $\text{NO}_2\bullet$  não constitui o produto final da reação, como é mostrado na série de equações acima. A dependência da reação de auto-oxidação de  $\bullet\text{NO}$  com o quadrado da concentração de  $\bullet\text{NO}$ , faz com que a relevância dessa reação em processos biológicos seja questionável, pois a concentração molar de  $\bullet\text{NO}$ , mesmo em processos inflamatórios, é mantida baixa ( $1\text{nM} < [\bullet\text{NO}] < 1\ \mu\text{M}$ ), de modo que seja muito mais provável que  $\bullet\text{NO}$  reaja com outros constituintes celulares, como ficará evidente abaixo.

Os principais produtos da metabolização celular de  $\bullet\text{NO}$  *in vivo* e em células são indiscutivelmente íons nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e íons nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e não existe mecanismo único que produza os dois produtos. Aparentemente as células apresentam mecanismos catalíticos e distintos de consumo de  $\bullet\text{NO}$  que levam à produção destas espécies e estes mecanismos se processam essencialmente mediante a reação entre  $\bullet\text{NO}$  com centros metálicos.

Uma das reações mais importantes do  $\bullet\text{NO}$  em sistemas celulares é a reação com citocromo C oxidase (Ccox). Na verdade, existem dois mecanismos pelos quais  $\bullet\text{NO}$  reage com Ccox. No mecanismo mais conhecido,  $\bullet\text{NO}$  reage reversivelmente com a enzima no seu estado totalmente reduzido (**R**), formando um complexo nitrosilo do tipo  $[\text{Fe}^{2+}\text{-NO Cu}_B^+]$  ( $k = 0,4\text{-}1 \times 10^8\ \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )<sup>7</sup>, mas não contribui efetivamente para o consumo e metabolização do  $\bullet\text{NO}$ . No segundo mecanismo,  $\bullet\text{NO}$  reage com um intermediário do Ccox, mais precisamente o sítio  $\text{Cu}_B$ , formando um intermediário contendo nitrosônio ( $\text{NO}^+$ ) ligado ao cobre, que por sua vez é convertido a  $\text{NO}_2^-$  pela interação com ferro heme a3 da enzima, formando um aduto  $[\text{Fe}^{3+}\ \text{NO}_2^-]$  que se dissocia liberando nitrito. A constante de velocidade da reação pode variar entre  $10^4$  a  $2 \times 10^5\ \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ , dependendo do estado de oxidação inicial da enzima. Este mecanismo não compete diretamente com  $\text{O}_2$ , uma vez que

se processa com a enzima no estado oxidado (**O**) e nos estados de oxidação intermediários do Ccox (**P, F e E**).

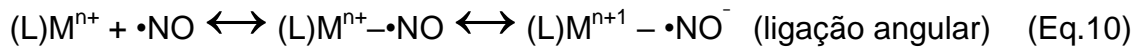
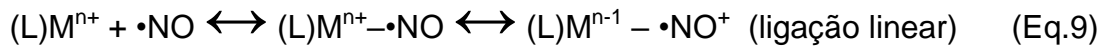


A partir destes mecanismos fica evidente que o metabolismo do  $\bullet\text{NO}$  via reação com Ccox é altamente dependente da concentração de  $\text{O}_2$  no meio e da distribuição da enzima entre os diferentes estados de oxidação. Além disso, fica claro que  $\bullet\text{NO}$  pode atuar como um regulador da respiração celular dependendo das concentrações de  $\bullet\text{NO}$  produzidas.

Outra reação de importância seminal do ponto de vista histórico e biológico é a reação de  $\bullet\text{NO}$  com oxi-hemoglobina ( $\text{Hb}(\text{Fe}^{2+})\text{O}_2$ ). Esta reação produz  $\text{NO}_3^-$  exclusivamente, é irreversível e muito rápida, aproximando-se do limite difusional ( $k = 8,9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )<sup>8</sup>. Foi importante na descoberta de que o fator relaxante derivado do endotélio (FRDE) era  $\bullet\text{NO}$ , já que a presença de oxi-hemoglobina inibia o processo de vasodilatação<sup>8</sup>. Devido à proximidade da fonte endógena de  $\bullet\text{NO}$  (endotélio), a elevada constante de velocidade e a concentração elevada de oxi-hemoglobina, muito provavelmente esta reação determina a dinâmica vascular de  $\bullet\text{NO}$ .

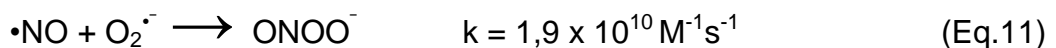


Já a reação reversível entre metal e  $\bullet\text{NO}$ , formando espécies nitrosilos (Metal –  $\bullet\text{NO}$ ) tende a estabilizar a molécula do óxido nítrico através do deslocamento de densidade eletrônica do metal para  $\bullet\text{NO}$ , o que faz com que  $\bullet\text{NO}$  adquira uma carga formal negativa, formando a espécie conhecida como ânion nitroxila ( $\text{NO}^-$ ). Esta interação também pode ocorrer mediante deslocamento de densidade eletrônica do  $\bullet\text{NO}$  para o metal, o que resulta em deficiência eletrônica no  $\bullet\text{NO}$ , dando origem ao cátion ( $\text{NO}^+$ ) nitrosilo<sup>9</sup>. A diferença na forma como estas interações ocorre, influi diretamente nas propriedades e reatividades que estes complexos apresentam.



Embora pareçam relativamente simples, as interações entre metal e  $\bullet NO$  dependem de muitos fatores, como as características do metal envolvido, as energias de seus orbitais, o ambiente químico no qual o metal se situa, isto é, a presença de outros ligantes<sup>4</sup> e até mesmo o pH do meio. Tudo isso exerce forte influência na forma como o centro metálico interage com o  $\bullet NO$ . Até a geometria do fragmento  $M \cdot \bullet NO$  depende destas interações, pois, observa-se que complexos que possuem carga formal positiva no  $\bullet NO$ , tendem a apresentar ligação  $M - \bullet NO$  linear, enquanto complexos onde a carga formal sobre o  $\bullet NO$  é negativa tendem a apresentar ligação  $M - \bullet NO$  angular. A química que descreve as interações entre  $M - \bullet NO$  é complexa e em função da enorme relevância biológica que esta interação possui, estas reações foram extensivamente estudadas podendo ser facilmente encontrados artigos e revisões sobre o tema.<sup>9; 10; 11; 12.</sup>

A recombinação com outros radicais é uma classe importante e biologicamente relevante de reações de  $\bullet NO$ . Sem dúvida, dentro desta classe, a reação de maior relevância e que influencia toda a química de  $\bullet NO$  em sistemas biológicos é a recombinação com o radical superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ). Esta reação produz peroxinitrito ( $ONOO^- / ONOOH$ ) e é uma das reações com mais altas constantes de velocidades conhecidas ( $k = 1,9 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )<sup>13</sup>.



A importância desta reação reside basicamente em dois aspectos: i) excessiva produção de  $O_2^{\bullet -}$  pode resultar em diminuição da biodisponibilidade de  $\bullet NO$  e conseqüentemente no descontrole dos processos biológicos regulados por  $\bullet NO$ ; ii) produto da reação peroxinitrito, embora não seja radicalar, é bastante reativo. Enquanto que  $\bullet NO$  tem meia vida de cerca de alguns segundos em ambiente biológico,  $ONOO^-$  resiste a uma pequena fração disso, <1s, o que reflete em uma grande diferença na área de atuação entre as duas espécies. Como  $ONOO^-$

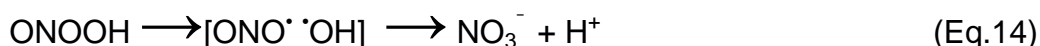
é um oxidante forte, em muitas situações onde  $\bullet\text{NO}$  é capaz de regular funções biológicas,  $\text{ONOO}^-$  tende a causar danos, introduzindo processos nitroxidativos.



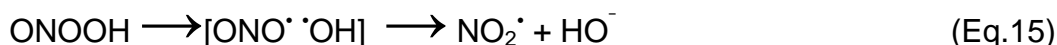
Em pH fisiológico, peroxinitrito pode existir tanto na forma aniônica, quanto na forma protonada  $\text{ONOOH}$  (pka 6,8) e ambas as formas são capazes de se envolverem em oxidações de um ou dois elétrons. A forma protonada ( $\text{ONOOH}$ ) constitui cerca de 20% do peroxinitrito em pH fisiológico<sup>15</sup> e pode oxidar tióis diretamente, levando por fim à formação de dissulfetos e nitrito. A forma aniônica ( $\text{ONOO}^-$ ) pode promover a oxidação por um elétron de centros metálicos (eq. 13), formando complexos do tipo oxo-metal e  $\text{NO}_2\bullet$ . Esta reação pode ser tornar catalítica, pois o grupo  $\text{M}^{n+1}=\text{O}$  pode oxidar biomoléculas, como resíduos de tirosina, regenerando o centro metálico e iniciando um novo ciclo redox com mais produção de  $\text{M}^{n+1}=\text{O}$  e  $\text{NO}_2\bullet$ .



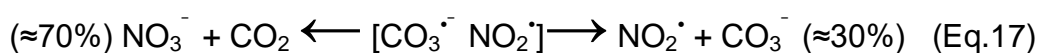
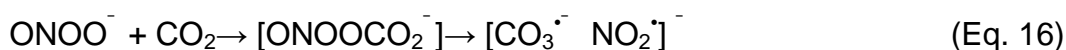
Uma das características mais marcantes do  $\text{ONOO}^-$  é sua suscetibilidade para decomposição catalisada por protonação ou pela reação com  $\text{CO}_2$ , ambas envolvem a homólise da sua ligação peroxo O-O. A decomposição pode ocorrer por duas vias distintas, formando produtos diferentes. Nos dois casos a primeira etapa é a homólise da ligação peroxo (O-O), formando os radicais  $\bullet\text{OH}$  e  $\text{NO}_2\bullet$ . Estes radicais formam um par geminado  $[\text{ONO}\bullet \bullet\text{OH}]$  instável que é mantido dentro de uma gaiola de solvente<sup>16</sup>. A recombinação entre  $\text{ONO}\bullet$  e  $\bullet\text{OH}$  resulta simplesmente na formação do ácido peroxinitroso  $\text{ONOOH}$ , mas a adição de  $\bullet\text{OH}$  no nitrogênio do  $\text{ONO}\bullet$  resulta na formação de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ), que se dissocia em  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{H}^+$  (eq. 14). Esta via corresponde a cerca de 70% de todo produto de decomposição de  $\text{ONOO}^-$ .



Existe ainda a possibilidade de que estes radicais oxidem substratos antes de se recombinarem, correspondendo a no máximo a cerca de 30% do produto final resultante da decomposição do peroxinitrito.



Dióxido de carbono pode reagir com peroxinitrito formando um intermediário instável  $[\text{ONOOCO}_2^-]$  que sofre homólise produzindo  $\text{NO}_2^\bullet$  e  $\text{CO}_3^{\bullet-}$ . De maneira análoga ao que ocorre na homólise do ácido peroxinitroso, um par geminado é formado na presença de  $\text{CO}_2$ , que se decompõe por duas vias distintas. Na primeira, nitrato e dióxido de carbono são produzidos pela adição de um átomo de oxigênio do radical carbonato ao nitrogênio do  $\text{NO}_2^\bullet$ . Já na segunda via, os radicais podem escapar (reagindo com substratos oxidáveis) da gaiola de solvente antes de reagirem, liberando  $\text{NO}_2^\bullet$  e  $\text{CO}_3^{\bullet-}$ .



A decomposição de peroxinitrito é uma fonte de  $\text{NO}_2^\bullet$  e de outros radicais que é cineticamente mais favorável que a auto-oxidação de  $\bullet\text{NO}$ . Muito provavelmente, grande parte da toxicidade e dano atribuído ao  $\bullet\text{NO}$  em sistemas biológicos é consequência da sua recombinação com  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e formação de peroxinitrito e está relacionado principalmente aos produtos de decomposição deste último. Nenhum radical precursor é particularmente reativo e oxidante, por outro lado, peroxinitrito e seus derivados são oxidantes fortes e muito reativos. Estas espécies podem se envolver em reações redox, adição, abstração de átomo de H e recombinações<sup>17</sup>. Atacam aminoácidos em proteínas, ácidos graxos, bases e açúcares constituintes de ácidos nucleicos, oxidam metais, causando todo tipo de dano em metabolismo e sinalização, DNA e membranas biológicas. Fica claro que a química do óxido nítrico é bastante rica e complexa, o que faz com que assunto seja amplamente estudado e discutido. A riqueza e a complexidade da química do  $\bullet\text{NO}$  é sentida também nas suas reações em sistemas biológicos, onde há um número muito maior de substratos capazes de reagir tanto com  $\bullet\text{NO}$ , quanto com seus derivados, o que torna o estudo das causas e dos efeitos destas reações um trabalho bastante complicado e repleto de controvérsias.



Em particular, além de ser um derivado oxidativo,  $\text{NO}_2^\bullet$  também pode estimular processos nitrosativos. Este radical se envolve em muito mais reações que seu precursor.  $\text{NO}_2^\bullet$  pode facilmente abstrair um elétron de uma grande variedade de biomoléculas o que é potencialmente tóxico para sistemas biológicos (Eq. 18). A oxidação monoelétrica de grupos N e S forma radicais que, por sua vez, se recombinam com  $\bullet\text{NO}$  para formar nitrosaminas e s-nitrosotióis.



Além disso, em competição com alvos oxidáveis,  $\text{NO}_2^\bullet$  pode se recombinar com  $\bullet\text{NO}$ , levando à formação de  $\text{N}_2\text{O}_3$ , como é apresentado na equação 4, com constante de velocidade de  $k = 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  <sup>13</sup>. Esta espécie é um forte agente nitrosante que em sistemas biológicos é capaz de promover modificações em proteínas, como será mostrado adiante.

### 1.3. Síntese endógena de $\bullet\text{NO}$

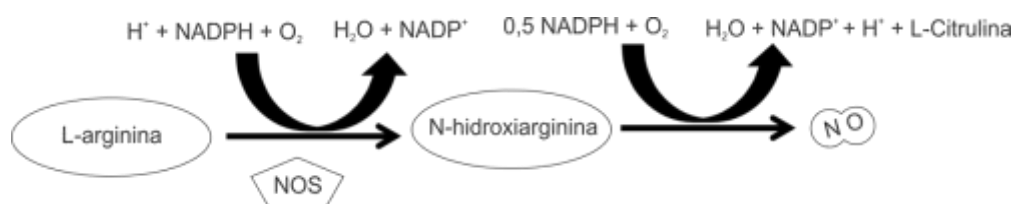
Quando Furchgott e Zawadzki<sup>18</sup> identificaram a dependência do processo de relaxação arterial com uma substância liberada pelo endotélio, que mais tarde ficou conhecida como FRDE, e Ignarro et al.<sup>19</sup> descobriram que o FRDE correspondia à molécula de óxido nítrico, foi descoberto não somente um novo segundo mensageiro, mas uma nova classe de mensageiros secundários que cruza membranas por difusão livre e encontra seu receptor no interior celular. Além disso, um radical livre deixava de ser visto como um vilão, simplesmente uma espécie tóxica capaz de promover oxidação de biomoléculas causando danos celulares, e passava a ser uma molécula fundamental que controlava processos fisiológicos básicos.

Posteriormente foi descoberto que  $\bullet\text{NO}$  era sintetizado endogenamente pela ação de enzimas denominadas  $\bullet\text{NO}$  sintase (NOS). Estas enzimas catalisam a oxidação de L-arginina a L-citrulina usando  $\text{O}_2$ , e tendo NADPH como doador de elétrons, flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina adenina mononucleotídeo

(FMN), ferro heme e tetrahydrobiopterina ( $BH_4$ ) como cofatores, através de uma reação que consome cinco elétrons<sup>20; 21; 22; 23</sup>.

Estas enzimas foram classificadas em três diferentes grupos que compartilham entre si em torno de 50-60% da sequência de aminoácidos<sup>24</sup>: neuronal (nNOS ou Tipo I ou NOSI), encontrada inicialmente em tecidos neuronais; induzível (iNOS ou Tipo II ou NOSII) encontrada em vários tipos de células e que só são produzidas quando as células são estimuladas, e o terceiro tipo, endotelial (eNOS ou Tipo III OU NOSIII) encontrada em tecidos endoteliais<sup>24</sup>. As três formas das enzimas são normalmente classificadas como homodiméricas e possuem a região carboxiterminal homóloga à do citocromo P450 redutase. De fato, a região carboxiterminal destas enzimas atua como uma redutase e é nesta região onde se inicia o fluxo de elétrons a partir da oxidação do NADPH. A região aminoterminal atua como uma oxigenase e é onde se encontram ligados os grupos heme, tetrahydrobiopterina ( $BH_4$ ) e L-arginina.<sup>23; 24</sup>. Entre os domínios redutase e oxidase há uma sequência de aminoácidos capaz de se complexar com calmodulina ligada a  $Ca^{2+}$ , o que efetivamente permite a transferência de elétrons (ou acoplamento) entre os domínios redutase e oxigenase e ativa a produção de  $\bullet NO$ . Desta forma, a produção de  $\bullet NO$  é altamente dependente de  $Ca^{2+}$ .

Na primeira etapa da reação L-arginina é hidroxilada pelo grupo heme da subunidade oxigenase, usando um átomo de O proveniente do  $O_2$  e produzindo o intermediário  $N^W$ -hidroxi-L-arginina, que por sua vez é oxidado novamente produzindo  $\bullet NO$  e L-citrulina; esta última etapa pode sofrer inibição pela presença de CO<sup>25</sup>, o que demonstra o envolvimento do grupo heme nesta etapa. Com a oxidação do grupo heme por  $O_2$ , a enzima necessita ser reduzida para um novo ciclo catalítico. Os elétrons são fornecidos pela subunidade redutase, tendo NADPH como redutor primário. Os elétrons fornecidos passam pelas flavinas, depois por calmodulina até chegar no grupo heme.



**Figura 2** – mecanismo de produção de  $\bullet NO$ , a partir de L-arginina.

As atividades das NOS tipo I e III são estritamente reguladas pela concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , através da formação do complexo Ca – calmodulina. Em condições normais, a interação entre algumas substâncias químicas com seus receptores nas membranas podem resultar em fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através das membranas, ou liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  de compartimentos de armazenagem. Este fluxo transitório de  $\text{Ca}^{2+}$  regula a ativação e desativação de NOSI e NOSII e é fundamental para o processo de sinalização dependente de  $\bullet\text{NO}$ . No sistema nervoso central, a interação entre glutamato e seu receptor NMDA provoca a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  que dispara o processo de síntese de  $\bullet\text{NO}$  por NOSI<sup>26</sup>. Assim que a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  diminui o estímulo é interrompido e produção de  $\bullet\text{NO}$  cessa.

Na NOS tipo II a atividade não depende de flutuações da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$ . Foi constatado que NOS do tipo II apresenta o complexo Ca – Calmodulina fortemente associado à enzima, dispensando a necessidade de  $\text{Ca}^{2+}$  para a ativação da enzima<sup>4; 24; 27</sup>. Contudo, NOS II não é uma enzima constitutiva, mas induzível. Pode ser expressa em vários tipos de células, especialmente macrófagos, hepatócitos e até células endoteliais. A independência de  $\text{Ca}^{2+}$  significa essencialmente que a partir do momento de sua expressão, a NOS tipo II permanece ativa.

As NOS dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  são constitutivas e a ativação destas enzimas depende de estímulos controlados, produzindo normalmente baixos níveis de  $\bullet\text{NO}$  que estão relacionadas principalmente a funções fisiológicas clássicas, como transmissão neural, vasodilatação e processos de sinalização celular. Já a iNOS, sendo induzível, produz níveis mais elevados de  $\bullet\text{NO}$ , podendo sustentar a produção de  $\bullet\text{NO}$  por várias horas ou dias após o estímulo inicial, dependendo apenas da presença da enzima.

O estímulo para produção de iNOS em geral é decorrente da presença de citocinas como  $\gamma$ -interferon ou lipossacarídeos bacterianos<sup>28</sup> e resulta na produção de  $\bullet\text{NO}$  na escala de centenas de nanomolar. Taxas de produção de  $\bullet\text{NO}$  tão elevadas são especialmente úteis como mecanismos de defesa contra patógenos durante processos inflamatórios e exercem papéis importantes no sistema imunológico, podendo agir como um agente tóxico para microorganismos<sup>29; 30</sup> por desencadear processos oxidativos e nitrosativos ou como supressor ou indutor de

apoptose<sup>31</sup>. Porém, produção excessiva pode representar um risco para a própria célula produtora e dos tecidos próximos.

#### 1.4. Óxido nítrico: Mecanismo de sinalização e funções fisiológicas

Entre os mensageiros secundários conhecidos, óxido nítrico é singular sob vários aspectos<sup>32</sup>. É o único mensageiro inorgânico, sendo estruturalmente tão simples que não pode atuar por associação física com receptores como acontece para os demais mensageiros orgânicos como cGMP, cAMP e muitos outros. Além disso, •NO é uma molécula diatômica gasosa, neutra, radicalar e que apresenta elevada solubilidade em ambiente aquoso e hidrofóbico, portanto, apresenta elevada difusibilidade. Como consequência, •NO não encontra dificuldades para difundir-se livremente e atuar de forma autocrina e paracrina, sendo esta propriedade fundamental para várias funções fisiológicas como vasodilatação e neurotransmissão.

A sinalização mediada por •NO, acontece por sua ligação reversível a enzimas contendo ferro-heme, com destaque para guanilato ciclase solúvel (sGC)<sup>33</sup>; <sup>34</sup> <sup>35</sup>. Guanilato ciclase solúvel é uma enzima heterodimérica, que possui uma subunidade  $\alpha$  e outra  $\beta$ , onde para cada uma das subunidades foram isolados dois isomorfos  $\alpha 1$  e  $\beta 1$ . A forma constituída pelas unidades  $\alpha 1$  e  $\beta 1$  corresponde ao isomorfo que é mais amplamente encontrado nos mamíferos e corresponde à forma ativa da enzima<sup>36</sup>. Na subunidade  $\beta$  reside um grupo ferro-heme, onde o  $\text{Fe}^{2+}$  forma um complexo de spin alto, pentacoordenado, ligado a um resíduo de histidina da posição 105 da cadeia  $\beta$ , que se assemelha com o grupo ferro-heme encontrado na deoxihemoglobina. Porém, ao contrário do que acontece com a deoxihemoglobina, este sítio não se liga a oxigênio, garantindo disponibilidade da enzima para se ligar com •NO.

Óxido nítrico liga-se reversivelmente e rapidamente ao  $\text{Fe}^{2+}$  do receptor intracelular sGC. A ligação  $\text{Fe}^{2+}$ -•NO enfraquece a ligação entre o próprio ferro e o resíduo de histidina proximal, localizado axialmente ao •NO no grupo heme, finalmente levando a ruptura da ligação Fe-histidina. Tal reação supostamente

desencadeia alteração conformacional de sGC que resulta no aumento da atividade de sGC por cerca de 400 vezes. Este processo requer concentrações de •NO na faixa de baixo picomolar<sup>37; 38</sup>, o que demonstra que concentrações mínimas de •NO são capazes de disparar os mecanismos de sinalização celular.

Uma vez ativada, sGC passa a catalisar a formação de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) a partir de trifosfato de guanosina (GTP). Um dos efeitos da formação de cGMP está relacionada com processos que regulam proteínas contráteis. Isto é, quando •NO ativa sGC na musculatura lisa ao redor de pequenos vasos sanguíneos, cGMP resultante se associa fisicamente e ativa proteínas quinases (cGK ou PKGs) que promovem a abertura de canais iônicos que resulta na diminuição da concentração íons  $\text{Ca}^{2+}$  e consequente desacoplamento do maquinário contrátil, resultando em vaso relaxação<sup>39</sup>. Mecanismo semelhante inibe agregação de plaquetas e controla a contratilidade de cardiomiócitos, portanto, •NO apresenta papel fundamental no sistema cardiovascular.

O processo de produção de cGMP a partir da ativação de sGC promovida por •NO também está diretamente relacionado com atividade neuronal de potenciação de longo termo. Neste caso, o aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  ativa NOSI com consequente produção de •NO em neurônios pós-sinápticos. Supostamente, •NO difunde-se para neurônios pré-sinápticos ativando sGC, que por sua vez, promove liberação de neurotransmissores via cGMP. Estes neurotransmissores atuam no neurônio pós-sináptico, mantendo a produção de •NO, em uma espiral que mantém atividade neuronal potenciada e por longo período, o que é importante em processos de aprendizado e memorização.

Como discutido acima, •NO pode ser oxidado a íons  $\text{NO}_2^-$  por Ccox, mas a reação mais importante do ponto de vista cinético e fisiológico envolve a reação reversível entre •NO o grupo Heme-Fe  $a_3$  reduzido<sup>40 41</sup>. A enzima Ccox, presente na cadeia transportadora de elétrons, é responsável pela redução de  $\text{O}_2$  a água, um processo que é acoplado ao bombeamento de prótons para fora da matriz mitocondrial e que contribui para a formação e manutenção do gradiente de prótons ao longo da membrana, que finalmente é usado para sintetizar ATP<sup>42</sup>.

Desde a década de 70<sup>43</sup> sabe-se que •NO liga-se reversivelmente ao ferro-heme do citocromo  $a_3$  (eq. 7) em função da similaridade que esta molécula possui com  $\text{O}_2$  e CO. Porém, nesta reação •NO não é consumido, podendo dissociar-se

deste grupo com a diminuição da sua concentração. Tal inibição promovida por •NO ocorre mesmo com concentrações baixas de •NO, próximas de 270nM. A eficiência com a qual •NO é capaz de inibir a respiração celular revela o grande potencial que esse processo possui para regulação de funções biológicas. De fato, suspeita-se que esta inibição em células próximas da vasculatura onde a concentração de •NO é maior (produção endotelial) proporciona melhor oxigenação de células teciduais mais distantes de vasos sanguíneos.

Por outro lado, em condições onde a concentração de •NO aumenta, como ocorre em processos inflamatórios ou de exposição das células a condições de estresse oxidativo, existe a possibilidade de •NO atacar centros de ferro e enxofre como os que estão presentes nos complexos I, II e em aconitases<sup>39</sup> ocasionando inibição permanente da respiração celular. Além da reação com os centros de ferro enxofre, há outros mecanismos pelos quais •NO pode inibir a respiração mais persistentemente, como s-nitrosilação e nitração de resíduos de tirosina do complexo I.

Processos de sinalização celular e controle de respiração mitocondrial correspondem apenas a dois dos vários processos que sofrem influência direta ou são regulados pela ação de •NO. Muitos outros processos celulares estão intimamente relacionados com a produção de •NO endógena, como apoptose<sup>39</sup>, proliferação celular<sup>44</sup>, resposta vascular a condições de hipóxia, inibição de processos de autofagia<sup>45</sup> e modificações pós traducionais de proteínas como formação de s-nitrosoproteínas<sup>46; 47; 48; 49; 50</sup>.

## 1.5. Óxido nítrico: s-nitrosação

A formação de s-nitrosotióis corresponde a uma modificação pós traducional, na qual há adição do grupo nitroso (formalmente NO<sup>+</sup>) a tióis de cisteína<sup>51; 52</sup>. Segundo o levantamento feito por Hess e Stamler<sup>53</sup> até 2012 já haviam sido catalogadas mais de 3000 proteínas na forma de s-nitrosoproteínas, demonstrando o crescente interesse neste tipo de modificação pós-traducional. Numerosos trabalhos indicam que s-nitrosação afeta a atividade, associação e localização

subcelular de proteínas de classes funcionais tão distintas quanto metabolismo (GAPDH)<sup>54</sup>, receptores de membranas e canais iônicos (proteínas-G<sup>55</sup>, N-metil-D-aspartato (NMDA)<sup>56</sup>, “ryanodine”<sup>1 57; 58</sup>), controle redox celular (tioredoxinas<sup>59</sup>, peroxirredoxinas<sup>60; 61</sup>), crescimento e diferenciação celular (GTPases como p21<sup>ras</sup>)<sup>62; 63; 64; 65</sup> fatores de transcrição (NFκB<sup>66; 67; 68</sup> HIF-1α<sup>69</sup>), e apoptose (caspases-3/-9)<sup>70</sup>. Além disso, s-nitrosação parece seguir alguns princípios químicos de processos regulatórios: o nível de s-nitrosoproteínas em células endoteliais coincide com exposição a óxido nítrico, varia com o status redox e deoxigenação celular<sup>56</sup>, parece estar acoplado a estímulos biológicos<sup>71</sup>, aparentemente reversíveis<sup>72; 73</sup> e proteínas são geralmente s-nitrosadas em um único tiol, sugerindo mecanismos de seletividade<sup>74; 75</sup>. Desta forma, s-nitrosação incorpora várias características celulares de regulação, e teoricamente pode modular a maioria dos processos fisiológicos.

Muitas analogias têm sido feitas entre os processos clássicos de sinalização celular com o processo de s-nitrosação. Porém, mecanismos clássicos de comunicação celular, como fosforilação, são processos sofisticados com características químicas singulares como acionamento por estímulos específicos que respondem à necessidade, controle rigoroso espacial e temporal, rapidez, reversibilidade e especificidade. Ou seja, são processos controlados por enzimas que atuam de forma específica.

Controversamente, ainda não foram encontradas enzimas que regulam a formação de s-nitrosoproteínas<sup>76</sup>, o que coloca em dúvida se estes processos são de fato um novo mecanismo de sinalização celular. Não obstante, esta modificação seria independente de ferro, portanto, representaria um mecanismo de sinalização fundamentalmente distinto. Interessante que existem processos enzimáticos que promovem desnitrosação, mas ainda não está claro se estes processos de degradação possuem alguma relação específica com mecanismos de sinalização celular dependentes de •NO ou representam simplesmente mecanismos de reparo.

Esforços têm sido realizados para demonstrar que a formação s-nitrosoproteínas é precisamente regulada por proteínas. Foi demonstrado que GAPDH nitrosada é capaz de s-nitrosar várias outras proteínas nucleares por um processo conhecido como transnitrosação, que consiste na transferência do grupo nitroso de uma proteína para outra<sup>77</sup>. Este processo parece ser comum, pois já foi

---

<sup>1</sup> Um exemplo marcante é o RyR1 (do inglês “ryanodine responsive calcium release channel”) que sofre s-nitrosação em apenas um dos seus 50 resíduos de cisteína

observado com outras proteínas e é potencialmente seletivo em função do reconhecimento específico de proteínas, características inerentes à sinalização celular. Porém, o mecanismo pelos quais proteínas capazes de promover s-nitrosação são inicialmente s-nitrosadas a partir de  $\bullet\text{NO}$  livre ainda não foram elucidados, o que de certa forma faz com que a dúvida permaneça essencialmente a mesma.

### 1.6. Mecanismos conhecidos de formação de s-nitrosotióis

Alguns avanços foram alcançados na elucidação de como proteínas podem ser inicialmente s-nitrosadas a partir de  $\bullet\text{NO}$  livre. Sabe-se que a formação de s-nitrosotiois no interior celular é independente da concentração de nitrito <sup>76</sup>, o que faz sentido, uma vez que nitrito só é capaz de promover s-nitrosação em pH baixo. Como exemplo, a nitrosilação de glutathiona a partir do ácido nitroso é apresentada na equação 19.



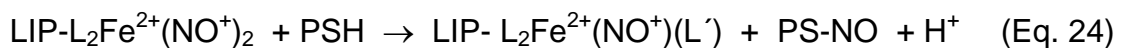
Com base na reação da equação 19 e considerando o pKa do  $\text{NO}_2^-$  próximo de 3,5 é razoável esperar que o processo não deva ser relevante no interior das células, onde o pH é muito mais alto. Contudo, em regiões onde pH é baixo o bastante para promover a série de reações que convertem  $\text{NO}_2^-$  a  $\bullet\text{NO}$  e  $\text{NO}_2^\bullet$ , como no estômago <sup>78; 79</sup>, o envolvimento de nitrito na formação de s-nitrosotiois não pode ser totalmente descartado e há relatos de que ingestão de nitrito é capaz de provocar vasodilatação sistêmica e sustentável em ratos<sup>80</sup>





Sabe-se ainda que s-nitrosação é favorecida por condições de desoxigenação e é dependente da disponibilidade de ferro celular, mais especificamente ferro lábil. Observou-se que a quantidade de s-nitrosotiois formada correlaciona-se com a formação de complexos de ferro dinitrosilo (DNIC, do inglês *dinitrosyl iron complexes*)<sup>47; 81</sup> que são formados pela reação entre •NO e ferro lábil, e possivelmente, clusters de Fe – Enxofre (Fe–S).

Neste mecanismo, DNIC formado a partir da reação entre ferro lábil e •NO promove uma reação de transnitrosação, isto é, transferência de um grupo nitrroso (NO<sup>+</sup>) para um resíduo de cisteína formando s-nitrosotiol. As equações 23 e 24 representam a formação de s-nitrosoproteínas via DNIC, onde PSH representa um tiol (de um aminoácido cisteína genérico) de uma proteína e PSNO representa o produto s-nitrosoproteína. L e L', representam ligantes genéricos de LIP (ferro lábil) nas células.



A formação de s-nitrosoproteínas também pode ser estimulada por O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. A recombinação entre •NO e O<sub>2</sub><sup>•-</sup> produz ONOO<sup>-</sup>, como mostrado na equação 11, e esta espécie, por sua vez, dá origem a espécies oxidantes (NO<sub>2</sub><sup>•</sup>, CO<sub>3</sub><sup>•-</sup>) que estimulam a formação de s-nitrosotiois via equações 25-26 ou via equação 27 com o intermédio do agente N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> oriundo da recombinação entre •NO e NO<sub>2</sub><sup>•</sup> (equação 4).



Apesar de todas estas informações acerca da formação de s-nitrosoproteínas, ainda persistem muitas dúvidas com relação a estes processos e que ainda precisam ser esclarecidas. Por exemplo, oxigênio é um inibidor no processo de formação de s-nitrosoproteínas ou as condições de desoxigenação apenas favorecem a formação de espécies reativas capazes de promover s-nitrosação? A presença de ferro lábil com consequente formação de DNICs é um pré-requisito fundamental para s-nitrosação ou apenas um dos processos pelos quais s-nitrosoproteínas são formadas? O principal mecanismo de formação de s-

nitrosoproteínas é via transnitrosação a partir da transferência de grupo nitroso presente em DNIC para uma proteína? Ou ainda, será que a concentração de DNIC e s-nitrosoproteínas correlacionam-se simplesmente porque são dois produtos relativamente estáveis de  $\bullet\text{NO}$  e que acumulam-se simultaneamente mas por processos independentes?

Estas perguntas ainda não foram totalmente esclarecidas e há necessidade que sejam realizadas mais investigações para respondê-las, mas é muito provável que mais de um mecanismo de formação s-nitrosoproteínas possa operar simultaneamente, o que pode lançar ainda mais dúvidas se s-nitrosação de proteínas corresponde ou não a um processo de sinalização celular, ou apenas uma modificação pós-traducional que ocorre de forma indiscriminada, sem nenhum controle, como consequência da exposição destas proteínas a espécies reativas.

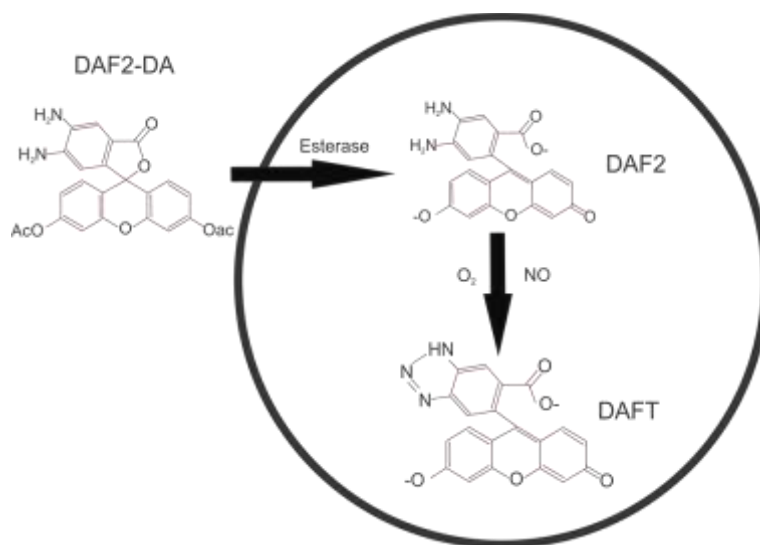
### **1.7. Estudos de processos nitrosilativos utilizando indicadores fluorescentes.**

Estudos revelaram que a quantidade de s-nitrosotióis normalmente encontrada em células estimuladas com LPS fica na faixa entre 20-100 pmol/mg de proteína<sup>76</sup>. Realizar estudos de reações químicas intracelulares já é, por si só, um problema de difícil solução em função da enorme quantidade de moléculas e reações secundárias que podem interferir nos resultados. Mas conduzir um estudo de mecanismos de reações em sistemas celulares, tendo como analito um composto que, além de ser formado em baixas concentrações (picomolar), ainda é passível de sofrer desnitrosação pela ação de agentes como tioredoxinas<sup>82</sup> ou enzimas como s-nitrosoglutationa redutase,<sup>83</sup> torna a tarefa muito mais complicada.

Uma forma normalmente empregada para contornar este problema é o emprego de indicadores fluorescentes capazes de reagir com espécies que estão potencialmente envolvidas nos processos nitrosativos. De um modo geral, estes indicadores são compostos aromáticos que ao sofrerem oxidação apresentam um grande aumento (ou supressão) na fluorescência<sup>84</sup>. O emprego de tais indicadores

possui a vantagem de apresentar resposta rápida, alta sensibilidade, irreversibilidade da reação e estabilidade do produto e, dependendo do indicador, boa especificidade e medidas em tempo real. Com isso, torna-se possível investigar como variações nas condições experimentais influenciam na reatividade de uma ou outra espécie no interior das células, o que, do ponto de vista de estudos de mecanismos é fundamental.

Orto diaminas vicinais, como 4,5-diaminofluoresceína (DAF2) e seu derivado 4,5-diaminofluoresceína diacetato (DAF2-DA) são tradicionalmente comercializados como detectores fluorescentes de  $\bullet\text{NO}$  <sup>85</sup>. No interior das células, DAF2-DA é convertido em DAF2 pela ação de esterases, acumulando-se e proporcionando medidas intracelulares com boa sensibilidade. Na presença de  $\bullet\text{NO}$  e  $\text{O}_2$ , DAF2 passa por processos químicos que levam à formação do derivado triazólico fluorescente (DAFT), que é usado para a monitoração de  $\bullet\text{NO}$  em células e tecidos.



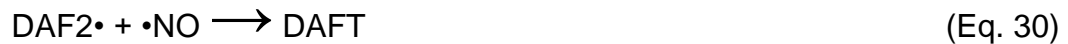
**Figura 3** – Estrutura do DAF2-DA e conversão a DAFT. DAF2-DA atravessa a membrana da célula, e no interior é convertido a DAF2 pela ação de esterases. Na presença de  $\text{O}_2$  e  $\bullet\text{NO}$ , DAF2 é convertido no seu derivado triazólico DAFT.

DAF2 e seus diversos compostos similares não reagem diretamente com  $\bullet\text{NO}$ . O mecanismo de formação do derivado triazólico (DAFT) proposto por Espey et al.<sup>86</sup> sugere que nitrosação do DAF2 ocorre a partir de derivados de  $\bullet\text{NO}$  que são formados no ambiente intracelular.  $\text{N}_2\text{O}_3$ , por exemplo, pode ser formado a partir da reação mostrada na equação 4 e esta espécie é capaz de nitrosar DAF-2 através da

transferência de um grupo  $\text{NO}^+$ , a partir do  $\text{N}_2\text{O}_3$ , para a molécula de DAF2 em processo denominado nitroação .



A formação de DAFT também pode ocorrer por processo radicalar. Neste processo,  $\text{NO}_2^\bullet$  oriundo de peroxinitrito, por exemplo, pode oxidar DAF2 para um intermediário radicalar ( $\text{DAF2}^\bullet$ ), que por sua vez pode recombinar-se com uma molécula de  $\bullet\text{NO}$  produzindo DAFT. Este processo é denominado nitrosilação oxidativa.



É importante ressaltar que ambos os processos de formação de DAFT conhecidos são processos nitrosativos muito similares aos relatados para a formação de s-nitrosotióis (equações 25-27). É justamente por estas razões que muitos estudos de processos nitrosativos intracelulares são realizados utilizando DAF2 como modelo<sup>86; 87; 88</sup>. Importante destacar que, com base nestes dois mecanismos, fica claro que a formação da espécie radicalar  $\text{NO}_2^\bullet$  é fundamental para que ocorra formação de DAFT e de s-nitrosotióis, pois os dois mecanismos apresentam etapas que dependem fundamentalmente desta espécie.

Como supramencionado, a produção de  $\text{NO}_2^\bullet$  via auto-oxidação de  $\bullet\text{NO}$  (Eq. 3) é, muito provavelmente, irrelevante em condições fisiológicas devido às suas características cinéticas, que a tornam extremamente lenta para baixas concentrações de  $\bullet\text{NO}$ , e devido à competição em ambiente biológico, uma vez que em células há uma série de espécies capazes de reagir e consumir  $\bullet\text{NO}$  mais rapidamente do que a reação com oxigênio. Espey et. al.<sup>87</sup> estudaram mecanismos nitrosativos estimulados por superóxido em células usando compostos da família DAF empregando o sistema xantina/xantina oxidase para geração de superóxido. Com este sistema, eles mostraram que DAFT é produzido via os dois mecanismos ilustrados pelas equações 28 e 29-30, mas também identificaram características muito interessantes e surpreendentes de nitroação celular. A nitroação do DAF2

está diretamente relacionada com a razão  $\bullet\text{NO}/\text{O}_2^{\bullet-}$  do sistema, de modo que a formação de DAFT é máxima quando esta razão aproxima-se da unidade.

Apesar do sucesso na explicação dos mecanismos pelos quais DAF2 é nitrosado no interior das células, o trabalho de Espey et al.<sup>86</sup> simula uma condição onde a produção de espécies reativas ocorre no ambiente extracelular, como acontece, por exemplo, em processos infecciosos. Nesta situação, células de defesa são estimuladas a produzir espécies reativas para combater o patógeno. Porém, o comportamento observado para esta situação pode não refletir uma condição onde as espécies radiculares são produzidas no interior das células a exemplo do que ocorre no interior das células de defesa. Estes pontos ainda precisam ser investigados e requerem que as espécies reativas, ou pelo menos as espécies envolvidas nas etapas iniciais sejam produzidas no ambiente intracelular e é exatamente este ponto que este estudo atacou.

A elucidação dos processos nitrosativos intracelulares a partir de espécies reativas geradas no interior das células representa um avanço por simular uma condição mais próxima do que é real, ao menos do ponto de vista de células que produzem ou que são expostas a  $\bullet\text{NO}$  naturalmente. Além disso, buscamos compreender o papel que o ferro intracelular, especialmente uma fonte de ferro celular conhecido como ferro lábil, exerce em tais processos, pois o envolvimento de metais de transição no metabolismo de  $\bullet\text{NO}$  é bastante conhecido, como já foi mencionado. Neste estudo procurou-se abordar os processos nitrosativos celulares via metodologia cinética tradicional, isto é, avaliação da velocidade de formação de DAFT em função das concentrações de espécies relevantes.

## **2. Objetivo e Justificativa**

Processos nitrosativos que produzem s-nitrosoproteínas despertam grande interesse em Biologia e Medicina, uma vez que esta a modificação tem potencial para controlar múltiplos e distintos processos fisiológicos nos níveis celulares e sistêmicos. Contudo, a formação de s-nitrosoproteínas a partir de •NO livre ainda não é clara quanto a mecanismos, seletividade e velocidade. Por isso, o objetivo principal avaliar os mecanismos de processos nitrosativos intracelulares a partir de •NO livre usando uma abordagem cinética clássica, dentro das restrições que o modelo celular impõe e permite. Atenção especial foi dada a superóxido e ferro lábil, pois ambas as espécies sabidamente promovem nitrosação, ainda que por mecanismos diferentes. Esta abordagem fornece informações relevantes de mecanismos e cinéticas de processos nitrosativos em células, contribuindo para a compreensão desta modificação no contexto de estresse oxidativo e sinalização biológica.

### **3. Parte experimental**



### 3.1. Reagentes e soluções

Todos os reagentes empregados no estudo, exceto quando especificado, são da marca Sigma-Aldrich, foram adquiridos com maior teor de pureza disponível e usados como fornecidos.

Salicilaldeído isonicotinoil hidrazona (SIH) foi sintetizado em nosso laboratório a partir da reação de condensação entre as bases de Schiff 2-hidroxibenzaldeído e hidrazida isonicotínica como descrito na literatura<sup>89</sup>. As soluções de SIH foram preparadas dissolvendo-se o composto em dimetil sulfóxido (DMSO), em geral, a solução estoque de SIH era preparada com concentração de  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ .

Manganês (III) meso-tetrakis( N-etil-piridino-2-il) porfirino (MnTe-2-pyp) foi gentilmente doado pela Sra. Rebecca E. Oberley Deegan (*Department of Medicine, National Jewish Health, Denver, CO, USA*)

Solução estoque de peroxinitrito ( $>25\text{mM}$ ) foi gentilmente doado pela prof. Dra. Ohara Augusto (Departamento de bioquímica, Instituto de Química – Universidade de São Paulo)

A composição do tampão de trabalho empregado nos estudos (PBS/DTPA) é dada a seguir em  $\text{mmol L}^{-1}$ : Fosfato:  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ . NaCl:  $137 \text{ mmol L}^{-1}$ , KCl:  $2,7 \text{ mmol L}^{-1}$ , DTPA (ácido etilenotriamino penta acético):  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$

Ensaio nos quais a presença do quelante (DTPA) poderia ser interferente foram realizados com PBS de mesma composição, porém, sem DTPA. Situações onde o tampão sem DTPA foi empregado estão descritas nas respectivas figuras.

### 3.2. Cultura de células

Foram utilizadas células do tipo RAW 264,7 adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC) e cultivadas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's*

*Modified Eagle's Medium*) conforme recomendação do fornecedor. O cultivo foi feito em frascos de 175 cm<sup>2</sup> em incubadora a 37°C, umidificada e com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> até atingirem confluência entre 80-90%. A coleta das células foi realizada utilizando-se tampão de fosfato salino (PBS) contendo 250µM de ácido dietilenotriamino penta-acético (DTPA). Após a coleta, as células foram contadas utilizando-se uma câmara de Neubauer (Hemocitometria) e a viabilidade celular foi determinada usando-se o método da exclusão com azul de tripano. Ao longo do trabalho, a viabilidade celular foi sempre superior a 85%. Após a contagem, as células foram mantidas suspensas em meio de cultura completo e em banho de gelo até sua utilização.

### **3.3. Doadores de óxido-nítrico Spermine NONOate (sper/NO) e Prolinonate (proli/NO)**

O doador de óxido nítrico utilizado nos ensaios contendo células foi o spermineNONOate (N-[4-[1-(3-aminopropil)-2-hidroxi-2-itosohidrazino]butil-1,3-propanodiamina). Este doador libera •NO lentamente,  $t_{1/2} = 39$  minutos a 37°C, pH 7,4, permitindo trabalhar em condições de estado estacionário na escala de tempo experimental adotada. As soluções de sper/NO foram preparadas dissolvendo-se o composto em solução de hidróxido de sódio 0,01 mol L<sup>-1</sup> e calibradas semanalmente utilizando o ensaio com oxihemoglobina<sup>90</sup>.

O doador de óxido nítrico empregado para calibração dos eletrodos seletivos à •NO foi o proli/NO 1-(hidroxi-NNO-azoxi)-L-prolinato de dissódio). Este doador apresenta liberação rápida de •NO; a 37°C e pH 7,4, com meia vida de cerca 1,8 s. A solução estoque de proli/NO usada para calibração dos eletrodos seletivos a •NO foi preparada dissolvendo-se o composto em solução de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> e a solução foi calibrada semanalmente usando o ensaio com oxihemoglobina<sup>90</sup>.

### **3.4. Tratamento das células com 4,5 diamino fluoresceína diacetato (DAF2-DA)**

O tratamento das células com DAF2-DA foi realizado suspendendo-se 60 milhões de células em 1mL de tampão contendo 10  $\mu$ M (exceto quando indicado diferentemente) de DAF2-DA por 30 minutos sob agitação a 37°C. Após este período, as células foram centrifugadas e lavadas duas vezes com tampão de trabalho para remoção do excesso de DAF2-DA extracelular, suspensas em 1 mL de meio de cultura completo e mantidas em banho de gelo até utilização. Imediatamente antes da utilização, as células foram novamente centrifugadas para remoção do meio de cultura e suspensas no tampão de trabalho. As células tratadas foram utilizadas dentro de um intervalo máximo de 2 horas após o tratamento ou até que fosse constatado que o aumento da fluorescência na presença do  $\bullet$ NO tivesse diminuído quando comparado com as primeiras medidas.

### **3.5. Experimentos de fluorescência**

Nosso objetivo principal foi estudar os mecanismos químicos de processos nitrosativos intracelulares.

Como fonte de  $\bullet$ NO optamos por empregar o doador de  $\bullet$ NO sper/NO. Este composto permite liberação de  $\bullet$ NO a uma taxa conhecida, permitindo que a concentração de  $\bullet$ NO atinja um estado estacionário por período de tempo adequado à realização dos nossos ensaios.

Foram adotados critérios para minimizar reações químicas extracelulares que pudessem interferir nas medidas dos parâmetros cinéticos de formação de DAFT. Para garantir a remoção de DAF2-DA extracelular, as células foram lavadas usando ciclos de centrifugação/ suspensão em PBS/DTPA imediatamente antes das medidas de fluorescência. Também adotamos o critério de incluir Cu, Zn, Superóxido dismutase bovina (SOD) ( $100 \text{ U mL}^{-1}$ ) em todos os experimentos (exceto

onde for especificado) para remover qualquer quantidade de  $O_2^{\cdot -}$  extracelular que possa eventualmente ter sido formado. Entretanto, testes mostraram que exclusão de SOD nos ensaios não alterava os resultados, revelando que não há produção de  $O_2^{\cdot -}$  no ambiente extracelular nas condições experimentais do estudo.

### 3.6. Fluorescência de amostras tratadas com DAF2-DA

Os ensaios de fluorescência foram conduzidos utilizando um fluorímetro Shimadzu modelo RF5301 pc. Tipicamente, as células tratadas com DAF2-DA foram lavadas e submetidas a um ciclo final de centrifugação e ressuspensão imediatamente antes do ensaio de fluorescência para remover DAF2 extracelular eventualmente presente. Então, as células ( $3 \times 10^6$  células/ mL) foram ressuspensas em 2 mL de tampão de trabalho pré aquecido a  $37^{\circ}C$  em uma cubeta e levada ao espectrofluorímetro. As células foram mantidas sob agitação constante durante todo ensaio e a temperatura controlada a  $37^{\circ}C$  com banho termostatizado. Uma vez que a concentração de  $O_2$  pode interferir em diversos processos metabólicos, bem como no consumo celular de  $\bullet NO$ , as células foram sistematicamente mantidas sob agitação por 5 minutos antes da introdução de doador de  $\bullet NO$  na tentativa de minimizar diferenças de oxigenação entre amostras. A fluorescência foi medida no método cinético por cerca de 10 minutos, sendo 9 minutos após a adição de  $\bullet NO$ .

Em muitos experimentos, diferentes reagentes como: MnTbap (Cloreto de porfirino tetrakis(4-ácido benzoico)  $Mn^{3+}$  ; salicilaldeído isonicotinoil hidrazona (SIH); Manganês (III) meso-tetrakis( N-etil-piridino-2-il) porfirino (MnTe-2-pyp); bicarbonato de sódio; azida de sódio; Paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridina-dicloreto); Boronatos (ácido cumarino borônico; ácido acetilfenil borônico); Cloridrato de 3-morfolinossidnomina (SIN1) foram introduzidos previamente no tampão de trabalho para investigar possibilidades e hipóteses específicas como será descrito posteriormente. Todos reagentes, foram adicionados ao tampão de trabalho para que as células ficassem expostas a estes reagentes antes das medidas de fluorescência e da adição de doador de  $\bullet NO$ . Outras condições específicas estão apresentadas nas legendas das respectivas figuras.

Compostos como Lipopolisacarídeo de *Escherichia Coli* 0111:B4 (LPS), o inibidor de síntese de glutathione – Butionina sulfoximina (BSO), ácido ascórbico, ou com Cu-Zn superóxido dismutase poli etilenoglicol (PEG-SOD) exigem um tratamento prolongado para produzir o efeito esperado. Nestes casos, células foram tratadas ainda no frasco de cultura pela adição dos compostos no meio de cultura, mantendo-as na incubadora durante a noite (ou por períodos específicos mostrado na legenda da respectiva figura), para posterior coleta e tratamento com DAF2-DA conforme descrito acima. As células tratadas com ácido ascórbico foram preparadas de modo similar, contudo o período de incubação foi de 3 horas.

### **3.7. Análise cinética de nitroação de DAF2**

A intensidade de fluorescência é proporcional à formação de DAFT. Desta forma, o coeficiente angular da curva de fluorescência em função do tempo foi tomado como a taxa de formação de DAFT. O cálculo dos coeficientes angulares nas amostras foi realizado escolhendo-se o último minuto da medida. Neste intervalo a concentração de  $\bullet\text{NO}$  se encontra na situação de estado estacionário como medido amperometricamente por eletrodo seletivo e a fluorescência aumenta linearmente.

### **3.8. Estudos de fluorescência de DAF2 e DAFT**

DAFT foi preparado pela nitroação de DAF2 a partir da reação com íons nitrito em meio ácido, assumindo conversão estequiométrica e completa. Solução estoque de DAFT (2mM) foi preparada a partir da reação entre nitrito de sódio (5mM), dissolvido em solução de HCl ( $0,1\text{mol L}^{-1}$ ), com solução de DAF-2 (4mM). O excesso de nitrito de sódio foi usado para garantir a conversão completa de DAF2 em DAFT. A formação de DAFT foi identificada pela mudança de cor da solução, que passa de incolor para amarela e pelo aumento da fluorescência observada com

$\lambda_{ex}$ . 495  $\lambda_{em}$ . 520nm. Os espectros de fluorescência do DAF2 na presença e ausência de  $Fe^{2+}$  ou do complexo  $[Fe(SIH)_2]$  foram obtidos a partir da solução de DAF2 (1 $\mu$ M) em tampão de trabalho sem DTPA, a 37°C e pH 7,4. Os espectros de fluorescência do DAFT na presença e na ausência de solução  $Fe^{2+}$  ou  $[Fe(SIH)_2]$  foram obtidos a partir de solução de DAFT 0,1 $\mu$ M em tampão de trabalho, preparada a partir do estoque sintetizado. A concentração de  $Fe^{2+}$  e  $[Fe(SIH)_2]$  empregado nos ensaios foi de 50 $\mu$ M.

### **3.9. Fluorescência do 2-hidroxi etídio (2-OH-E)<sup>+</sup>**

Suspensão celular com densidade 2 x 10<sup>6</sup> células mL<sup>-1</sup> em tampão de trabalho foram expostas a 20 $\mu$ M de dihidroetidina (DHE) na ausência e na presença do quelante SIH. O espectro de emissão das suspensões celulares expostas a DHE foi registrado a cada 5 minutos por período de 30 minutos com excitação em 490nm na faixa entre 560-570nm. Os valores máximos de emissão foram empregados para avaliar a produção de superóxido intracelular pelo quelante.

### **3.10. Oxidação do ácido cumarino-7-borônico (CBA) por peroxinitrito**

Suspensões celulares contendo 2 x 10<sup>6</sup> células mL<sup>-1</sup> em tampão de trabalho foram expostas a CBA em concentrações que variaram de 50 a 400  $\mu$ M por 5 minutos seguido de adição de sper/NO 15 $\mu$ M. O aumento da fluorescência em função do tempo foi acompanhado por 10 minutos nos comprimentos de onda de excitação 332nm e emissão 450nm, com abertura de fendas de emissão e excitação de 5nm.

Outra abordagem empregando CBA foi desenvolvida a partir do tratamento das células com o boronato, de maneira análoga ao tratamento feito com DAF2. Suspensão celular contendo 60 x10<sup>6</sup> células mL<sup>-1</sup> foi exposta a CBA 50 $\mu$ M por 30 minutos a 37°C e sob agitação. Após este período, as células foram centrifugadas e

lavadas para remoção de CBA extracelular e suspensas em meio de cultura até sua utilização. Os ensaios de fluorescência foram realizados suspendendo  $2 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  em tampão de trabalho, seguido de adição de sper/NO  $15\mu\text{M}$  na presença e na ausência de SIH. A fluorescência foi acompanhada nos comprimentos de onda de excitação e emissão 332nm e 450nm, respectivamente, com abertura de fendas de 5nm. Ensaios semelhantes foram realizados empregando APBA (ácido acetil fenil borônico).

### 3.11. Síntese do complexo $[\text{Fe}(\text{SIH})_2]$

O complexo  $[\text{Fe}(\text{SIH})_2]$  foi sintetizado a partir da reação entre solução de sulfato de ferro (II) em HCl  $0,01 \text{ molL}^{-1}$  e SIH dissolvido em DMSO. Tipicamente sulfato de ferro (II) foi dissolvido em solução de HCl  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  previamente desoxigenado pela passagem de gás inerte. A solução foi mantida em frasco selado, sem oxigênio, até sua utilização. O complexo foi preparado pela adição da solução de SIH na solução de  $\text{Fe}^{2+}$ , na ausência de  $\text{O}_2$ , na proporção de 2 de SIH para 1 de  $\text{Fe}^{2+}$ . Para evitar precipitação de SIH tomamos o cuidado de evitar que a concentração de SIH empregada fosse superior a  $150 \mu\text{M}$ .

### 3.12. Quantificação de s-nitrosotiol total

A quantificação do s-nitrosotiol foi feita por quimiluminescência em um analisador de  $\bullet\text{NO}$  (Analyzer – Sievers- modelo NOA 280) utilizando o método dependente de tri-iodeto  $\text{I}_3^-$  conforme descrito na literatura<sup>47; 49; 81</sup>.

Tipicamente as células foram suspensas em tampão de lise composto do tampão de trabalho contendo 50mM de N-etilmaleimida (NEM). Em seguida, as células foram lisadas por ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido, seguido de centrifugação a 12000 RPM por 10 minutos para remoção do material particulado. O sobrenadante contendo o extrato proteico foi congelado em

nitrogênio líquido até a análise que ocorreu sempre em um intervalo máximo de 48 horas.

A análise do teor de s-nitrosotiol foi realizada dividindo o lisato em três frações. A primeira fração foi tratada com solução de sulfanilamida de modo que a concentração desta espécie correspondesse a 10% (v/v); a segunda fração foi tratada com solução de sulfanilamida (concentração final 10%) e cloreto de mercúrio (concentração final 5% v/v) e a última não recebeu nenhum tratamento e foi empregada para determinação do teor de proteína total. As soluções tratadas foram mantidas à temperatura ambiente (18°C) por 20 minutos antes de serem injetadas na câmara reacional contendo solução de tri-iodeto. Após os 20 minutos as amostras foram injetadas na câmara reacional contendo solução de iodo/iodeto (10mM I<sub>2</sub> e 45mM KI) dissolvido em ácido acético glacial a 60°C. A redução dos compostos s-nitrosados (s-nitrostiois e s-nitrosaminas) promovida pela solução de iodo/iodeto leva à formação de •NO, que é arrastado por N<sub>2</sub> para dentro do instrumento onde é convertido a NO<sub>2</sub>• pela reação com ozônio. Uma fração do NO<sub>2</sub>• produzida encontra-se no estado excitado e emite luz ao retornar ao estado fundamental, a qual é detectada e o sinal é convertido em potencial elétrico. A área sob o gráfico de potencial elétrico em função do tempo é proporcional à quantidade de •NO e, portanto, de s-nitrosotiol, permitindo a quantificação destas espécies.

A curva de calibração foi obtida por adição de diferentes quantidades de solução de nitrito de sódio 1µM. A concentração de s-nitrosotiol nas amostras foi calculada a partir da diferença entre a área obtida com a amostra tratada com sulfanilamida e a área obtida com a amostra tratada com sulfanilamida + cloreto de mercúrio.

### **3.13. Determinação do teor proteico total**

A determinação de proteína total foi feita espectrofotometricamente, utilizando o método de Bradford. O método consiste na reação entre um corante, “Cromassie Brilliant blue” BG-250, com macromoléculas que contém aminoácido de cadeias laterais básicas ou aromáticas produzindo aumento da absorbância em



595nm<sup>91</sup>. O teor de proteína total foi determinado empregando-se a fração do lisato celular descrito no item anterior que não sofreu nenhum tratamento. A análise foi feita em leitor de SpectraMax 340PC384, Molecular Devices.

### **3.14. Acompanhamento amperométrico das concentrações de O<sub>2</sub> e •NO.**

O acompanhamento das concentrações de O<sub>2</sub> e •NO foi realizado amperimetricamente utilizando um potenciostato WPI-LabTrax 24T World Precision Instruments.

As suspensões celulares foram colocadas em uma câmara reacional mantida sob temperatura constante por um banho termostaticado, e sob constante agitação. Ao fim de cada acompanhamento, foi adicionado 2µM de oxihemoglobina (HbO<sub>2</sub>) para consumir o •NO, garantindo que a corrente observada é devido a presença de •NO. As medidas foram realizadas utilizando eletrodos seletivos à •NO e O<sub>2</sub>, previamente calibrados. A calibração do eletrodo seletivo a •NO foi realizada pela adição de alíquotas sucessivas de concentração conhecidas do doador de •NO proli/NO. A concentração do doador, por sua vez, foi rotineiramente determinada usando o método diferencial de oxidação de oxihemoglobina por óxido nítrico<sup>90</sup>.

O eletrodo de O<sub>2</sub> foi calibrado por medidas de corrente a 21% e 0% de O<sub>2</sub> [na presença de ditionito de sódio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)] assumindo concentrações de 200µM e 0 µM de O<sub>2</sub> no tampão de trabalho respectivamente.

### **3.15. Oxidação de citocromo C por peroxinitrito**

Citocromo C foi previamente reduzido por excesso de ditionito de sódio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), o qual foi removido por cromatografia por exclusão por tamanho em uma coluna do tipo *Sephadex* G-25. As frações concentradas de citocromo C reduzido foram coletadas e empregadas nos ensaios.

Foram adquiridos os espectros de soluções contendo citocromo C reduzido 25 $\mu$ M; Citocromo C reduzido (25 $\mu$ M) + peroxinitrito (30 $\mu$ M); Citocromo C reduzido (25 $\mu$ M) + FeSO<sub>4</sub> (200 $\mu$ M) + peroxinitrito (30 $\mu$ M) e finalmente, Citocromo C reduzido (25 $\mu$ M) + peroxinitrito (30 $\mu$ M) + [Fe(SIH)<sub>2</sub>] (50 $\mu$ M).

O complexo [Fe(SIH)<sub>2</sub>] foi preparado a partir da reação entre solução de FeSO<sub>4</sub> (50 $\mu$ M), preparada em ácido clorídrico 0,01 mol L<sup>-1</sup> previamente desoxigenado, e solução de SIH (100 $\mu$ M) dissolvido em DMSO. Este complexo foi preparado imediatamente antes da adição à solução de citocromo C reduzido para evitar oxidação do metal.

### **3.16. Espectroscopia na região UV-VIS.**

Todas as medidas espectrofotométricas na região do UV-VIS foram realizadas em um espectrofotômetro Shimadzu UV-VIS 1800. As análises do teor de proteína total foram realizadas em um leitor de placas do tipo SpectraMax 340PC384, Molecular Devices. As medidas de fluorescência foram realizadas em um espectrofluorímetro Shimadzu Modelo RF5301 pc com temperatura controlada por um banho termostatizado.

As condições de aquisição de cada espectro estão apresentadas nas legendas das respectivas figuras.

## **4. Resultados e discussão**

#### 4.1. Parte I – Mecanismos de nitroação de DAF2 intracelular a partir de •NO livre.

##### 4.1.1. Modelo de estudo

As duas primeiras preocupações foram a determinação do tipo e da quantidade de células que deveriam ser empregadas para a realização dos estudos. Com relação ao tipo de célula, células RAW 264.7 são particularmente interessantes e úteis para os objetivos do estudo. São clones de macrófagos de rato que normalmente produzem e estão expostos a •NO e respondem a •NO *in vivo*. Podem ser ativadas com relativa facilidade para expressar iNOS, permitindo conduzir experimentos com •NO endógeno, o que muitas vezes é desejável. Além disso, são células facilmente cultiváveis e robustas, suportando bem situações de *stress* oxidativo, condição que eventualmente seriam expostas ao longo do trabalho.

Decidiu-se também por adotar estratégia cinética clássica para investigar processos nitrosativos, isto é, determinar efeitos na velocidade dos processos devido a variações das concentrações das espécies potencialmente relevantes. Para tanto, dentro dos limites que o modelo celular impõe, foi importante selecionar reagentes químicos que permitissem que variações de concentração fossem feitas com facilidade. Primeiramente, como alvo nitrosativo, decidiu-se por usar DAF2-DA. Este composto reúne um conjunto de propriedades e características desejáveis e úteis para o estudo. Fundamentalmente, DAF2 não reage diretamente com •NO, apesar de ser comercializado como detector de •NO. Mais importante para os propósitos do estudo, a formação da sua forma fluorescente detectável, DAFT, depende de processos nitrosativos<sup>92</sup> como bem demonstrado por Espey et al<sup>86</sup>, revisado na introdução, que já utilizaram este indicador para objetivos semelhantes. Segundo, a concentração de DAF2 pode ser variada no interior celular simplesmente pelo tratamento de células com diferentes concentrações de DAF2-DA. Terceiro, DAF2 é impermeável a membranas biológicas e convenientemente se acumula no interior celular, uma vez que seu precursor DAF2-DA é clivado por esterases. Sua concentração pode atingir níveis relativamente elevados, na faixa de sub mM, o que

é conveniente para investigar reações envolvendo espécies radicalares e oxidantes reativos. Quarto, a formação de DAFT é irreversível, assim não há preocupação com degradação do produto. Quinto, DAFT é altamente fluorescente<sup>85</sup>, permitindo trabalhar com baixas concentrações de •NO.

Finalmente, o indicador permite detecção em tempo real, fundamental para a abordagem cinética adotada. Como fonte de •NO, decidiu-se por empregar o doador de •NO sper/NO, que libera •NO a uma constante de velocidade conhecida e lenta ( $t_{1/2} = 39$  minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  e  $\text{pH} = 7,4$ ). Este composto libera •NO espontânea e continuamente durante um período de tempo, permitindo •NO a alcançar e manter condição de estado estacionário na escala temporal dos experimentos.

#### **4.1.2. Estabelecimento de condições experimentais.**

O objetivo do trabalho foi investigar mecanismos químicos de processos nitrosativos intracelulares. Com esta intenção, uma preocupação constante do estudo, desde seu início, foi minimizar reações químicas que pudessem produzir espécies oxidantes e nitrosantes no corpo da suspensão celular. Desta forma, adotamos critérios para minimizar reação entre •NO com Ferro e  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e auto-oxidação de •NO no meio extracelular. Com relação aos dois primeiros, o tampão de trabalho continha além de PBS,  $100 \mu\text{M}$  do quelante DTPA e  $100 \text{ U/mL}$  de SOD, enzima capaz de catalisar a dismutação de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Já a reação de auto-oxidação de •NO é mais difícil de ser evitada, uma vez que  $\text{O}_2$  não pode ser excluído dos ensaios experimentais e auto-oxidação intracelular poderia vir a ser uma via relevante para geração de espécies nitrosativas. Portanto, medidas para evitar ou minimizar auto-oxidação extracelular foram tomadas.

Felizmente, auto-oxidação, como mencionado na parte introdutória, segue cinética de segunda ordem com relação à •NO, tornando-se lenta para concentrações baixas de •NO. Assim, procurou-se trabalhar numa faixa de concentração de •NO, entre  $10$  e  $200 \text{ nM}$ , que é aceitável do ponto de vista fisiológico. Além disso, células possuem rotas catalíticas e robustas de consumo de •NO como também mencionado da parte introdutória. Portanto, inicialmente

procurou-se determinar a quantidade de células suficientes para tornar auto-oxidação de  $\bullet\text{NO}$  um processo cineticamente desprezível relativo ao consumo celular de  $\bullet\text{NO}$ . Na verdade esta etapa buscou um compromisso entre este e outros fatores como: i) boa resposta nos ensaios de fluorescência; ii) intervalo de tempo para que a concentração de  $\bullet\text{NO}$  atingisse a condição de estado estacionário; iii) concentração de  $\bullet\text{NO}$  no estado estacionário; iv) e velocidade de consumo de oxigênio pelas células. Este último ponto é especialmente importante, uma vez que a formação de DAFT é dependente de  $\text{O}_2$ , como será apresentado adiante.

O número adequado de células foi determinado por experimentos de velocidade de consumo de  $\bullet\text{NO}$  em função do número absoluto de células. Para isso, a concentração de óxido nítrico em função do tempo e de diferentes quantidades de células foi investigada amperometricamente utilizando eletrodo seletivo para  $\bullet\text{NO}$ . Nestes experimentos, suspensões de diferentes densidades celulares foram expostas à mesma concentração de doador de  $\bullet\text{NO}$  por período suficiente para que a concentração de  $\bullet\text{NO}$  atingisse a condição de estado estacionário. No final da exposição, adicionou-se hemoglobina ( $\text{HbO}_2$ ) para consumir o  $\bullet\text{NO}$  presente em solução, garantindo que a resposta em corrente elétrica fosse dependente da concentração de  $\bullet\text{NO}$ . Os resultados apresentados na Figura 4A revelaram que a concentração de óxido nítrico no estado estacionário decresce com o número de células presentes na suspensão. A densidade celular variou de 1 a 8 ( $\times 10^6$ ) células/mL, entretanto, para melhor visualização, são apresentadas as curvas de  $[\text{NO}]$  vs tempo até  $5 \times 10^6$  células/mL. O decréscimo da concentração de  $\bullet\text{NO}$  no estado estacionário ( $[\text{NO}]_{\text{Est}}$ ) com o aumento da densidade celular é melhor visualizado no *inset* da figura 4A, que mostra a  $[\text{NO}]_{\text{Est}}$  *versus* a densidade celular. A redução da  $[\text{NO}]_{\text{Est}}$  com o aumento do número de células não foi nenhuma surpresa uma vez que em células existem diversos mecanismos pelos quais óxido nítrico é consumido, e que portanto, diminui a concentração no estado estacionário.

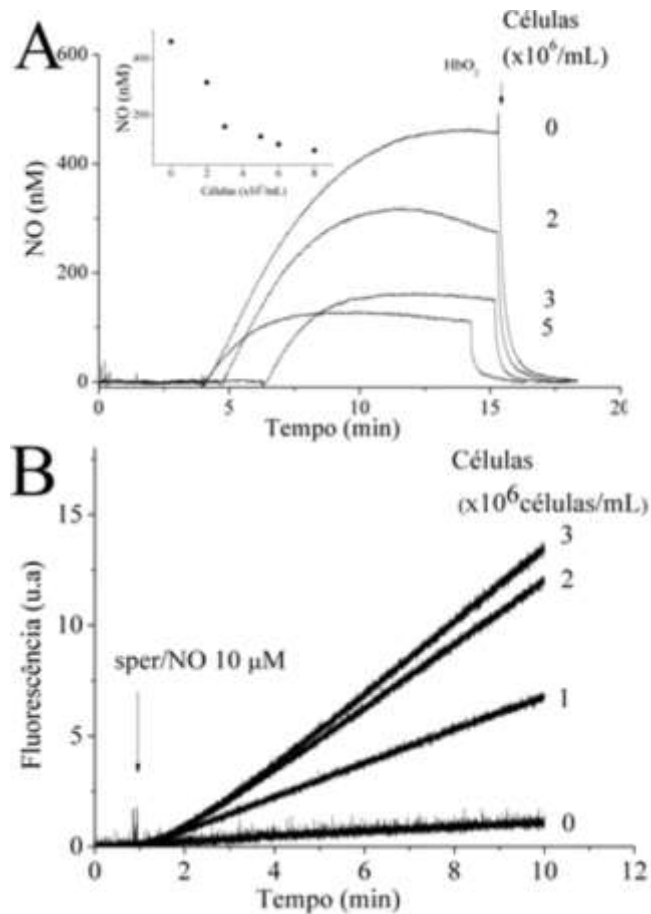
Também não foi surpresa que o intervalo de tempo para alcançar a condição de estado estacionário diminuísse progressivamente com o aumento do número de células. Esta condição ocorre quando a velocidade de consumo de  $\bullet\text{NO}$  torna-se igual à velocidade de liberação de  $\bullet\text{NO}$  pelo doador, assim, quanto mais rápido o consumo (decorrente do maior número de células) menor o tempo para alcançar a condição de estado estacionário.

Mais importante para os objetivos do estudo, o *inset* da figura 4A mostra que a  $[NO]_{est}$  diminui consideravelmente entre 0 e  $3 \times 10^6$  células /mL (total de 2mL de tampão de trabalho), mas com ponto de inflexão a partir desta densidade celular. Este resultado foi interpretado como a quantidade na qual o consumo de  $\bullet NO$  pelas células supera a velocidade de consumo de  $\bullet NO$  via auto-oxidação. Deste ponto em diante a  $[NO]_{est}$  diminui linearmente com o aumento da densidade celular, mas esta queda não é significativa até  $8 \times 10^6$  células / mL. Nas etapas iniciais do estudo, ficou evidente que seria melhor e mais adequado determinar a velocidade de processos nitrosativos sob condições de estado estacionário de  $\bullet NO$  para evitar que variações de velocidade fossem decorrentes de variações da concentração de  $\bullet NO$ . Assim, era necessário conhecer não somente a concentração nominal de  $[NO]_{est}$  em função da concentração do doador, mas o intervalo de tempo no qual o estado estacionário é mantido em suspensões celulares. Por isso, foi importante notar que esta condição é alcançada rapidamente e se mantém por vários minutos, principalmente para densidades celulares superiores a  $3 \times 10^6$  células / mL (figura 4A). Fica claro que densidades celulares entre 3-5 milhões são mais adequadas, pois proporcionam alcance e manutenção de estado estacionário de  $\bullet NO$  e ainda não permitem aumento exagerado da concentração de  $\bullet NO$ .

Em seguida foi necessário determinar condições nas quais células tratadas com DAF2-DA apresentassem respostas robustas de fluorescência em função do número de células e da  $[NO]_{Est}$ . Na figura 4B foi avaliado o efeito que a densidade celular exerce no aumento da fluorescência devido à formação de DAFT. As suspensões de células previamente tratadas com DAF2-DA foram colocadas em uma cubeta de quartzo (total de 2mL de tampão de trabalho) e, em seguida, o doador de  $\bullet NO$  foi introduzido (sper/NO =  $10\mu M$ ).

Conforme esperado, a fluorescência aumenta com a densidade celular. Isto é devido a maior concentração de DAF2 com o aumento do número de células. Contudo, a fluorescência apresenta uma tendência de nivelamento acima de  $3 \times 10^6$  células / mL. Coincidência ou não, esta é a mesma densidade onde um ponto de inflexão para o consumo de  $\bullet NO$  tinha sido observado. Assim, ficou decidido utilizar a densidade celular de 3 milhões de células por mililitro (em 2mL, portanto um número absoluto de  $6 \times 10^6$  células), uma vez que nesta densidade o consumo celular de  $\bullet NO$  supera auto-oxidação de  $\bullet NO$  e apresenta resposta satisfatória de

fluorescência para concentrações fisiológicas de  $\bullet\text{NO}$ . Pode-se argumentar que o uso de densidades maiores seria melhor, mas o ganho seria muito pequeno, tanto para evitar auto-oxidação quanto em resposta de fluorescência. Além disso, como DAF2 apresenta fluorescência intrínseca<sup>93</sup>, a utilização de suspensões celulares contendo grandes quantidades de células leva a uma fluorescência de fundo considerável que reduz a sensibilidade da indicador para baixas concentrações de  $\bullet\text{NO}$ .

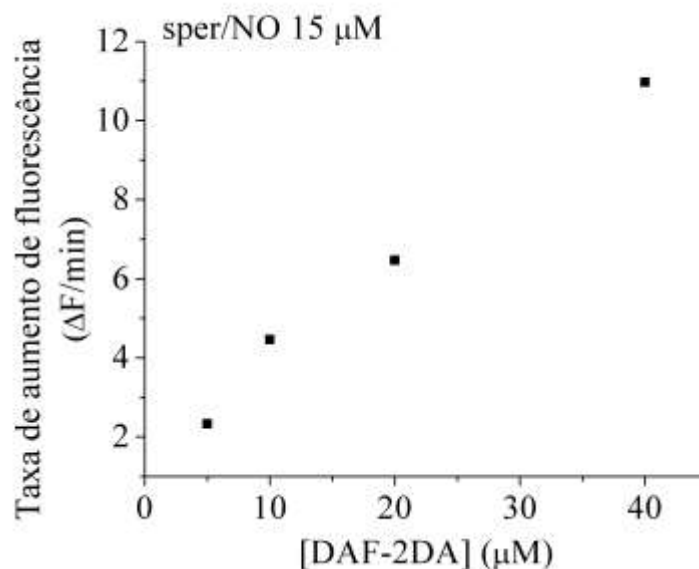


**Figura 4** – Avaliação do número de células para realização dos ensaios de fluorescência. A) variação da concentração de  $\bullet\text{NO}$  em função do número de células. Às células suspensas em PBS/DTPA foi adicionado sper/ $\bullet\text{NO}$  10 $\mu\text{M}$ . Ao final da medida adicionou-se Hemoglobina (15 $\mu\text{M}$ ) para consumir o excesso de  $\bullet\text{NO}$  e restaurar a linha para a base. *Inset*: concentração de  $\bullet\text{NO}$  no estado estacionário para as diferentes suspensões celulares. B) Variação da fluorescência para diferentes suspensões celulares. Células tratadas com DAF2-DA foram suspensas em PBS/DTPA após 1 minuto adicionou-se sper/ $\bullet\text{NO}$ .  $\lambda_{\text{exc}}$  495nm;  $\lambda_{\text{em}}$  520nm.



#### 4.1.3. Cinética de formação de DAFT intracelular em função da concentração de DAF2

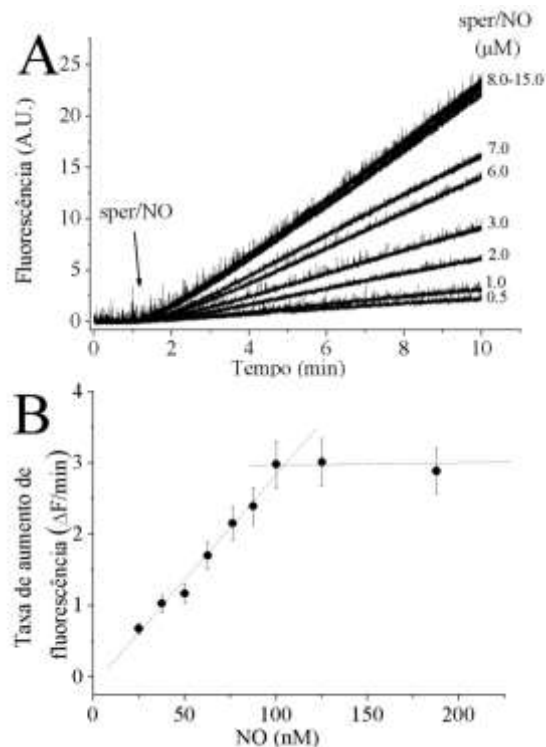
Em seguida, foi estudada a cinética de processos nitrosativos em células usando DAF2 como indicador em função da concentração de  $\bullet\text{NO}$  e do próprio indicador fluorescente. Primeiramente foi avaliada a resposta em função da concentração de DAF2-DA no tratamento, já que é difícil determinar a concentração intracelular de DAF2. Espera-se, entretanto que quanto maior a concentração usada no tratamento maior a concentração de DAF2 intracelular para o mesmo número de células. Para isso, células previamente tratadas com diferentes concentrações de DAF2-DA foram levadas ao espectrofluorímetro e desafiadas com a mesma concentração do doador de  $\bullet\text{NO}$ , sper/NO ( $15\ \mu\text{M}$ ). Como esperado, a taxa de aumento de fluorescência cresce linearmente com a concentração de DAF2-DA no tratamento (figura 5). Este experimento também serviu para padronizar o uso de  $10\ \mu\text{M}$  de DAF2-DA no tratamento no restante do estudo. Esta concentração oferece boa resposta e baixa fluorescência de fundo.



**Figura 5** – Variação da taxa de aumento de fluorescência em células tratadas com diferentes concentrações de DAF2-DA. Células foram tratadas com diferentes concentrações de DAF2-DA por 30 minutos e lavadas duas vezes para remoção do excesso de DAF2. As medidas de fluorescência foram obtidas pela suspensão de  $6 \times 10^6$  células em cubeta de 2 mL e adicionou-se sper/NO  $15\ \mu\text{M}$ .  $\lambda_{\text{ex}}$ . 495nm;  $\lambda_{\text{em}}$ . 520nm

#### 4.1.4. Cinética de formação de DAFT intracelular em função da concentração de $\bullet\text{NO}$ .

Em seguida, avaliou-se a cinética de processos nitrosativos intracelulares usando DAF2 em função da concentração de  $\bullet\text{NO}$ . Células previamente tratadas com DAF2-DA, suspensas em tampão do trabalho a 37°C, e mantidas sob agitação constante foram desafiadas com crescentes concentrações do doador de  $\bullet\text{NO}$  sper/NO. A variação da fluorescência ( $\lambda_{\text{ex}}$ . 495nm;  $\lambda_{\text{em}}$ . 520nm) foi monitorada por período total de 10 minutos no método cinético, com pelo menos 8 minutos após a introdução do doador de  $\bullet\text{NO}$  (figura 6A).



**Figura 6** – Variação da fluorescência em função da concentração de sper/NO A) Células tratadas com 10mM de DAF2-DA foram expostas a diferentes concentrações de sper/NO.  $\lambda_{\text{ex}}$ . 495nm;  $\lambda_{\text{em}}$ . 520nm. B) Taxa de aumento de fluorescência obtida a partir da inclinação das curvas da figura 6A. As taxas foram calculadas no último minuto da medida. Os valores são representativos de 3 medidas independentes  $\pm$  desvio padrão (DP).

É importante observar na figura 6A que não há nenhum aumento de fluorescência antes da introdução do doador de  $\bullet\text{NO}$ , revelando que o processo

nitrosativo de formação de DAFT depende de  $\bullet\text{NO}$ . Imediatamente após a adição de sper/NO, inicia-se o processo de aumento da fluorescência e pouco tempo depois este aumento torna-se linear, mantendo-se assim até o final do ensaio. Este comportamento linear revela três pontos importantes que merecem ser destacados. Primeiro, o aumento contínuo da fluorescência em função do tempo demonstra que DAFT formado apresenta estabilidade dentro do período de tempo de realização dos ensaios e que o composto se acumula no interior das células. Isto é consistente com a irreversibilidade do processo nitrosativo de DAF2. Segundo e mais relevante, a diminuição da concentração de DAF2 devido seu consumo não resulta na diminuição da velocidade, indicando que a diminuição da concentração de DAF2 é muito pequena na escala de tempo do experimento. Por fim, obviamente, não há esgotamento de DAF2. Neste caso, seria observada a mudança na inclinação da curva até a formação de um *plateau* ou mesmo queda na fluorescência em caso de decomposição de DAFT. Tudo isso é coerente e esperado, uma vez que a concentração de DAF2 intracelular, segundo estudos anteriores<sup>93</sup>, deve ser próxima de 1mM, valor que excede muito a concentração acumulada de  $\bullet\text{NO}$  utilizada nos experimentos. Coerentemente, foi observado que DAFT continua a ser formado linearmente em função do tempo por mais de 30 minutos com a máxima concentração de doador utilizada.

Um resultado surpreendente e peculiar surgiu na análise da taxa de aumento de fluorescência (velocidade de formação de DAFT) em função da concentração do doador de  $\bullet\text{NO}$ . A velocidade de formação de DAFT ( $\Delta F/\text{min}$ )<sup>\*2</sup> aumenta linearmente com a concentração de sper/NO (Figura 6B) mas torna-se independente da concentração do doador a partir de um limite. Este comportamento está mais evidente na figura 6B, onde estão apresentados os valores dos coeficientes angulares ( $\Delta F/\text{min}$ ) calculados a partir das curvas da figura 6A em função da concentração de  $\bullet\text{NO}$ . A mudança no perfil cinético é evidente e aguda e ocorre para

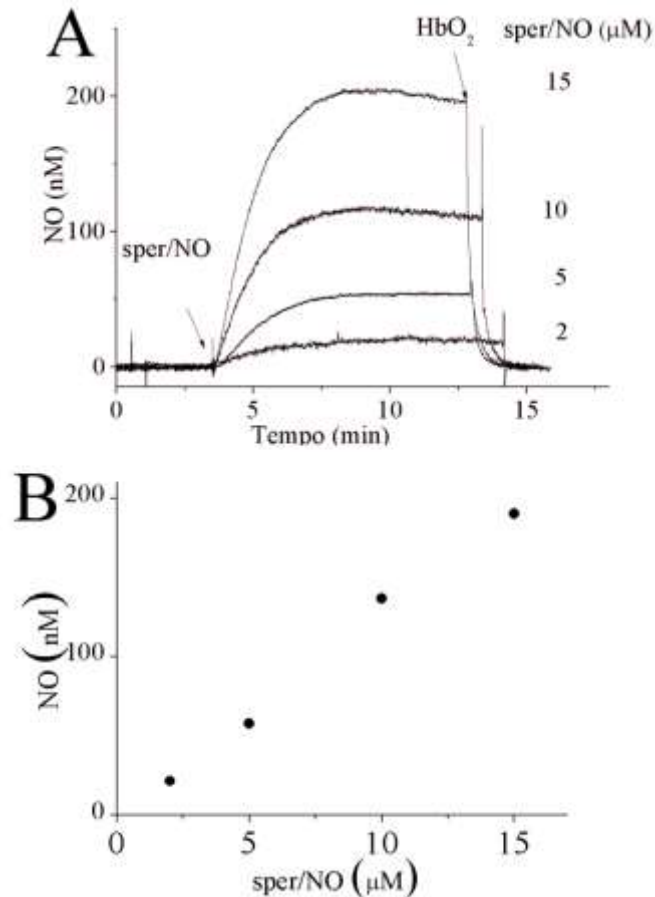
---

\*<sup>2</sup> O coeficiente angular da curva ( $\Delta F/\Delta T$ ) é proporcional à velocidade de formação de DAFT e foi determinado por regressão linear usando o software usando os dados do último minuto do ensaio. Assim, sempre que forem citados os termos “velocidade de formação” ou “taxa de formação” estes termos se referem à relação  $\Delta F/\Delta T$  para os últimos 60 segundos de análise. A escolha de calcular o coeficiente angular no último minuto foi feita para garantir que a concentração de  $\bullet\text{NO}$  tivesse atingido o estado estacionário para todas as concentrações de sper/NO empregadas, minimizando efeitos de variação de concentração de  $\bullet\text{NO}$  no cálculo da velocidade.

concentrações de sper/NO ao redor de  $8\mu\text{M}$  ( $100\text{nM}$  de  $\bullet\text{NO}$ ). Isto é, a velocidade de formação de DAFT apresenta um perfil cinético bifásico, alterando-se de um processo de primeira ordem para zero ordem com relação à  $\bullet\text{NO}$  com o aumento da concentração do próprio  $\bullet\text{NO}$ . Até onde sabemos, o perfil cinético apresentado na figura 6B nunca foi observado anteriormente para processos nitrosativos em geral e de nitrosação de DAFT em particular. Portanto, esse comportamento foi investigado com maiores detalhes.

Para confirmar que o perfil cinético observado estava relacionado com o aumento da concentração de  $\bullet\text{NO}$  foi avaliado como variava a concentração de  $\bullet\text{NO}$  no estado estacionário em função da concentração de sper/NO adicionado às células.

Como é mostrado na figura 7A, ao contrário da velocidade de formação de DAFT, o aumento da concentração de  $\bullet\text{NO}$  é linear em toda a faixa de concentração de sper/NO usada (Figura 7B). Estes dados mostram que a transição cinética de primeira ordem para ordem zero observada para a taxa de formação de DAFT ocorre com concentração de  $\bullet\text{NO}$  entre 120-140 nM, dentro da faixa aceita como fisiológica. Além disso, a concentração de  $\bullet\text{NO}$  se mantém abaixo de 200nM mesmo para a maior concentração de doador de  $\bullet\text{NO}$  usada, o que confirma a afirmação de que a concentração de  $\bullet\text{NO}$  não atinge valor alto o bastante para esgotar o DAF2 intracelular.



**Figura 7** – Concentração de  $\bullet$ NO no estado estacionário para diferentes concentrações de sper/NO. A) Células suspensas em PBS foram expostas a diferentes concentrações de sper/NO. A concentração de  $\bullet$ NO no estado estacionário foi medida amperométricamente com eletrodos seletivos à  $\bullet$ NO. Ao fim de cada medida hemoglobina ( $5\mu\text{M}$ ) era adicionada para consumir todo  $\bullet$ NO presente. B) Variação da concentração de  $\bullet$ NO no estado estacionário em função da concentração de sper/NO utilizada. Os valores foram obtidos a partir das curvas da figura 7A.

Esta descoberta é reveladora e leva a conclusões importantes. Primeiro, a transição cinética de primeira para zero ordem com relação à  $\bullet$ NO ocorre abruptamente, indicando a existência de um componente endógeno esgotável que reage rapidamente com  $\bullet$ NO e que induz estresse nitrosativo. Superóxido é definitivamente um candidato<sup>48; 86</sup>. Segundo, a fase em *plateau* indica que o(s) mecanismo(s) de formação de DAFT nas células possui uma etapa que requer  $\bullet$ NO, mas que não é determinante da velocidade. Estas características são coerentes com mecanismos previamente propostos ilustrados pelas equações (28-30)<sup>86; 94; 95</sup>. Finalmente, a existência da fase de ordem zero com relação à  $\bullet$ NO revelou que a

reação de auto-oxidação de  $\bullet\text{NO}$  é irrelevante para a formação intracelular de DAFT nas condições experimentais. De fato, na ausência de células, onde a formação de DAFT é dependente da reação de auto-oxidação, a formação do *plateau* não foi observada<sup>87; 96</sup>.

#### 4.1.5. Formação de DAFT é dependente de superóxido

O perfil cinético mostrado na figura 6B sugere que a formação de DAFT deva ser dependente de algum outro componente celular cuja concentração limite a velocidade de formação de DAFT, e que este componente deva ser continuamente produzido pelas células, já que a formação de DAFT ocorre com velocidade constante dentro do intervalo de tempo de execução do experimento. Superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) é uma espécie produzida de forma contínua dentro das células durante o processo natural de respiração celular e reage rapidamente com  $\bullet\text{NO}$  ( $k = 1,9 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), levando à formação de peroxinitrito como mencionado na introdução. Importante,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  reconhecidamente estimula processos oxidativos e nitrosativos em combinação com  $\bullet\text{NO}$ , inclusive de DAF2. Conseqüentemente, superóxido torna-se um candidato natural na tentativa de investigar o perfil cinético observado para a formação de DAFT. Para isso, buscamos modular a quantidade superóxido presente nas células para avaliar a participação desta espécie na formação de DAFT intracelular.

Antes, porém, procurou-se por evidências que indicassem que  $\text{O}_2^{\cdot-}$  é de fato a espécie relevante na formação intracelular de DAFT. Inicialmente, avaliou-se o efeito que a concentração de oxigênio exerce na formação de DAFT. Células foram suspensas em tampão de trabalho previamente desoxigenado e mantidas sob agitação por cinco minutos antes da adição de sper/NO a 37°C. O resultado, apresentado na figura 8A, revela que desoxigenação suprime completamente a formação de DAFT em concentrações de sper/NO representativas das duas faixas cinéticas (primeira e zero ordem com relação à  $\bullet\text{NO}$ ). A redução drástica na taxa de formação de DAFT indica que, de alguma forma, oxigênio exerce papel importante no processo.

O envolvimento do oxigênio na velocidade de formação de DAFT deve ocorrer principalmente por dois processos:

i) Reação direta entre  $\bullet\text{NO}$  e  $\text{O}_2$ , com formação de  $\text{NO}_2\bullet$  e  $\text{N}_2\text{O}_3$ , que em última instância leva à formação de DAFT pelos mecanismos de nitrosação e oxidação nitrosilativa (Eq. 3,4,28-30).

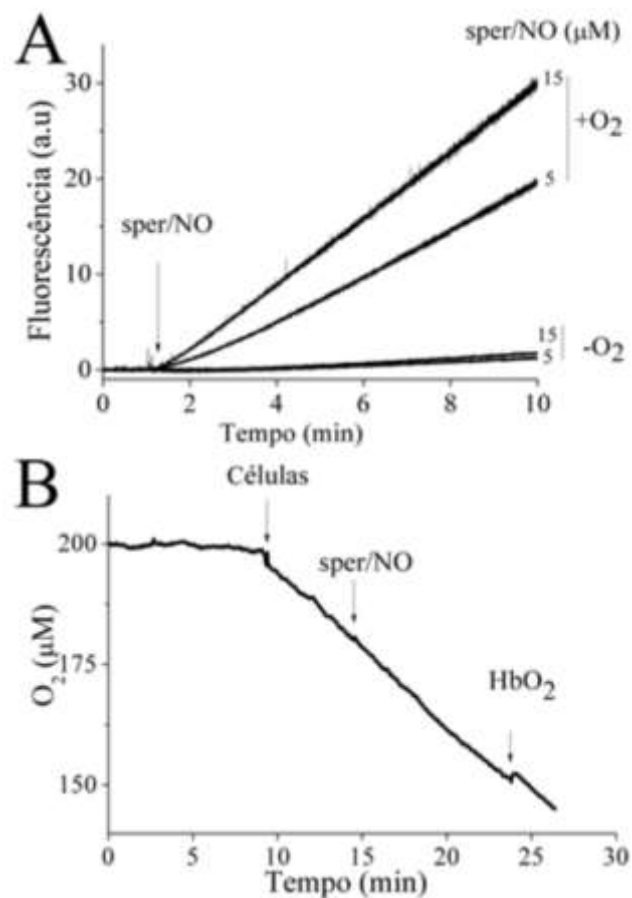
ii) Através da participação do oxigênio em algum processo biológico que resulta em espécies envolvidas no processo de formação de DAFT intracelular, notadamente  $\text{O}_2^{\bullet-}$ .

A primeira hipótese fora descartada. Conforme discutido, auto-oxidação é irrelevante nas condições experimentais do estudo devido às baixas concentrações de  $\bullet\text{NO}$  usadas e a existência do comportamento cinético de ordem zero para formação de DAFT intracelular com relação à concentração de  $\bullet\text{NO}$ . Outra confirmação da irrelevância de tal reação surgiu do acompanhamento da concentração de oxigênio no meio contendo células, antes e após a adição do doador de  $\bullet\text{NO}$ . Este acompanhamento, realizado com eletrodo seletivo de oxigênio, está apresentado na figura 8B.

O experimento mostra que o consumo de  $\text{O}_2$ , via respiração, após adição de células ao tampão de trabalho ocorre a uma taxa constante de aproximadamente  $0,33 \mu\text{M} / \text{min} \times 10^6$  células, em média. Importante, a taxa de consumo de  $\text{O}_2$  não se altera após a adição do doador de  $\bullet\text{NO}$ , e a concentração de  $\text{O}_2$  diminui linearmente de aproximadamente  $180 \mu\text{M}$  até  $150 \mu\text{M}$  no período de 10 minutos após introdução do doador. É relevante ressaltar que nos experimentos representados pela figura 8B, a concentração de  $\text{NO}$  empregada foi de  $15 \mu\text{M}$ , concentração mais alta utilizada na maior parte dos ensaios. Mas, a ausência de efeito no consumo de  $\text{O}_2$  foi observada para as demais concentrações de doador empregadas. Mais importante, apesar da concentração de  $\text{O}_2$  diminuir em função do tempo, a velocidade de formação de DAFT não diminui, mantendo-se constante até o final do ensaio.

Este comportamento também é coerente com a conclusão de que auto-oxidação de  $\bullet\text{NO}$  é irrelevante como mecanismo de formação intracelular de DAFT, já que auto-oxidação depende da concentração de oxigênio e deveria diminuir em função do tempo, acompanhando a diminuição da concentração de  $\text{O}_2$ . Na verdade, deveríamos até esperar aumento do consumo de  $\text{O}_2$  após introdução de  $\bullet\text{NO}$  se

auto-oxidação fosse cineticamente competitiva nestas condições. Igualmente importante, os resultados das figuras 8A e 8B juntos indicam que o processo nitrosativo que leva à formação de DAFT intracelular requer  $O_2$  (figura 8A) mas é cineticamente independente da concentração de  $O_2$  (figura 8B) nas condições experimentais e na faixa de concentração de  $\bullet NO$  e  $O_2$  durante o período observacional. Isto é mais coerente com a participação de uma espécie derivada de  $O_2$ , mas não de  $O_2$  *per se*, apontando diretamente para superóxido.



**Figura 8** – Dependência da formação de DAFT com a concentração de oxigênio e consumo celular de  $O_2$ — A ) Dependência da concentração de oxigênio para nitros(il)ação do DAF-2. Células tratadas com DAF-2 foram submetidas a diferentes concentrações de sper/NO em diferentes condições de oxigenação.  $\lambda_{ex}$ . 495nm.  $\lambda_{em}$ . 520nm. B) Consumo celular de oxigênio. Monitoramento via eletrodo seletivo da concentração de oxigênio em função do tempo. As setas indicam os momentos onde as células foram adicionadas ao tampão, o momento de adição do doador de  $\bullet NO$  e o momento de adição de hemoglobina.

Finalmente, o experimento da figura 8B demonstra que o perfil cinético observado para formação de DAFT não é decorrente de variações nas



concentrações de oxigênio entre as amostras, uma vez que todos os ensaios foram executados nas mesmas condições, nem é decorrente de uma situação de hipóxia, uma vez que no período de tempo de execução dos ensaios não há consumo completo do oxigênio do meio.

Pode-se argumentar que  $\bullet\text{NO}$  deveria inibir a respiração celular e, portanto o consumo de  $\text{O}_2$ , o que não foi observado. Como supramencionado,  $\bullet\text{NO}$  inibe o processo de respiração celular via competição com oxigênio pelo sítio ativo do complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial (Ccox) mesmo para baixas concentrações de  $\bullet\text{NO}$ . Todavia, nas concentrações de  $\text{sp}/\text{NO}$  utilizadas, a razão  $[\text{O}_2] / [\text{NO}]$  é alta demais (900 a 850) para que  $\bullet\text{NO}$  compita eficientemente com  $\text{O}_2$ .

Descartada a hipótese de envolvimento da reação de auto-oxidação de  $\bullet\text{NO}$ , a suspeita de que o envolvimento do oxigênio na formação de DAFT deveria ser referente à participação de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  intracelular aumentou. Superóxido é uma espécie radicalar derivada da redução monoelétrica do oxigênio, que pode ocorrer por diferentes mecanismos em células, inclusive e principalmente na cadeia transportadora de elétrons, onde centros metálicos presentes nos complexos I e III transferem um elétron para o oxigênio, produzindo o radical.

Nas células, o controle desta espécie radicalar é feita em diferentes compartimentos mediante superóxido dismutases, Cu,Zn superóxido dismutase (SOD), presente no citosol, ou pela variante encontrada nas mitocôndrias, Mn superóxido dismutase (MnSOD). Estas enzimas catalisam a dismutação de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  convertendo-o em  $\text{O}_2$  e peróxido de hidrogênio que, por sua vez, é reduzido a água na presença de catalase. Com este controle, células conseguem manter a quantidade de superóxido baixa o bastante para evitar reações potencialmente tóxicas. Situações nas quais este controle torna-se ineficiente provocam aumento da quantidade de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  intracelular, configurando a condição conhecida como estresse oxidativo.

A participação de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  na formação de DAFT foi investigada pelo tratamento de células com PEG-SOD (polietilenoglicol superóxido dismutase), uma forma de Cu, Zn -SOD conjugada à polietilenoglicol, que proporciona à enzima capacidade de ganhar acesso ao interior celular. Esperava-se que em células tratadas com PEG-SOD, a velocidade de dismutação de superóxido fosse aumentada, diminuindo a concentração de superóxido e minimizando sua reação com  $\bullet\text{NO}$ . A dismutação de

superóxido catalisada por Cu, Zn SOD possui elevada constante de velocidade  $k = 1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ <sup>97</sup>, o que torna a reação competitiva com a reação entre  $\bullet\text{NO}$  e  $\text{O}_2^{\bullet-}$ .



A eficiência do tratamento das células com PEG-SOD foi avaliada comparando-se a capacidade que amostras tratadas e não tratadas com PEG-SOD apresentavam de competir com citocromo c por superóxido. A redução de Fe(III)Cit-C para Fe(II)Cit-C por superóxido é acompanhada por aumento da absorção de luz em 550nm, sendo esta reação muito utilizada para detecção de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  em diversas situações e também para determinar atividade superóxido dismutase em geral. Assim, o extrato celular obtido a partir da lise das células com nitrogênio líquido foi colocado na presença de Fe(III)Cit-C, em PBS contendo 100 $\mu\text{M}$  de xantina e xantina oxidase suficiente para gerar um fluxo de 1,1  $\mu\text{M s}^{-1}$  de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . A atividade total de SOD/mg de proteína do extrato aumentou 1,78 vezes na amostra tratada com PEG-SOD quando comparada com a amostra controle (não tratada), confirmando a eficiência do tratamento.

O tratamento com PEG-SOD resultou em acentuada diminuição na taxa de formação de DAFT quando comparada a células controle no mesmo dia (Figura 9A). Este resultado não é uma novidade. Estudos anteriores<sup>86; 87</sup> já observaram esta dependência ao modularem a concentração de superóxido utilizando o sistema xantina/xantina oxidase. Contudo, nestes estudos, a geração de superóxido foi realizada no meio extracelular, o que faz com que boa parte das reações que levam à formação de DAFT sejam dependentes de processos extracelulares. Aqui, a inibição da nitrosação do DAF2 com o tratamento com PEG-SOD, além de indicar o envolvimento de superóxido no processo sugere que a maior parte do processo deve ser intracelular. Esta afirmação é suportada pelo fato de que exclusão de Cu,Zn SOD do tampão de trabalho não exerce nenhum efeito na formação de DAFT. Isto é, a formação de DAFT depende de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  intracelular, uma vez que nem Cu,Zn SOD nem  $\text{O}_2^{\bullet-}$  cruzam membranas celulares.

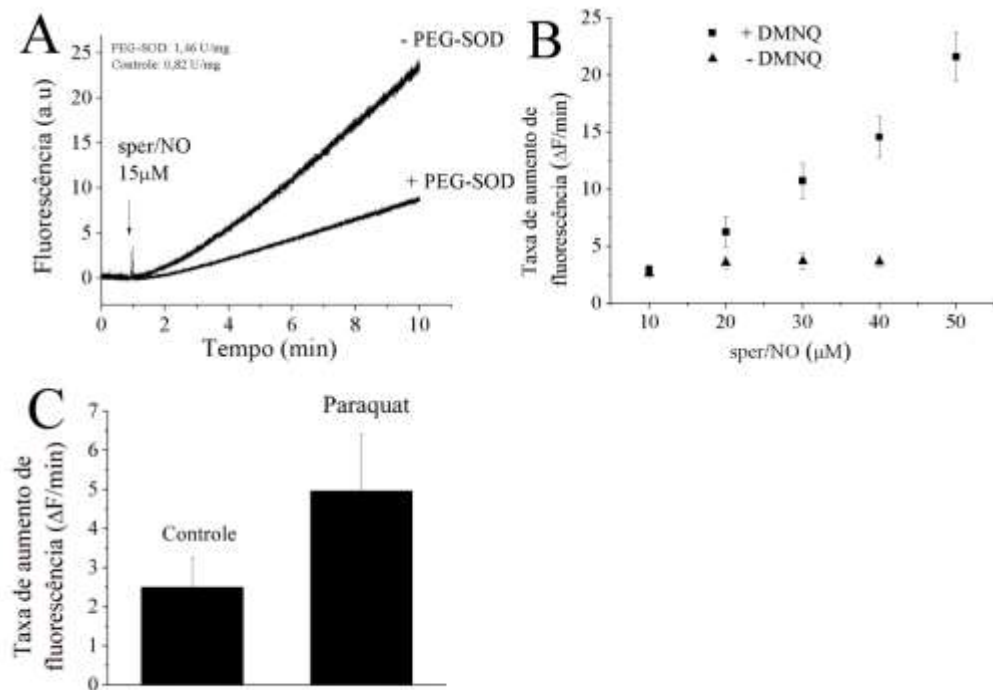
Além deste controle negativo de superóxido, isto é, diminuição da concentração de superóxido intracelular, foram realizados ensaios nos quais a concentração de superóxido foi elevada como controle positivo. Este aumento foi

proporcionado utilizando-se compostos capazes de se engajar em um ciclo redox com conseqüente produção de superóxido intracelular.

Dois compostos foram empregados para este fim: 2,3-dimetoxi-1,4-naftoquinona (DMNQ) e o dicloreto de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridino hidratado (Paraquat). No interior das células, DMNQ é reduzido pela ação de redutases e NAD(P)H produzindo hidroquinona e semiquinonas que sofrem rápida autooxidação levando à formação de  $H_2O_2$  e  $O_2^{\cdot-}$  <sup>98; 99</sup>. Importante destacar que tanto DMNQ quanto Paraquat operam por mecanismos semelhantes que dependem de redutores intracelulares, portanto, somente produzem  $O_2^{\cdot-}$  no interior celular. A presença de DMNQ nas células tratadas com DAF2-DA resultou em aumento considerável da taxa de formação de DAFT (Figura 9B), confirmando que  $O_2^{\cdot-}$  estimula processos nitrosativos em células que levam a formação de DAFT.

Na figura, é possível observar que, ao contrário do grupo controle, a formação de DAFT não sofre transição de primeira ordem para zero ordem com relação à concentração de  $\bullet NO$  mesmo com  $50\mu M$  de sper/NO. Optamos por não aumentar ainda mais a concentração do doador para evitar que outros mecanismos nitrosativos fossem introduzidos como auto-oxidação de  $\bullet NO$ .

Apesar de o experimento sugerir que superóxido seja de fato a espécie limitante responsável pela transição cinética com relação à  $\bullet NO$ , é necessário ter cautela para fazer esta afirmação a partir destes dados. Por exemplo, espécies oxidantes produzidas no ciclo redox do DMNQ podem estimular a formação de DAFT na presença de  $\bullet NO$ . A presença de Paraquat nas células tratadas com DAF2 também aumentou a taxa de formação de DAFT (Figura 9C).



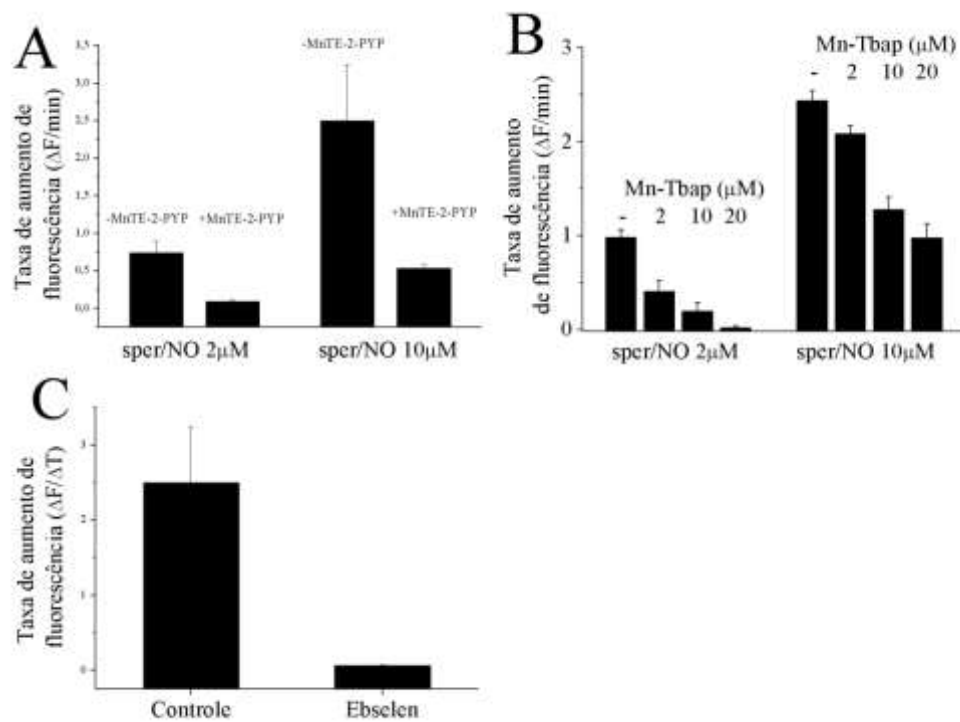
**Figura 9** – A formação de DAFT depende da concentração intracelular de superóxido. A) Variação da fluorescência na presença de PEG-SOD. Células tratadas por 24 horas com PEG-SOD (5μg/mL) foram tratadas com DAF-2DA e posteriormente expostas a  $\bullet$ NO. B) Variação da taxa de fluorescência na presença de DMNQ. Células tratadas com DAF-2 foram expostas a diferentes concentrações de sper/NO na presença e na ausência de DMNQ (20μM). C) Variação da fluorescência na presença de PARAQUAT. Células tratadas com DAF-2 foram expostas a sper/NO (15μM) na presença e na ausência de PARAQUAT (10μM). Os valores são representativos de 3 medidas  $\pm$  D.P. No painel C as médias foram comparadas usando teste t-Student e verificou-se que são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).  $\lambda_{ex}$ . 495nm;  $\lambda_{em}$ . 520nm

#### 4.1.6. O envolvimento de peroxinitrito na formação de DAFT

O provável papel relevante de  $O_2^{\bullet-}$  na formação de DAFT deve necessariamente passar pela formação de peroxinitrito. Como mencionado, esta espécie é formada a partir da reação de recombinação entre  $\bullet$ NO e  $O_2^{\bullet-}$ , uma reação extremamente rápida cuja velocidade aproxima-se do limite difusional. Termodinamicamente, peroxinitrito é um oxidante muito mais forte que seus precursores<sup>14; 100</sup> e pode reagir com diferentes alvos em meio biológico direta ou indiretamente.

Desta forma, foram realizados ensaios com intuito de avaliar o envolvimento do peroxinitrito na formação de DAFT. Inicialmente, procurou-se avaliar se captadores de peroxinitrito (*scavengers*) interferem na taxa de formação de DAFT. Nas figuras 10A e 10B estão apresentados os resultados dos ensaios que utilizaram duas porfirinas de manganês, Mn-TE-2PYP e Mn-Tbap e na figura 10C foi empregado Ebselen. As duas porfirinas são compostos que mimetizam SOD e são permeáveis às membranas celulares<sup>101; 102; 103</sup>, contudo, estudos apontam que ambas são mais eficientes na remoção de ONOO<sup>-</sup> do que na dismutação de O<sub>2</sub><sup>•-</sup><sup>102</sup>. Embora administradas como Mn<sup>3+</sup>, tais complexos podem ser reduzidos no interior celular por redutores como ascorbato, superóxido e mesmo enzimaticamente por flavoenzimas para complexos de Mn<sup>2+</sup>. A reação entre o centro metálico Mn<sup>2+</sup> das porfirinas com ONOO<sup>-</sup> apresenta constante de velocidade na faixa de 10<sup>5</sup> e 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> para MnTbap e Mn-TE-2-PYP, respectivamente, tendo como produtos íons NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, uma espécie não nitrosante, e a forma oxidada da porfirina (Mn<sup>4+</sup>=O)<sup>104; 105; 106</sup>.

Os resultados mostraram que no caso das duas porfirinas houve redução considerável da velocidade de formação de DAFT tanto para concentração de 2 μM quanto para 10μM de sper/NO, que representam as duas faixas cinéticas com relação à •NO. Primeiro este resultado é coerente com o envolvimento de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e peroxinitrito. Segundo, a participação destas espécies é importante para as duas faixas cinéticas de formação de DAFT relativo à concentração de •NO, o que é um indicativo de que o mecanismo de formação de DAFT deve ser o mesmo, independentemente e a despeito da mudança do perfil cinético com relação a •NO. O efeito de filtro interno provocado por absorção de luz das porfirinas na região dos comprimentos de onda de absorção e emissão do DAFT é desprezível quando a concentração de MnTbap < 20μM e a de Mn-TE-2-PYP < 30μM, portanto, tal efeito não pode ser responsável pelas observações realizadas nos experimentos.



**Figura 10** – Efeito de captadores (*scavengers*) de peroxinitrito na taxa de formação de DAFT. A) Aumento da taxa de fluorescência na presença do *scavenger* de ONOO- MnTE-2-PYP. Células tratadas com DAF-2DA foram expostas a diferentes concentrações de sper/NO na presença e na ausência de MnTE-2-PYP (30μM) em PBS sem DTPA. B) Taxa de aumento de fluorescência na presença do *scavenger* Mn-Tbap. Células tratadas com DAF-2DA foram expostas a diferentes concentrações de sper/NO na presença de diferentes concentrações de Mn-Tbap. em PBS sem DTPA. C) Células tratadas com DAF-2DA foram expostas a sper/NO 15μM na presença de Ebselen 10μM em PBS/DTPA. Os valores são representativos de 3 medidas  $\pm$ D.P. O teste t-Student mostrou que as amostras +MnTE-2-PYP e - MnTE-2-PYP são estatisticamente diferentes entre si para uma mesma concentração de sper/NO ( $p < 0,05$ ). lex. 495nm; lem. 520nm.

Os resultados mostraram que no caso das duas porfirinas houve redução considerável da velocidade de formação de DAFT tanto para concentração de 2 μM quanto para 10μM de sper/NO, que representam as duas faixas cinéticas com relação à  $\bullet$ NO. Primeiro este resultado é coerente com o envolvimento de  $O_2^{\bullet -}$  e peroxinitrito. Segundo, a participação destas espécies é importante para as duas faixas cinéticas de formação de DAFT relativo à concentração de  $\bullet$ NO, o que é um indicativo de que o mecanismo de formação de DAFT deve ser o mesmo, independentemente e a despeito da mudança do perfil cinético com relação a  $\bullet$ NO. O efeito de filtro interno provocado por absorção de luz das porfirinas na região dos comprimentos de onda de absorção e emissão do DAFT é desprezível quando a

concentração de MnTbap < 20µM e a de Mn-TE-2-PYP < 30µM, portanto, tal efeito não pode ser responsável pelas observações realizadas nos experimentos.

Testes com eletrodos seletivos revelaram ainda que a concentração de  $[\text{NO}]_{\text{est}}$  não é alterada pela presença das porfirinas, demonstrando que estes compostos não reagem diretamente com  $\bullet\text{NO}$ . Ainda que as porfirinas de Mn possam eventualmente reagir com superóxido, a maior parte deve reagir com peroxinitrito<sup>104; 105</sup>, com conseqüente diminuição da taxa de formação de DAFT.

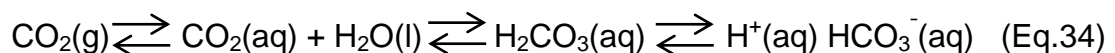
Para fortalecer esta hipótese, experimentos semelhantes foram realizados na presença de ebselen, que reage apenas com peroxinitritoproduzindo o óxido de Se-Ebselen e  $\text{NO}_2^-$  com constante de  $k = 2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ <sup>107; 108</sup>. Nenhum dos produtos é agente nitrosante e o óxido é reduzido no interior celular. Na figura 10C é possível observar que a adição de Ebselen inibe completamente a formação de DAFT nas, sugerindo o envolvimento de peroxitrito.



Testes com concentrações menores de Ebselen foram realizados com o intuito de verificar se a inibição da formação de DAFT poderia ser dependente da concentração do *scavenger*, porém, mesmo empregando concentrações baixas (entre 1 e 0,1 µM) não foi observada formação de DAFT. Este resultado pode estar relacionado com a possibilidade de ebselen ser reduzido por tióis, como da glutatona, por exemplo, em um ciclo catalítico que promove o consumo catalítico de peroxinitrito intracelular, impedindo a formação de DAFT<sup>108; 109</sup>.

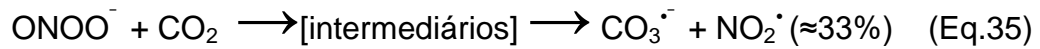


Para confirmar o envolvimento de peroxinitrito na formação de DAFT foram realizados ensaios em tampão de trabalho equilibrado com bicarbonato de sódio, que existe em equilíbrio ácido base com  $\text{CO}_2$ .

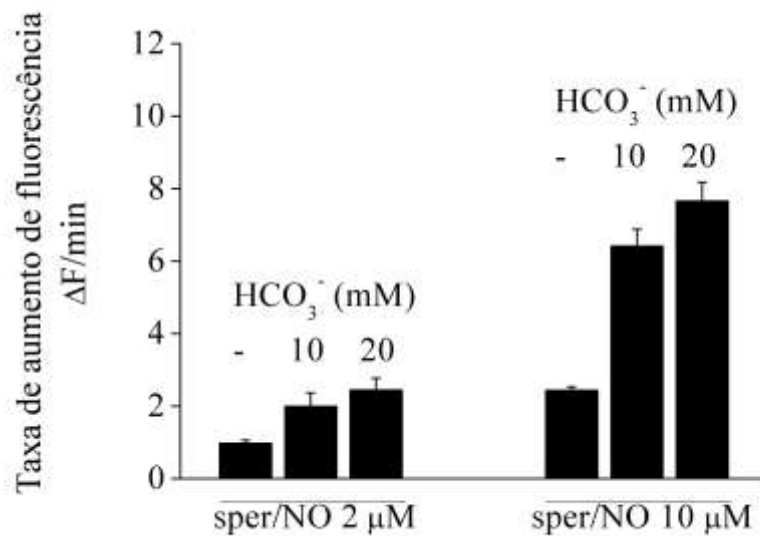


Um dos principais alvos de peroxinitrito no interior das células é a molécula de  $\text{CO}_2$ . Estes dois compostos reagem com velocidade apreciável

( $k=2,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )<sup>110</sup> e o produto desta reação leva à formação de  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{CO}_3^-$  (67%) e  $\text{CO}_3^{\cdot-}$  e  $\text{NO}_2^{\cdot}$  (33%)<sup>111; 112; 113</sup>.



O efeito do equilíbrio de bicarbonato no tampão de trabalho, realizado imediatamente antes de se iniciar a medida e sem alterações no pH, foi avaliado e o resultado é apresentado na figura 11.

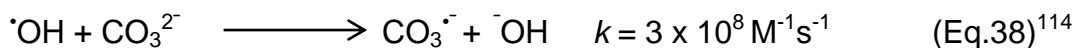
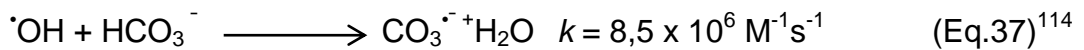
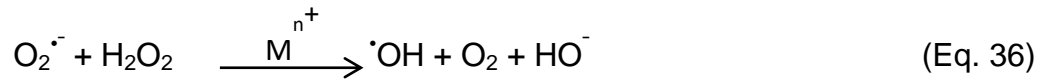


**Figura 11** – Efeito do aumento da concentração de  $\text{CO}_2$  na taxa de formação de DAFT. Células tratadas com DAF-2 foram expostas a  $\bullet\text{NO}$  em tampão de trabalho contendo diferentes concentrações de  $\text{NaHCO}_3$ . O tampão contendo bicarbonato foi preparado imediatamente antes da realização do experimento e o pH era corrigido para 7,4. Os valores são representativos de 3 medidas  $\pm$  D.P. lex. 495; lem. 520nm.

A presença de  $\text{CO}_2$  aumentou consideravelmente a taxa de formação de DAFT nas duas faixas cinéticas relativas à  $\bullet\text{NO}$ , e este aumento é proporcional à concentração de bicarbonato dentro da faixa de concentração empregada no ensaio. Duas conclusões importantes foram extraídas destes experimentos: i) peroxinitrito está envolvido no processo uma vez  $\text{CO}_2$  não reage diretamente com  $\bullet\text{NO}$  nem com superóxido. ii) O aumento da taxa de formação de DAFT indica que a participação de peroxinitrito é indireta e que os radicais derivados de sua decomposição na presença de  $\text{CO}_2$  estimulam formação de DAFT por nitroação via  $\text{N}_2\text{O}_3$  e nitrosilação oxidativa. Estes mecanismos não são novidades e foram sugeridos por Espey et al<sup>86</sup> (equações 28-30).



Apesar de ser conhecido que radical carbonato possa ser produzido por outras vias diferentes da reação com peroxinitrito (equações 36-38)<sup>113; 114; 115</sup>, a velocidade de recombinação entre  $O_2^{\cdot-}$  e  $\cdot NO$  é muito mais alta e, portanto, a formação de radicais a partir da decomposição de peroxinitrito é muito mais plausível, justificando a primeira conclusão proposta acima.



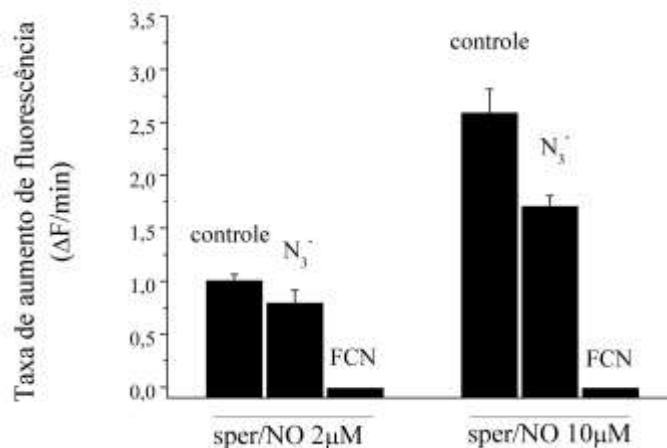
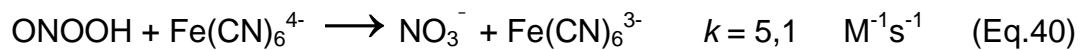
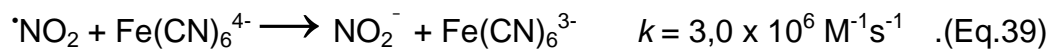
A segunda conclusão é obtida a partir da primeira, pois, se peroxinitrito está envolvido e se  $CO_2$  aumenta o efeito da formação de DAFT, então são os radicais derivados da decomposição de  $ONOO^-$  que atuam na nitrosação do DAF2 e não peroxinitrito. Na verdade, não há reação direta entre peroxinitrito e DAF2 formando DAFT.

#### 4.1.7. Efeito de captadores de radicais e de espécies nitrosantes

Com o objetivo de fortalecer e compreender melhor o envolvimento das espécies radicalares derivadas da decomposição de  $ONOO^-$  ( $HO\cdot$ ;  $NO_2\cdot$ ;  $CO_3^{\cdot-}$ ), foram realizados ensaios nos quais captadores de radicais extracelulares e de espécies nitrosantes foram acrescentadas à suspensão celular. Hexacianoferrato de potássio  $K_4[Fe(CN)_6]$  (FCN) é oxidado por espécies derivadas da decomposição de peroxinitrito<sup>116; 117</sup>. A elevada carga do complexo (-4) dificulta a passagem deste composto através de membranas celulares, com isso, seu efeito é essencialmente extracelular. Dentre as espécies derivadas de  $ONOO^-$ , as que possuem maior permeabilidade às membranas celulares são  $ONOOH$  e  $NO_2\cdot$ <sup>118; 119</sup>, assim, qualquer efeito apresentado pela adição de FCN deve ser, em princípio, pela reação do complexo com uma destas duas espécies.

O efeito de FCN na nitroação do DAF2, apresentado na figura 12, foi de certa forma surpreendente. FCN inibiu a formação intracelular de DAFT quase completamente nas duas faixas de concentração de sper/NO empregadas.

Considerando que em pH 7,4 uma fração do peroxinitrito deve estar na forma protonada (pKa 6,8), e que esta forma decompõe-se mais rápido em meio hidrofóbico<sup>120</sup>, é razoável esperar que esta espécie deve se decompor e liberar radical  $\text{NO}_2^\cdot$ , que migra pra fora da célula onde pode reagir com FCN, o que explica o efeito deste complexo na nitroação do DAFT. Contudo, a decomposição de ácido peroxinitroso é lenta. Um mecanismo mais importante para produção de  $\text{NO}_2^\cdot$  é a decomposição de peroxinitrito por  $\text{CO}_2$ . Ainda que alguma quantidade de ONOOH atravessasse a membrana celular sem se decompor, a velocidade da reação entre  $\text{NO}_2^\cdot$  e FCN é muito maior que a velocidade da reação direta entre ONOOH e FCN<sup>117</sup> conforme mostrado nas equações 39-40. A reação ilustrada pela equação 39 é muito mais lenta que sua quebra homolítica via ácido peroxinitroso ou via reação com  $\text{CO}_2$ .



**Figura 12** – Efeito de captadores de radicais livres extracelulares na formação de DAFT. Células tratadas com DAF-2 foram expostas a diferentes concentrações de sper/NO na presença e ausência de Azida de sódio (1mM) e FCN (1mM) adicionados imediatamente antes das medidas de fluorescência. Os valores são representativos de 3 medidas independentes  $\pm$  D.P. O teste t-Student revelou que as médias das amostras Controle e  $\text{N}_3^-$  são estatisticamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ) para uma mesma concentração de sper/NO.  $\lambda_{ex}$ : 495;  $\lambda_{em}$ : 520nm.

As outras espécies que podem se formar a partir da decomposição de peroxinitrito na presença de  $\text{CO}_2$  são o  $\cdot\text{OH}$  e  $\text{CO}_3^{\cdot-}$ , respectivamente. Porém,  $\cdot\text{OH}$  é tão reativo que deve oxidar imediatamente qualquer outra molécula que encontre antes de conseguir cruzar a membrana celular e é improvável que  $\text{CO}_3^{\cdot-}$  atravesse membranas celulares devido sua carga e solvatação. Portanto, o efeito de FCN não somente reforça a noção de que são radicais derivados de peroxinitrito que estimulam processos nitrosativos como também pode indicar que este radical é principalmente  $\text{NO}_2^{\cdot}$ .

Embora esta seja uma conclusão preliminar,  $\text{NO}_2^{\cdot}$  parece ser uma das principais espécies responsáveis pela formação de DAFT e que este radical, mesmo formado no interior celular, parece passar um período de tempo no exterior das células já que estima-se que o coeficiente de permeabilidade do  $\text{NO}_2^{\cdot}$  seja 4000 vezes maior que do peroxinitrito<sup>118; 119</sup>.

O produto da reação entre  $\text{NO}_2^{\cdot}$  e  $\cdot\text{NO}$  é  $\text{N}_2\text{O}_3$ , uma espécie altamente nitrosante e que poderia contribuir para formação de DAFT. Esta recombinação radicalar embora cineticamente favorecida, não deve ser relevante no interior das células, uma vez que existe grande quantidade de outras moléculas capazes de reagir com  $\text{NO}_2^{\cdot}$  e que estão em concentrações muito maiores que  $\cdot\text{NO}$ , tanto que a formação desta espécie tem sido considerada irrelevante. Porém, considerando a conclusão anterior de que  $\text{NO}_2^{\cdot}$  pode cruzar membranas, é razoável esperar que  $\text{N}_2\text{O}_3$  possa se formar no exterior celular a partir da recombinação com  $\cdot\text{NO}$ , especialmente nas condições experimentais do estudo, onde alvos extracelulares de  $\text{NO}_2^{\cdot}$  são escassos.

A hipótese de que  $\text{N}_2\text{O}_3$  produzido no espaço extracelular possa estar envolvida na formação de DAFT foi avaliada empregando-se azida de sódio ( $\text{NaN}_3$ ) que é considerada como sendo um captador específico de  $\text{N}_2\text{O}_3$ <sup>86</sup>. O efeito de azida ( $\text{N}_3^-$ ) também é mostrado na figura 12. Azida proporcionou redução na taxa de formação de DAFT de cerca de 32% quando a concentração de sper/NO foi de  $10\mu\text{M}$ , porém, seu efeito não foi tão significativo para concentração baixa de sper/NO. A redução apenas parcial da taxa de formação de DAFT e somente para a mais alta concentração de sper/NO testada sugere a existência de dois mecanismos diferentes na nitrosação do DAF2, e que um destes mecanismos prevalece em todas as condições, especialmente para concentrações de  $\cdot\text{NO}$  mais baixas. A existência

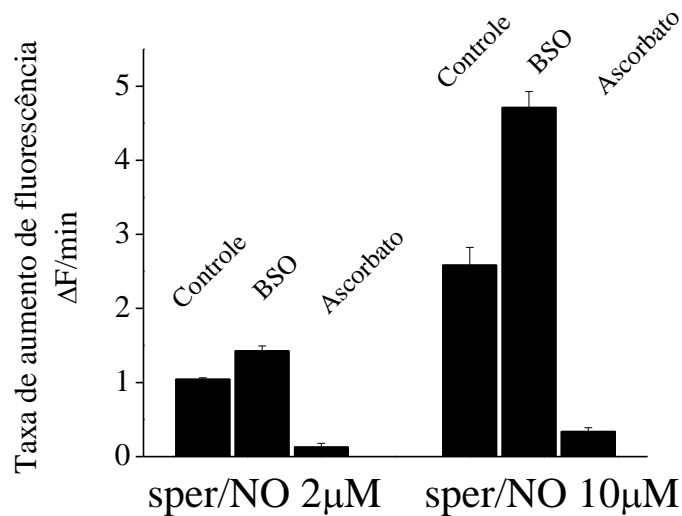
destes dois mecanismos distintos para a formação de DAFT já foi identificada anteriormente<sup>86</sup> e denominados nitrosilação oxidativa (Eq. 29-30) e nitrosação (Eq. 28).

É importante notar que em ambos os mecanismos, DAF2 precisa competir com diversos componentes celulares pelas espécies  $\text{NO}_2^{\cdot}$ ,  $\text{N}_2\text{O}_3$ , indicando que também deve existir correlação positiva entre concentração de DAF2 intracelular e a taxa formação de DAFT. Esta correlação foi verificada em células tratadas com diferentes concentrações de DAF2-DA (Figura 5), portanto, em concordância com as conclusões sobre mecanismos.

#### **4.1.8. Formação de DAFT em diferentes condições de estresse oxidativo**

Em seguida, foi avaliado como a diminuição ou aumento da concentração de dois dos principais antioxidantes endógenos de baixa massa molecular afetam processos nitrosativos através da formação intracelular de DAFT. Para isso, a síntese de glutathione (GSH) foi inibida pelo uso do inibidor da  $\gamma$ -glutamylcisteine sintetase ( $\gamma$ -GCS), enzima envolvida na síntese de GSH<sup>121</sup>, tratando as células com butionina sulfoximina (BSO) por uma noite. Por outro lado, células foram tratadas com ascorbato por mais de 3 horas antes da coleta em culturas separadas.

Estes experimentos também permitem investigar como a nitrosação do DAF2 é afetada em diferentes condições de stress oxidativo. Os resultados estão apresentados na figura 13. Apesar de relatos informando que ascorbato reage diretamente com DAF2, aumentando a fluorescência, o tratamento com ascorbato resultou em inibição quase que completa de formação intracelular de DAFT. Já a inibição da síntese de glutathione por BSO resultou no aumento da formação intracelular de DAFT. Os resultados reforçam a noção de participação de derivados de peroxinitrito na formação de DAFT e são coerentes com a noção de que processos nitrosativos são dependentes das condições redox das células.



**Figura 13** – Efeito da alteração de antioxidantes endógenos na formação de DAFT. Células tratadas com DAF-2DA foram expostas a diferentes concentrações de sper/NO na presença e ausência de ascorbato ou BSO. As células foram incubadas com ascorbato 100 μM por 3 horas antes do tratamento com DAF-2. O tratamento com BSO foi feito incubando as células por 24 horas com 5mM de BSO antes do tratamento com DAF-2DA. Os valores são representativos de 3 medidas independentes ± D.P. O teste t-Student revelou que as médias das amostras Controle e BSO são estatisticamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ) para uma mesma concentração de sper/NO.  $\lambda_{ex}$ . 495;  $\lambda_{em}$ . 520nm.

#### 4.1.9. Formação de DAFT em células ativadas com LPS e formação de s-nitrosotiol

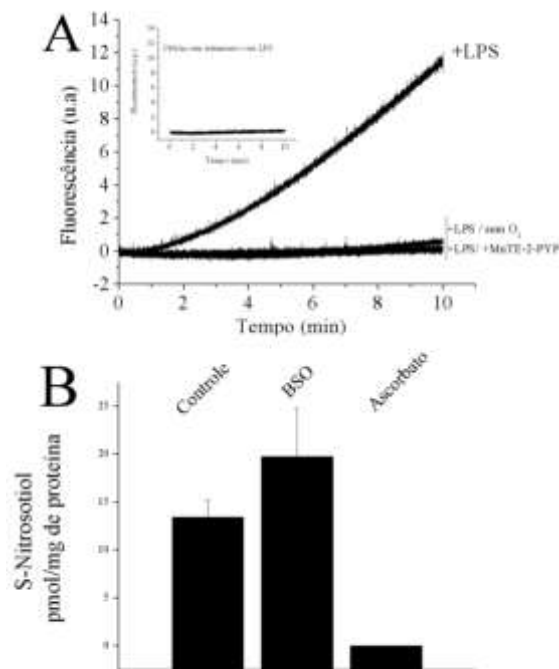
Conforme mencionado, DAF2 é amplamente empregado como uma molécula modelo para estudos de processos nitrosativos. Contudo, esse emprego só possui validade se for capaz de simular, dentro de certos limites, condições que ocorrem naturalmente nas células. Com o intuito de identificar se há alguma correspondência entre os resultados obtidos com processos celulares normais, foram realizados ensaios de formação de DAFT com macrófagos ativados. Também foi avaliada a formação de s-nitrosotióis biológicos.

Lipopolissacarídeo (LPS) é um dos principais componentes existentes em bactérias Gram-negativas. Em contato com macrófagos, LPS ativa várias respostas nestas células, inclusive aumento da expressão de iNOS e conseqüentemente da produção de  $\bullet\text{NO}$ <sup>122</sup>. As células foram expostas a LPS por 24 horas antes da coleta

e posteriormente foram tratadas com DAF2-DA conforme descrito anteriormente, exceto que HbO<sub>2</sub> foi incluída para consumir qualquer •NO que fosse produzido durante o tratamento, minimizando a formação prematura de DAFT antes do início das medidas de fluorescência.

Não houve aumento da fluorescência inicial significativa (de fundo) nestas células com relação a células não tratadas com LPS e avaliadas no mesmo dia, sugerindo que a formação prematura de DAFT foi muito baixa. Coerentemente, a figura 14A mostra que nos primeiros minutos não existe formação de DAFT, demonstrando que o emprego de HbO<sub>2</sub> durante o tratamento foi eficaz em prevenir a formação de DAFT.

Após alguns minutos ocorre aumento da fluorescência decorrente do acúmulo de DAFT no interior das células. Para efeito de comparação, células tratadas com DAF2-DA, mas sem tratamento prévio com LPS, foram submetidas ao mesmo ensaio de fluorescência, porém, neste caso, não há formação de DAFT (*inset* Fig. 14A), o que está de acordo com o fato de que DAFT só é formado na presença de •NO. É mostrado ainda que na ausência de oxigênio não há formação de DAFT, o que é razoável uma vez que tanto a produção de superóxido, como já foi mostrado, quanto a de •NO são dependentes de oxigênio.



**Figura 14** – A formação de DAFT em células ativadas e efeito da antioxidantes na formação s-nitrosotiois. A) Células estimuladas com LPS por 24

horas na presença de  $\text{HbO}_2$  foram coletadas, lavadas e tratadas com DAFT. O efeito da concentração de oxigênio e da presença de MnTE-2-PYP ( $30\mu\text{m}$ ) na formação de DAFT foi avaliado. B) Avaliação da formação s-nitrosoproteínas em células tratadas com BSO e Ascorbato. Os valores são representativos de 3 medidas independentes  $\pm$ D.P. O teste t-Student revelou que as médias das amostras Controle e BSO não são estatisticamente diferentes entre si ( $p > 0,05$ ).  $\lambda_{\text{ex}}$ . 495;  $\lambda_{\text{em}}$ . 520nm.

A formação de DAFT em células ativadas com LPS também é dependente da formação de peroxinitrito, como é mostrado pelo ensaio na presença da porfirina de manganês MnTE-2-PYP. Neste caso, a presença da porfirina resultou em supressão quase que completa da formação de DAFT. Os ensaios na figura 14 são importantes, pois mostram que fatores que interferem na formação de DAFT são independentes da fonte de  $\bullet\text{NO}$  ser extra ou intracelular. Embora importante, não é nenhuma surpresa<sup>123</sup> uma vez que a  $\bullet\text{NO}$  difunde-se livremente, muito rapidamente e não tem membranas celulares como barreiras. A propósito, muitas das propriedades fisiológicas de  $\bullet\text{NO}$  dependem de sua ação paracrina, isto é, da difusão de  $\bullet\text{NO}$  de uma célula para outra e mesmo de um tecido para outro. O caso da vasodilatação é bem ilustrativo,  $\bullet\text{NO}$  é produzido no endotélio sob estímulos físicos ou químicos e atua em células musculares lisas.

Na figura 14B está apresentado como a formação de s-nitrosotiois biológicos é afetada na presença de antioxidante (ascorbato) e com a exaustão de glutathiona pela adição de BSO.

A princípio, toda a proposta de trabalho para o estudo de processo nitrosativos intracelulares seria realizada avaliando-se a formação de s-nitrosotiois como indicador de nitrosação. Seria investigado o mecanismo pelo qual essa modificação pós-traducional se processa e se tais modificações poderiam ou não ser específicas para uma determinada proteína ou grupo de proteínas. Infelizmente ao longo do desenvolvimento do trabalho, foi constatado muita dificuldade em controlar todas as possíveis variáveis envolvidas na formação de s-nitrosotiois e os resultados obtidos, em sua grande maioria, não permitia chegar a nenhuma conclusão segura, mesmo quando todas as etapas do processo foram sistematizadas, desde o cultivo, coleta, contagem, viabilidade celular, concentrações de  $\text{O}_2$  e  $\bullet\text{NO}$  durante o ensaio, até a preparação da amostra e quantificação de s-nitrosotiois biológicos.

De qualquer forma, a formação de s-nitrosotiois foi qualitativamente similar à formação de DAFT em células tratadas com BSO. Também, o tratamento com

ascorbato resultou na redução na taxa de formação de s-nitrosotiois, embora que para ascorbato, a diminuição pode ter duas origens, prevenção e redução de s-nitrosotiois, diferentemente de DAFT, onde o produto não pode ser reduzido por ascorbato.

Estes resultados indicam que é possível que s-nitrosotiois sejam formados pelos mesmos mecanismos encontrados para DAFT, porém, não é possível afirmar que sejam os únicos mecanismos operantes neste processo. De fato, como já foi mostrado em outros trabalhos <sup>47</sup>, a formação de s-nitrosotiol é favorecida pela desoxigenação, o que difere muito do mecanismo de formação de DAFT, que ao contrário, é inibido pela ausência de oxigênio. Isto por si só já sugere a existência de outros mecanismos pelos quais s-nitrosotiol possa vir a ser formado nas células. Portanto, é preciso ter cautela na extrapolação dos resultados obtidos na análise da nitrosação do DAF2 para formação de s-nitrosotiois biológicos.

#### 4.1.10. Discussão – Parte I

A formação intracelular de DAFT inicia-se a partir da recombinação entre os radicais  $\bullet\text{NO}$  e  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , com conseqüente produção de  $\text{ONOO}^-$ . Esta afirmação está fundamentada nos ensaios onde as concentrações destas espécies foram alteradas, de forma independente, resultando em alterações na taxa de formação de DAFT. Observou-se que a exposição das células a condições de hipóxia (Figura 8A) e adição de PEG-SOD (Figura 9A) resulta na redução da velocidade de formação de DAFT.

Nos dois casos, a diminuição da velocidade de formação de DAFT está relacionada com a diminuição da concentração de superóxido intracelular. Efeito contrário é observado quando a concentração de superóxido intracelular é aumentada pela adição de compostos capazes de produzir superóxido por ciclos redox, como DMNQ e Paraquat (Figuras 9B-C). Com isso, conclui-se que, nas células,  $\text{O}_2^{\bullet-}$  é a espécie que redireciona  $\bullet\text{NO}$  de sua ação direta, ativação de enzimas como sGC, para ação indireta dependente de seus derivados. De maneira análoga, a formação de DAFT depende fundamentalmente de  $\bullet\text{NO}$ ; não há formação



de DAFT na ausência de  $\bullet\text{NO}$ , pois não há aumento de fluorescência antes da adição de sper/NO (Figura 6).

Portanto, a formação de DAFT deve passar por peroxinitrito. Coerentemente, a inibição da formação de DAFT observada na presença de captadores (*scavengers*) de peroxinitrito como as porfirinas de manganês (MnTbap e MnTe-2-PYP) e Ebselen (Figura 10A-C) revelou que peroxinitrito corresponde a um intermediário importante no processo de formação de DAFT.

Consistentemente, a diminuição da concentração de GSH, presente nas células em altas concentrações e que consome  $\text{ONOO}^-$ , resultou em aumento da velocidade de formação de DAFT. Com isso, fica claro o intermédio de  $\text{ONOO}^-$  no processo, porém, resta a dúvida se DAF-2 e  $\text{ONOO}^-$  reagem diretamente ou se outras etapas e outras espécies estão envolvidas.

Foi observado que aumento da concentração de  $\text{CO}_2$ , obtido pela presença de bicarbonato no tampão de trabalho, resulta no aumento da velocidade de formação de DAFT. Teoricamente, a presença aumentada de  $\text{CO}_2$  resulta no aumento da produção de espécies derivadas da decomposição homolítica de peroxinitrito e, portanto, sugere o envolvimento destas espécies nos processos de formação de DAFT. Como já foi discutido,  $\text{CO}_2$  reage com  $\text{ONOO}^-$ , produzindo radicais  $\text{NO}_2\bullet$  e  $\text{CO}_3^{\bullet-}$  e estes radicais podem se envolver em processos que resultam na formação de DAFT como discutido na introdução.

Estas observações deixam claro que o processo pelo qual DAFT é formado no interior das células, em nosso modelo experimental, consiste nos mecanismos já conhecidos e denominados nitrosação (Eq. 28) e nitrosilação oxidativa (Eq. 29-30). A inibição promovida por antioxidantes intra e extracelulares, ascorbato e FCN, respectivamente, revelou que o mecanismo de nitrosilação oxidativa é o principal responsável pela formação de DAFT. Contudo, a inibição parcial observada na presença de azida de sódio ( $\text{N}_3^-$ ) demonstra que  $\text{N}_2\text{O}_3$  pode causar formação de DAFT via nitrosação, um processo que se torna mais relevante com o aumento da concentração de  $\bullet\text{NO}$ , como esperado, já que a formação deste agente nitrosante depende da recombinação entre  $\bullet\text{NO}$  e  $\text{NO}_2\bullet$ .

Provavelmente, esta recombinação ocorre no ambiente extracelular. Os experimentos com FCN sugerem que a molécula de  $\text{NO}_2\bullet$  difunde-se para fora das células onde a recombinação com  $\bullet\text{NO}$  para formar  $\text{N}_2\text{O}_3$  é mais competitiva

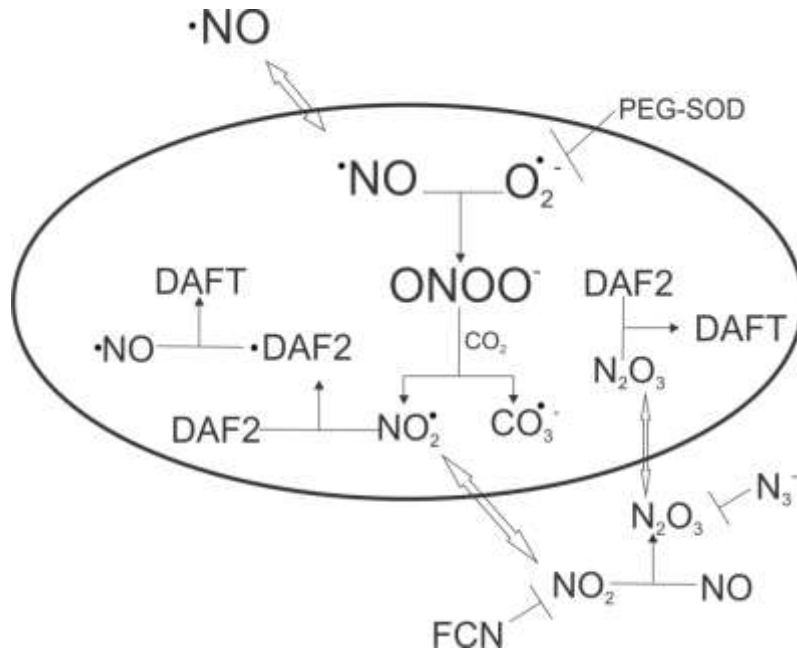
cineticamente. A recombinação entre  $\bullet\text{NO}$  e  $\text{NO}_2\cdot$  embora cineticamente favorável, é irrelevante no interior das células, pois existe grande quantidade de competidores que reagem com  $\text{NO}_2\cdot$  e que estão em concentrações muito maiores que  $\bullet\text{NO}$ .

A completa inibição da formação de DAFT na presença de FCN extracelular foi de certa forma surpreendente. Além de sugerir que  $\text{NO}_2\cdot$  exerce papel protagonista em processos nitrosativos em células, este resultado também indica que pode cruzar membranas biológicas e popular ambiente extracelular antes de oxidar ou reagir com constituintes celulares. Das espécies geradas pelo processo de degradação de  $\text{ONOO}^-$  via quebra homolítica ( $\text{OH}\cdot$ ,  $\text{NO}_2\cdot$  e  $\text{CO}_3^{\cdot-}$ ),  $\text{NO}_2\cdot$  é seguramente a menos agressiva<sup>124</sup> (menor potencial redox) e reage apenas lentamente com ácidos graxos insaturados via oxidação e adição, muito mais lentamente do que  $\text{OH}\cdot$  e  $\text{CO}_3^{\cdot-}$ . Desta forma,  $\text{NO}_2\cdot$  pode mostrar mais seletividade do que  $\text{OH}\cdot$  e  $\text{CO}_3^{\cdot-}$  quanto a seus alvos celulares dando-lhe talvez tempo suficiente para atravessar membranas antes de ser consumido ou mesmo reagir com DAF2. Isto explicaria o fato de que FCN extracelular previne a formação intracelular de DAFT por completo.

De acordo com esta interpretação, e como colocado anteriormente,  $\text{NO}_2\cdot$  pode exercer papel autocrino e paracrino e talvez seja a única espécie pela qual o poder oxidativo de  $\text{ONOO}^-$  possa ser transportado para células vizinhas.

Teoricamente, o padrão oxidativo derivado de  $\text{ONOO}^-$  em células produtoras de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (sujeitas a  $\text{ONOO}^-$  e todos seus derivados) pode ser diferente de células vizinhas e não produtoras de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (sujeita apenas a  $\text{NO}_2\cdot$ ). Importante destacar que o  $\text{NO}_2\cdot$  tem origem na decomposição homolítica de peroxinitrito já que nas nossas condições experimentais a reação de auto-oxidação de  $\bullet\text{NO}$  foi considerada irrelevante por duas razões: primeiro por trabalharmos com baixas concentrações de  $\bullet\text{NO}$ ; para que tal reação se processe em velocidades apreciáveis seriam necessárias concentrações mais elevadas de  $\bullet\text{NO}$ , uma vez que a reação é de segunda ordem cinética com relação à  $\bullet\text{NO}$ . Segundo que, se ocorresse auto-oxidação de  $\bullet\text{NO}$ , o *plateau* apresentado na figura 6B não seria observado.

Todas estas informações estão resumidas na figura 15, que apresenta um esquema demonstrando as espécies intra e extracelulares envolvidas na formação de DAFT.



**Figura 15** – Esquema para formação de DAFT intracelular. O esquema representa a formação de DAFT pelos dois mecanismos: nitrosilação oxidativa e nitroação.

O mecanismo de formação de DAFT intra e extracelular estimulado por  $O_2^{\cdot-}$  foi previamente estudado <sup>86; 87; 94</sup>. Tais estudos demonstraram e concordam que óxido nítrico não reage diretamente com DAF2 e que a formação de DAFT depende de radicais derivados de peroxinitrito <sup>87</sup>, particularmente  $NO_2^{\cdot}$ . Estes estudos também concordam que a formação de DAFT ocorre pelos mesmos mecanismos químicos de nitroação e nitrosilação oxidativa. Portanto, do ponto de vista de mecanismos, nossos resultados não apresentaram nenhuma surpresa.

Os dois mecanismos envolvem espécies radicalares oxidantes ( $NO_2^{\cdot}$ ,  $CO_3^{\cdot-}$ ). Devido à alta reatividade, tais espécies dificilmente apresentam especificidade e que, portanto, devem reagir com uma grande variedade de componentes celulares por processos idênticos aos que produzem nitroação de DAF-2.

A formação de s-nitrosotiois está sujeita aos mesmos efeitos que a formação de DAFT quando as células são expostas à ascorbato e glutatona, demonstrando que existe correspondência entre os mecanismos que levam à nitroação de DAF-2 e aos mecanismos de formação de s-nitrosotiois. Todavia, s-nitroação de alvos biológicos pode ocorrer por mecanismos adicionais. De fato, a formação de s-nitrosoproteínas é favorecida pela desoxigenação <sup>47; 125</sup> e parece seguir outros mecanismos que envolvem ferro quelatável e complexos de ferro dinitrosilo <sup>47; 81; 123</sup>.

É importante ressaltar que embora DAF-2 compita com vários outros componentes celulares por estas espécies oxidantes, a detecção de  $\bullet\text{NO}$  utilizando este indicador é possível graças à concentração elevada de DAF-2 no interior das células. Realmente, como mostrado na figura 5, a formação de DAFT é proporcional à quantidade de DAF-2 empregada no tratamento. A estabilidade e a propriedade que DAFT possui de se acumular no interior das células é outro fator importante para garantir a detecção de  $\bullet\text{NO}$ .

O fato mais marcante, e até onde sabemos, inédito, foi o perfil cinético peculiar obtido para a taxa de formação de DAFT com relação a concentração de  $\bullet\text{NO}$  (Figura 6 A-B). A taxa de formação de DAFT aumenta proporcionalmente a concentração de  $\bullet\text{NO}$  inicialmente, contudo, surpreendentemente, torna-se independente da concentração de  $\bullet\text{NO}$  quando esta supera o limite de 100-110 nM (Figura 6B). As razões que levam a esta transição cinética de primeira ordem para zero ordem relativa à  $\bullet\text{NO}$  foram investigadas a partir das espécies formadas pela recombinação entre  $\bullet\text{NO}$  e  $\text{O}_2^{\bullet-}$ .

A transição poderia ser facilmente explicada pela reação direta entre  $\text{ONOO}^-$  e DAF2 da mesma forma como ocorre com alguns indicadores sensíveis a  $\text{ONOO}^-$  derivadas do ácido borônico<sup>126; 127; 128</sup>, porém, alguns estudos mostraram convincentemente que diaminas vicinais, como DAF-2, não reagem diretamente com  $\text{ONOO}^-$ <sup>86; 88; 129</sup>. Além disso, os efeitos inibitórios promovidos por FCN, ascorbato e  $\text{N}_3^-$  reforçam a hipótese de que a nitrosação ocorre via os radicais derivados de  $\text{ONOO}^-$ . Para compreender o perfil cinético observado nos ensaios é necessário ter em mente que o processo depende e é limitado por  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e que existe competição entre SOD endógenas e  $\bullet\text{NO}$  pelo radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$ .

Quando a concentração de  $\bullet\text{NO}$  é baixa, a taxa de formação de DAFT deve ser proporcional à concentração de  $\bullet\text{NO}$  (fase de primeira ordem), pois, nessa situação, parte do  $\text{O}_2^{\bullet-}$  produzido pelas células deixa de reagir com SOD para reagir com  $\bullet\text{NO}$ , produzindo  $\text{ONOO}^-$  que, por sua vez, estimula o processo nitrosativo a partir da formação dos radicais derivados de sua decomposição. A dependência com relação à concentração de  $\bullet\text{NO}$  se mantém até que a concentração de  $\bullet\text{NO}$  seja alta o bastante para vencer a competição com SOD pelos radicais  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . A partir desta concentração de  $\bullet\text{NO}$ , praticamente todo superóxido produzido pelas células é direcionado para reação com  $\bullet\text{NO}$  e a formação de DAFT passa a ser independente

da concentração de  $\bullet\text{NO}$ , iniciando a fase de ordem zero. Aumentar  $\bullet\text{NO}$  ainda mais a partir deste limite, não resulta em aumento da formação de peroxinitrito e conseqüentemente não resulta no aumento da taxa de formação de DAFT.

É importante ressaltar que a independência com relação à  $\bullet\text{NO}$  não significa que a produção do DAFT foi interrompida. A mudança no perfil cinético reflete apenas o fato de que a velocidade de formação de DAFT não aumenta devido ao esgotamento do reagente limitante superóxido.

A fase de ordem zero com relação à  $\bullet\text{NO}$  se manteve até concentrações de  $\text{per/NO}$  próximas a  $40\mu\text{M}$ . Não foram realizados testes com concentrações acima deste valor por considerarmos que levaria a concentrações de  $\bullet\text{NO}$  muito acima do que é normalmente encontrado nas células e isso certamente dificultaria a análise do mecanismo de nitrosação. Contudo, é possível especular a formação de DAFT deve voltar a aumentar com elevadas concentrações de  $\text{NO}$  pois a reação de auto-oxidação pode tornar-se relevante, o que resultaria na produção de  $\text{NO}_2\bullet$  e  $\text{N}_2\text{O}_3$  independentemente de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ .

Apesar de inédito, o perfil cinético observado em nossos estudos foi previsto por simulações cinéticas<sup>13</sup>. Interessante que este perfil cinético é diferente do perfil observado nos estudos de Espey et. al.<sup>86</sup> ainda que nos dois estudos a formação de DAFT depende de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e peroxinitrito e ocorre pelos mesmos mecanismos (nitrosação e nitrosilação oxidativa). No trabalho citado, os autores optaram por gerar superóxido fora das células utilizando xantina e xantina oxidase para simular certas condições inflamatórias. Assim, eles estudaram processos nitrosativos estimulados por  $\text{O}_2^{\bullet-}$  variando tanto a concentração de  $\bullet\text{NO}$ , pela adição de doador, quanto à concentração de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e constataram que a formação de DAFT aumenta com a concentração de  $\bullet\text{NO}$  até que o fluxo de  $\bullet\text{NO}$  se iguale ao fluxo de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . A partir deste ponto, o aumento da concentração de  $\bullet\text{NO}$  resulta na diminuição da formação de DAFT, dando origem ao perfil cinético que ficou conhecido como *bell-shaped* (forma de sino, em tradução literal). Não existe diferença na explicação para a fase de aumento da formação de DAFT.

O intrigante no estudo de Espey et. al.<sup>86</sup> é a queda da formação de DAFT quando o fluxo de  $\bullet\text{NO}$  supera o fluxo de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . A explicação do grupo para esta diminuição é que o excesso de  $\bullet\text{NO}$  reage com o radical  $\text{CO}_3^{\bullet-}$ , inibindo o

mecanismo de nitrosilação oxidativa, que é de longe o mecanismo mais relevante para formação de DAFT<sup>13; 86; 130</sup>.

Compreendendo a origem do perfil *bell-shaped* fica fácil entender a razão pela qual os perfis cinéticos observados nos dois estudos são diferentes para os mesmos processos ocorrendo pelos mesmos mecanismos. A diferença reside na diferença da abordagem experimental entre dois estudos. Enquanto que no trabalho de Espey et al.<sup>86</sup> a geração de superóxido é extracelular, no nosso estudo a geração de superóxido é endógena. A geração endógena de  $O_2^{\cdot-}$  faz com que os radicais produzidos pela decomposição de peroxinitrito tenham uma miríade de outras moléculas para reagir em vez de reagirem com  $\bullet NO$ , de modo que exista competição entre  $\bullet NO$ , DAF2 e outros componentes celulares (CC) por  $\bullet NO_2$  e  $CO_3^{\cdot-}$ . Com isso, mesmo concentrações mais elevadas de  $\bullet NO$  não competem efetivamente por  $NO_2^{\cdot}$  e  $CO_3^{\cdot-}$  com os outros componentes celulares exógenos e endógenos (DAF2 e CC) que estão presentes em concentrações muito maiores que  $\bullet NO$  e, portanto consomem os radicais derivados da decomposição de  $ONOO^-$ .



No caso da geração de superóxido extracelular, como feito por Espey et.al<sup>86</sup>, as espécies derivadas da decomposição de peroxinitrito são produzidas do lado de fora das células. Neste ambiente rico em  $\bullet NO$  e ausente de outros competidores, é aceitável que  $\bullet NO$  reaja com os radicais que levam à formação de DAFT, diminuindo formação de DAFT e resultando no perfil *bell-shaped*.

Depois de avaliar todos os fatores que influenciam a velocidade de formação de DAFT e estabelecermos que no nosso sistema os dois mecanismos (nitrosação e nitrosilação oxidativa) se processam simultaneamente, tentamos realizar uma análise cinética para buscar obter uma equação de velocidade que fosse condizente com nossas observações experimentais. O resultado da análise cinética é mostrado de forma resumida na equações 42-50. O modelo e a demonstração das equações abaixo, além das considerações assumidas no modelo podem ser conferidas no apêndice A.

De acordo com este modelo, a lei de velocidade de formação de DAFT segue a equação 42.

$$\frac{d[DAFT]}{dt} = k_{obs}[DAF2][O_2^{\cdot-}][NO] \quad (\text{Eq. 42})$$

onde,

$$k_{obs} = \frac{k_4 k_3}{k_6 [CC]} \quad (\text{Eq. 43})$$

[CC] representa a concentração de todos componentes celulares genéricos que reagem com radicais derivados de peroxinitrito em competição com DAF2. Somadas as concentrações destes constituintes celulares, [CC] não somente é muito superior à concentração de DAF2 como também deve ser muito superior à quantidade de espécies reativas derivadas de peroxinitrito acumuladas no período observacional de 10 minutos. Desta forma, pode-se assumir que [CC] é constante durante este intervalo, e incorporada da constante de velocidade observada, conforme equação 43 mostra.

A equação 42 reflete todas as características observadas experimentalmente. A velocidade de formação de DAFT é diretamente proporcional à concentração de  $\cdot\text{NO}$ , de DAF-2 e de  $O_2^{\cdot-}$ . Por exemplo, a taxa de formação de DAFT aumenta com a concentração intracelular de DAF2 (crescentes concentrações de DAF2-DA utilizadas no tratamento), com  $[O_2^{\cdot-}]$  (uso de DMNQ e paraquat), e (inicialmente) com a concentração de  $\cdot\text{NO}$  (aumento da concentração do doador sper/NO). A equação 42 prevê que a taxa de formação de DAFT seja inversamente proporcional a quaisquer componentes celulares que reagem com espécies reativas derivadas da reação entre  $\cdot\text{NO}$  e  $O_2^{\cdot-}$ . Esta característica foi observada experimentalmente em duas situações diametralmente opostas, pela inibição da biossíntese de GSH e pelo tratamento de células com ascorbato, que resultaram respectivamente em aumento e diminuição da taxa de formação de DAFT.

Igualmente importante essa equação prevê a transição cinética de primeira ordem para zero ordem com relação à  $\cdot\text{NO}$ . Mas para revelar esta característica é necessário analisar como varia a concentração de  $O_2^{\cdot-}$  com o aumento da concentração de  $\cdot\text{NO}$ . A concentração de superóxido é dada pela equação 44 (apêndice).

$$[O_2^{\cdot-}] = \frac{k_1}{k_2[SOD] + k_3[NO]} \quad (\text{Eq. 44})$$

Nesta equação,  $k_1$  representa o fluxo de superóxido,  $k_2$  está relacionada com a reação de dismutação de  $O_2^{\bullet-}$  catalisada por SOD e  $k_3$  o consumo de  $O_2^{\bullet-}$  dependente de  $\bullet NO$  via formação de peroxinitrito. Quando a concentração de  $\bullet NO$  é baixa, a dismutação de  $O_2^{\bullet-}$  promovida por SOD prevalece sobre a reação de  $\bullet NO$  com  $O_2^{\bullet-}$  de tal forma que  $k_2 [SOD] \gg k_3 [NO]$ , o que resulta na equação 45.

$$[O_2^{\bullet-}] = \frac{k_1}{k_2[SOD]} \quad (\text{Eq. 45})$$

Aplicando a equação 45 na equação 41 e tomando  $[SOD]$  como uma constante, obtemos:

$$\frac{d[DAFT]}{dt} = \frac{k'_{obs}[DAF][NO]}{[SOD]} \quad (\text{Eq. 46})$$

$$\text{com } k'_{obs} = \frac{k_{obs}k_1}{k_2} \quad (\text{Eq. 47})$$

Esta equação reflete a observação de que a velocidade de formação de DAFT varia linearmente com a concentração de  $\bullet NO$  para concentrações baixas de  $\bullet NO$ . Isto é, a equação prevê que a taxa de formação de DAFT será de primeira ordem relativo à concentração de  $\bullet NO$  enquanto  $k_2 [SOD] \gg k_3 [NO]$ . Também prevê que a taxa de formação de DAFT deveria ser inversamente proporcional à concentração de SOD, como observado em experimentos utilizando PEG-SOD. Experimentalmente, a velocidade de formação de DAFT torna-se independente da concentração de  $\bullet NO$  para concentrações mais altas. Isso somente é possível se  $k_2 [SOD] \ll k_3 [NO]$ . Neste caso, a equação 44 simplifica-se para:

$$[O_2^{\bullet-}] = \frac{k_1}{k_3[NO]} \quad (\text{Eq. 48})$$

Quando esta expressão para superóxido é substituída na equação 42, obtém-se:

$$\frac{d[DAFT]}{dt} = k_{obs}''[DAF] \quad (\text{Eq. 49})$$

Esta equação demonstra a independência da velocidade de formação de DAFT relativo à  $[\bullet NO]$  para concentrações de  $\bullet NO$  mais elevadas, representando a



fase cinética de zero ordem com relação à  $\bullet\text{NO}$  observada experimentalmente. A obtenção de equações de velocidade para formação de DAFT que são coerentes com várias observações experimentais a partir de uma série de considerações simples reforça a consistência dos mecanismos propostos pelo estudo para processos nitrosativos intracelulares. Além disso, as observações experimentais aliadas ao modelo cinético proposto nos permite fazer análises que possuem implicações do ponto de vista analítico e biológico.

Do ponto de vista analítico, é evidente o uso de DAF como indicador da presença de  $\bullet\text{NO}$  depende de vários fatores, muitos deles pouco controláveis pelo analista. Um dos mais importantes é a concentração de DAF2. O tratamento das células é um dos pontos cruciais e deve ser rigorosamente analisado para garantir que a quantidade de DAF2 presente no interior das células seja suficientemente alta para detecção de  $\bullet\text{NO}$ , porém, sem que seja elevada demais a ponto de sua fluorescência intrínseca diminuir a sensibilidade do indicador. Outros procedimentos importantes para minimizar diferenças na concentração de DAF2 é realizar lavagens das células imediatamente antes da análise e realizar controles periódicos para ter certeza de que não houve migração de DAF2 para fora das células.

A influência que a concentração de espécies como oxigênio, superóxido, SODs, antioxidantes, e o *status* redox das células na formação de DAFT torna comparações entre amostras desafiadas de formas diferentes uma medida questionável, pois procedimentos diferentes podem resultar em condições intracelulares distintas. A resposta de DAF a  $\bullet\text{NO}$  é muito sensível a concentração de SOD, GSH, e ascorbato por exemplo. A remoção de metais por quelantes extracelulares como DTPA também representa uma forma importante para evitar alterações no *status* redox das células. Já o controle da concentração de oxigênio é fundamental uma vez que tanto a produção de superóxido quanto o consumo de  $\bullet\text{NO}$  estão vinculados a esta espécie. Finalmente, do ponto de vista quantitativo, é importante garantir que se trabalhe com concentrações de  $\bullet\text{NO}$  que estejam restritas da faixa cinética de primeira ordem. Somente neste intervalo é possível garantir que o indicador responde proporcionalmente a variações na concentração de  $\bullet\text{NO}$ .

Do ponto de vista biológico, os resultados complementarmente sugerem que processos nitrosativos dependentes de  $\bullet\text{NO}/\text{O}_2^{\cdot-}$  que ocorrem pelos mesmos mecanismos podem exibir comportamentos diferentes com o aumento da

biossíntese de  $\bullet\text{NO}$  e essas diferenças serão decorrentes dos compartimentos biológicos geradores de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Em condições fisiológicas normais os processos nitrosativos intracelulares devem ser dependentes da concentração de  $\bullet\text{NO}$ , especialmente no citosol e na matriz mitocondrial que são ricas em SOD. O perfil cinético de ordem zero deve ser observado em condições inflamatórias onde há sítios com produção elevada de  $\bullet\text{NO}$  a partir de macrófagos estimulados e/ou em regiões deficientes em SOD.

Em resumo, fica claro que  $\text{O}_2^{\bullet-}$  é a espécie que dirige a química nitrosativa do  $\bullet\text{NO}$ . Os processos nitrosativos dependentes de superóxido seguem um perfil cinético incomum na medida em que a concentração de  $\bullet\text{NO}$  aumenta e este perfil depende vários fatores como local de produção de  $\bullet\text{NO}$  e  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , quantidade de antioxidantes presentes, expressão/atividade de SOD e das várias reações competitivas entre  $\bullet\text{NO}$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{ONOO}^-$ , seus derivados e outras moléculas presentes nas células.

#### 4.2. Parte II: Influência do ferro quelatável em processos nitrosativos.

Ferro lábil (no inglês, *labile iron pool (LIP)*) é uma classe de ferro celular que representa apenas 0,2 a 3% de ferro total celular (ou 0,8-5  $\mu\text{M}$ <sup>131; 132</sup>), dependendo do tipo de célula. Também é conhecido como ferro quelatável (no inglês, *Chelatable iron pool*). Estas denominações metodológicas enfatizam a propriedade de que LIP está associado fracamente a constituintes celulares e que pode ser complexado por quelantes fortes. Sua localização celular e natureza estrutural (ligantes e geometria) não são inteiramente conhecidas<sup>133</sup>.

A despeito disso, LIP tem papel importante em células, aparentemente servindo como uma reserva acessível e dinâmica que trafega entre vários compartimentos biológicos e celulares<sup>133; 134</sup>. De fato, a concentração de LIP é rigorosamente controlada pelos mecanismos homeostáticos que envolvem proteínas reguladoras de ferro (IRP1 e IRP2, do inglês *iron regulatory proteins*) que juntas controlam precisamente a aquisição, armazenamento e secreção e assim mantém sua concentração intracelular numa faixa ótima<sup>134; 135</sup>. Este controle é necessário,

pois ferro (II) pode reduzir  $H_2O_2$  para produzir radicais  $OH^\bullet$ , propriedade pela qual LIP talvez ainda seja mais conhecido. O sistema de IRP1 e IRP2 funciona em sincronia para manter LIP em um nível suficiente e prontamente disponível para incorporação em ferro proteínas nascentes, mas baixo para minimizar efeitos tóxicos<sup>134</sup>.

Trabalhos mais recentes revelaram que LIP é um alvo em potencial de  $NO^\bullet$ <sup>136; 137; 138; 139; 140; 141; 142</sup>. Esta reação leva à formação de DNIC (do inglês, *dinitrosyl iron complexes*) que podem ser identificados e quantificados pela dupla integração de seu característico sinal em  $g = 2,04$ <sup>137; 140; 141</sup> por ressonância paramagnética eletrônica (RPE). Há indícios também que LIP pode catalisar a formação de s-nitrosoproteínas em células com intermédio de DNIC<sup>136</sup> como mostrado nas equações 23 e 24.

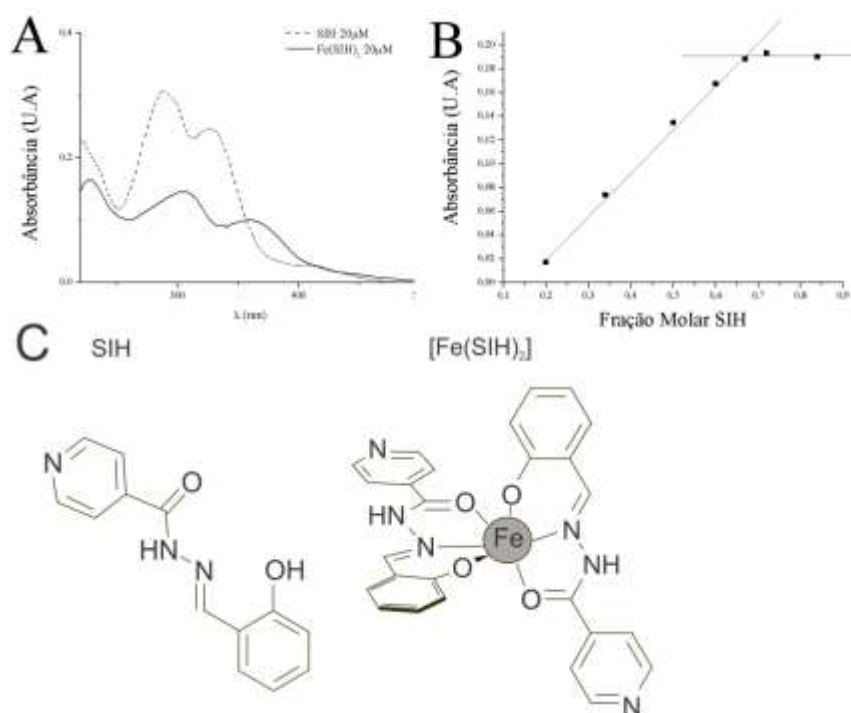
Como discutido na introdução, existem diferentes mecanismos nitrosativos nas células<sup>48; 86; 87; 143; 144; 145</sup>. Identificamos mecanismos nitrosativos radicalares envolvendo  $O_2^{\bullet -}$  usando DAF2-DA e decidimos usar estratégia semelhante para investigar o papel de LIP no contexto de nitrosação dependente de superóxido e peroxinitrito. Os resultados são interessantes e surpreendentes. Remoção de LIP com quelantes metálicos aumenta nitrosação de DAF2 consideravelmente, sugerindo que LIP tem papel anti-nitrosativo, confrontando a concepção consolidada de que LIP é um agente oxidativo e nitrosativo<sup>146; 147; 148; 149; 150</sup>.

Esta seção apresenta os resultados dos estudos que buscam explicar o fenômeno de aumento de nitrosação de DAF2 pela adição de quelantes. Os resultados indicam que o aumento não é artefactual, mas devido uma reação de redução direta de peroxinitrito ou radicais derivados de peroxinitrito por LIP, produzindo íons nitrito, um óxido de nitrogênio não reativo.

#### **4.2.1. Adição de quelantes aumenta da taxa de formação de DAFT.**

Para estudar mecanismos nitrosativos envolvendo LIP foi utilizado o quelante salicilaldeído isonicotinoil hidrazona (SIH). SIH é permeável a membranas celulares, ganha rápido acesso ao interior celular, e complexa LIP rapidamente

formando complexos com estequiometria (2:1) com elevada constante de formação<sup>151</sup>. Em nosso estudo, este complexo foi simulado pela reação entre solução de  $\text{FeSO}_4$  com excesso de SIH em condições desoxigenadas. A formação do complexo é evidenciada pela mudança no espectro do SIH após a reação (Figura 16A) e a estequiometria do complexo foi determinada pelo método da razão molar (Figura 16B). Observa-se que a absorvância (medida em 375nm) varia linearmente com aumento da fração molar de SIH e a curva sofre uma mudança abrupta quando a fração molar de SIH está próxima de 0,66, evidenciando a formação do complexo com estequiometria 2:1. A mudança abrupta sugere elevada constante de formação. A figura 16C ilustra estrutura do ligante e do complexo formado entre SIH com ferro.

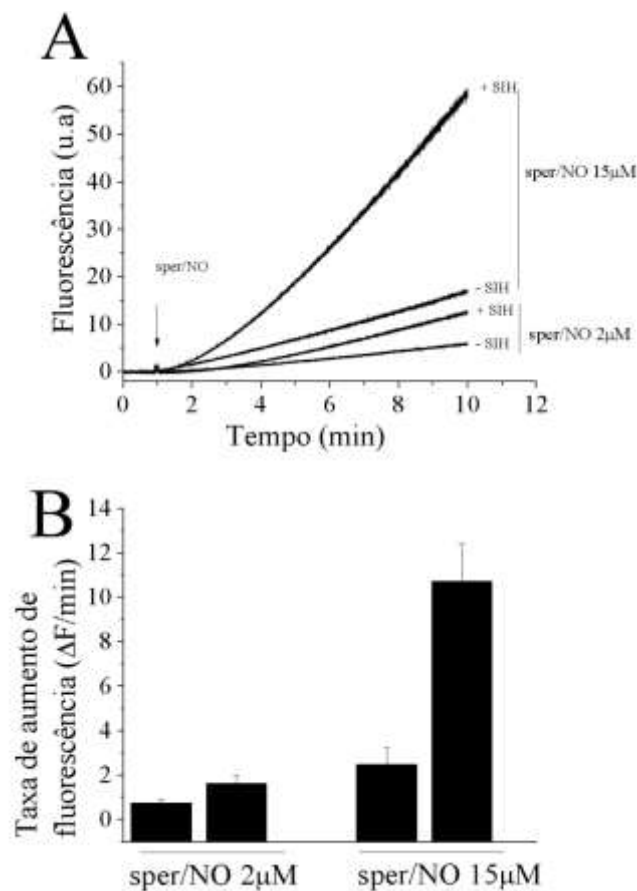


**Figura 16** – Determinação da estequiometria do complexo  $[\text{Fe}(\text{SIH})_2]$  e estrutura do ligante e do complexo. A) Espectros UV-VIS de solução aquosa de SIH  $20\mu\text{M}$  e espectro UV-VIS do complexo  $[\text{Fe}(\text{SIH})_2]$   $20\mu\text{M}$ . B) Determinação da esquiometria do complexo  $[\text{Fe}(\text{SIH})_2]$  pelo método da fração molar.  $\lambda = 375\text{nm}$  C) Representação da estrutura do SIH e do complexo  $[\text{Fe}(\text{SIH})_2]$ .

Experimentalmente, suspensões celulares tratadas com DAF2-DA foram expostas a  $\bullet\text{NO}$  na presença do quelante e a formação de DAFT foi medida pelo aumento da fluorescência conforme protocolo experimental descrito na parte 1 (Figura 4B). O ensaio foi realizado utilizando-se duas concentrações de sper/NO (2 e

15 $\mu$ M), para representar as duas fases cinéticas de formação de DAFT relativo à concentração de  $\bullet$ NO.

Fica evidente que a taxa de formação de DAFT aumenta na presença do quelante quando comparada com a taxa do controle e este aumento é proporcional à concentração de  $\bullet$ NO (figura 17A). Na figura 17B é possível constatar que o aumento da taxa de formação de DAFT é de cerca de 2 vezes para concentração de sper/NO 2 $\mu$ M e de 5 vezes para concentração de sper/NO 15 $\mu$ M.



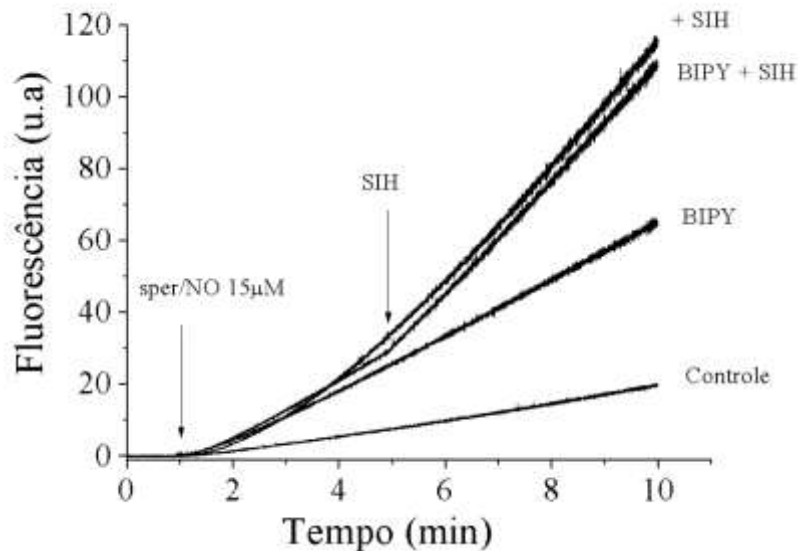
**Figura 17** – Efeito da remoção de ferro quelatável na taxa de formação de DAFT. A) Células tratadas com DAF-2 foram expostas a diferentes concentrações de sper/NO na presença e na ausência do quelante SIH. A concentração de SIH nas amostras contendo quelante é de 100 $\mu$ M. O quelante foi adicionado sistematicamente 5 minutos antes da adição do doador de  $\bullet$ NO. B) Taxa de formação de aumento de fluorescência ( $\Delta F/\text{min}$ ) das amostras contendo SIH. Os coeficientes angulares foram calculados no último minuto de cada ensaio mostrado na figura 17A. Os valores são representativos de 4 medidas  $\pm$ D.P. O teste t-Student revelou que as médias das amostras expostas à mesma concentração de sper/NO são significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ).  $\lambda_{ex}$ . 495nm;  $\lambda_{em}$ ; 520nm.

A primeira dúvida que surgiu ao observar os resultados da figura 17 foi se o resultado realmente era um efeito decorrente da complexação de LIP ou algum outro efeito extra ou intracelular artefactual e específico de SIH. Entretanto, aceleração de formação DAFT também foi observada para o clássico quelante de ferro 2,2 bipyridina (BIPY), que também é permeável a membranas celulares, mas apresenta natureza e propriedades de complexação com ferro bem diferentes de SIH (Figura 18).

A aceleração da formação de DAFT na presença de BIPY é menor que a observada na presença de SIH. As razões para esta diferença são desconhecidas, mas pode ser relacionada a diferentes cinéticas de acesso ao interior celular e compartimentos celulares, ou ainda na cinética e termodinâmica de complexação de ferro. Interessante que a introdução de SIH durante experimento de formação de DAFT, na presença de BIPY, resulta em aceleração adicional da formação de DAFT; não na mesma proporção do que na ausência de BIPY, mas para o nível observado em experimentos na presença de SIH, complementando o efeito de BIP. Isto é, parece existir um nivelamento ou saturação da aceleração da formação de DAFT por quelantes, sugerindo que a concentração de BIPY utilizada seria insuficiente para complexar todo o LIP.

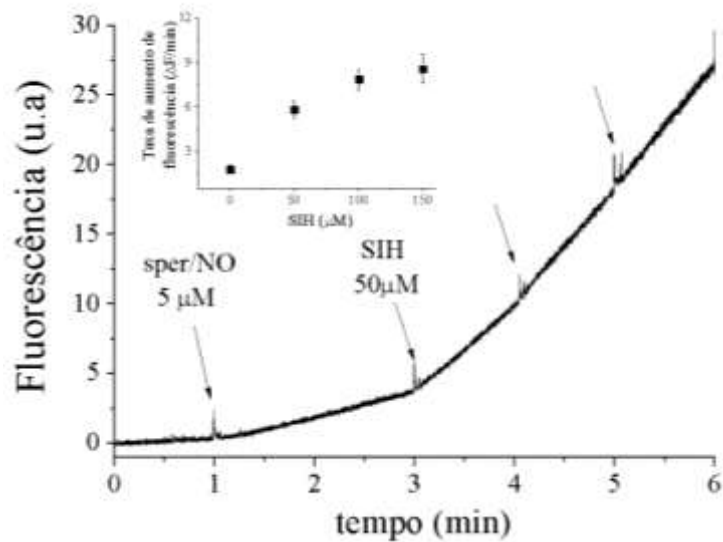
Aparentemente SIH pode ter acesso a um ou mais compartimentos celulares contendo LIP em células que é ou são inacessíveis à BIPY. Este resultado também sugere que o efeito de SIH não é artefactual, ou SIH aumentaria a taxa de formação de DAFT na mesma extensão com que aumenta na ausência de BIPY. Também muito importante, quelantes metálicos impermeáveis a membranas celulares não tem qualquer efeito na velocidade da formação de DAFT, sugerindo que efeito de SIH e BIPY é intracelular. Isto foi constatado pela exclusão de DPTA do tampão de trabalho, que não resultou em aumento ou diminuição da taxa de formação de DAFT. De qualquer forma, os resultados de aceleração da formação de DAFT são qualitativamente similares para SIH e BIPY.

Assumindo que a única ação destes quelantes seja remoção de LIP por complexação, estes resultados indicam que LIP tem atividade anti-nitrosativa. Para o restante das investigações tomamos a decisão de utilizar o quelante SIH, uma vez que este parece ser mais “eficiente” que BIPY.



**Figura 18** – Utilização de 2,2 bipirdinina (BIPY) como quelante intracelular: Células tratadas com DAF2-DA foram suspensas em tampão de trabalho na presença de BIPY ou SIH (ambos 100µM) e expostas à mesma concentração de sper/NO para verificação da influência que os quelantes exercem na taxa de formação de DAFT.  $\lambda_{ex}$  495nm;  $\lambda_{em}$  520nm.

Para confirmar que a aceleração da formação de DAFT por quelantes é saturável, foram realizadas adições sucessivas de SIH em suspensões celulares tratadas com DAF2-DA durante o experimento. O resultado, mostrado na figura 19, revela que adições sucessivas de quelante resultam em aumento da taxa de formação de DAFT até concentração de SIH de 100µM. A partir deste ponto, introdução de SIH não tem qualquer efeito. No *Inset* da figura 19 é mostrado como a taxa de formação de DAFT varia para cada concentração de SIH utilizada, e fica claro a tendência de saturação.



**Figura 19** – Saturação do efeito do SIH na taxa de formação de DAFT. Células tratadas com DAF2-DA foram expostas a NO e foram realizadas sucessivas adições de SIH. Cada adição representa aumento da concentração do quelante por 50 $\mu$ M. *Inset*: taxa de aumento da fluorescência ( $\Delta F/\text{min}$ ) calculada para adição de SIH, média de 3 medidas  $\pm$  D.P.  $\lambda_{\text{ex}}$ . 495nm;  $\lambda_{\text{em}}$ . 520nm

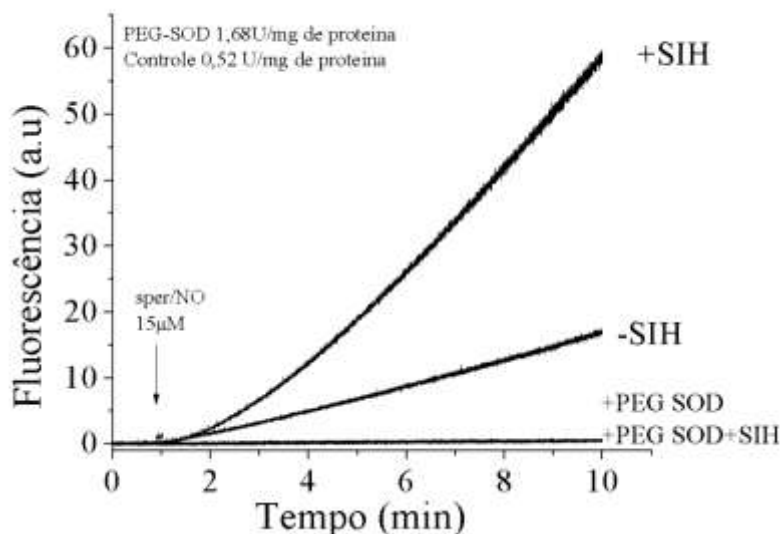
O efeito saturável do SIH na nitroação do DAF2 reforça a noção de que o aumento da formação de DAFT está relacionado com a remoção de LIP, considerando que LIP é uma quantidade finita em células. Embora a saturação observada na figura 19 constitua um argumento a favor da hipótese de que ferro quelatável possa, ainda que em condições específicas, inibir processos nitrosativos, não é possível fazer uma afirmação categórica sem antes testar outras hipóteses que poderiam explicar os resultados observados nas figuras 17-19.

#### 4.2.2. LIP não introduz um novo mecanismo de nitroação de DAF2

Para investigar a possibilidade de que o efeito do SIH estivesse relacionado com o surgimento de um novo mecanismo de nitroação de DAF2, foi investigado o mecanismo de formação de DAFT na presença do quelante SIH. Para isso, foram utilizadas abordagens experimentais semelhantes às descritas e discutidas na parte 1.



Primeiramente, foi investigado se a formação de formação de DAFT na presença de SIH era dependente de superóxido. Para isso, células previamente tratadas com PEG-SOD (5µg/mL) por 24 horas foram coletadas e tratadas com DAF2-DA. A atividade dismutásica do extrato celular por mg de proteína total, medida pela inibição de redução de citocromo c férrico pelo sistema xantina/XO, aumentou 3,2 vezes, confirmando a eficácia do tratamento. Posteriormente, experimentos protocolares de formação de DAFT foram conduzidos na presença e ausência de SIH. Na figura 20 é possível observar que o aumento da atividade de SOD inibe completamente a formação de DAFT na presença e na ausência de SIH, revelando que mesmo na presença do quelante o processo de formação de DAFT depende da concentração de superóxido intracelular. Porém, por si só, esta observação não é definitiva, pois o processo poderia ser dependente de  $O_2^{\cdot-}$  e ainda assim ser diferente dos mecanismos de nitroação ou nitrosilação oxidativa.



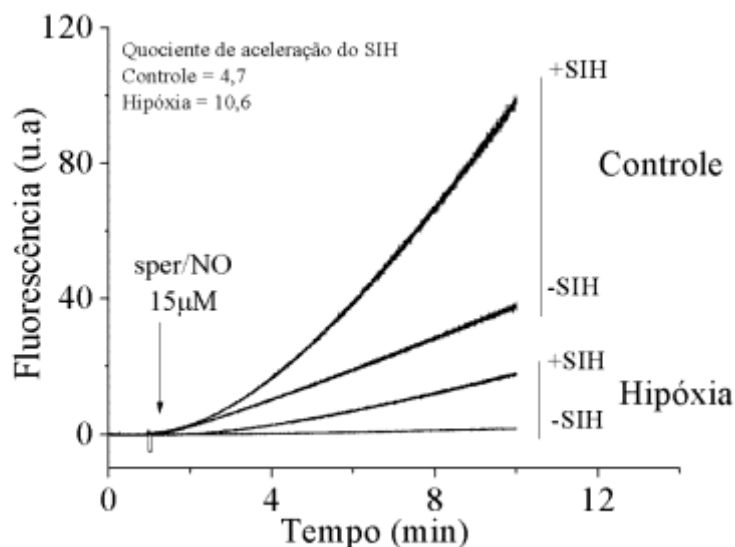
**Figura 20** – Influência do SIH na formação de DAFT em células tratadas com PEG-SOD por 24 horas. A eficiência do tratamento foi confirmada medindo o aumento da atividade da enzima pela inibição da redução de citocromo C por superóxido gerado pelo sistema Xantina/ Xantina-Oxidase. As células tratadas com PEG-SOD foram coletadas e tratadas com DAF-2DA. As suspensões celulares tratadas com DAF-2DA foram expostas à  $\cdot NO$  na presença e na ausência do quelante SIH e a fluorescência foi acompanhada em função do tempo.  $\lambda_{ex}$ . 495nm;  $\lambda_{em}$ . 520nm.

Como a formação de  $O_2^{\cdot-}$  depende de  $O_2$ , alguns ensaios em condições desoxigenadas foram conduzidos. Como observado para situação na ausência de

SIH (repetida aqui), desoxigenação elimina a formação de DAFT na ausência de SIH e diminui drasticamente a velocidade de formação de DAFT na presença de SIH, sugerindo participação de  $O_2^{\cdot-}$  mesmo na presença de SIH.

Porém, fica evidente que SIH parece acelerar a formação de DAFT mesmo em condições de desoxigenação. O quociente de aceleração pelo SIH, medido pela razão entre a velocidade da amostra contendo e SIH e a amostra sem SIH, é bem inferior nesta situação. Nos dois casos, na presença e na ausência de SIH, é possível que ainda exista uma pequena parcela do gás dissolvido, apesar do esforço para remover  $O_2$ , o que resultaria na produção de superóxido e explicaria a aceleração da formação de DAFT na presença de SIH. Entretanto, não pode ser descartada totalmente a possibilidade de que SIH introduz um novo mecanismo de nitrosação de DAF2 em condições desoxigenadas e que LIP inibe este mecanismo também. Neste caso, esperar-se-ia que o mecanismo envolvendo SIH ou LIP fosse independente de  $O_2$  e de  $O_2^{\cdot-}$  e que respondesse de forma diferente a reagentes que interferem nos mecanismos de nitrosação e nitrosilação oxidativa que dependem de  $O_2^{\cdot-}$ .

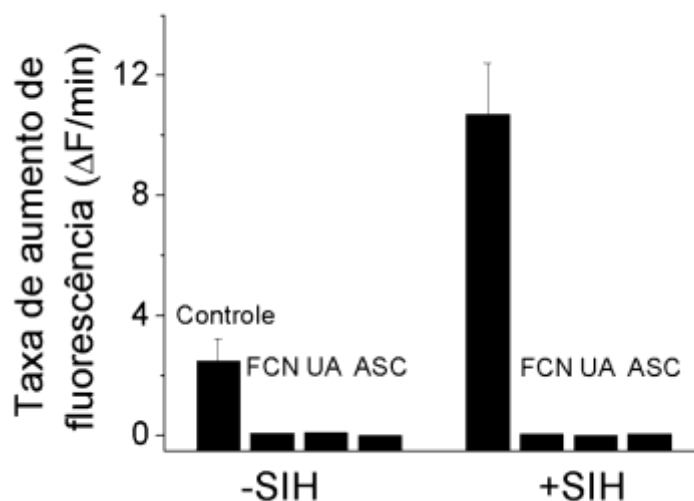
Mas, considerando que a reatividade de  $\bullet NO$  é restrita a radicais e metais, a hipótese mais provável é a da existência de oxigênio e superóxido residual nestes experimentos.



**Figura 21** – Efeito do SIH na formação de DAFT em condições de hipóxia. Células tratadas com DAF2-DA foram suspensas em tampão de trabalho previamente desoxigenado e foram expostas a  $\bullet NO$  na presença e ausência de SIH. As medidas foram conduzidas em uma cubeta fechada para impedir entrada de  $O_2$ .

Os quocientes de aceleração de SIH foram calculados a partir da razão entre os coeficientes angulares das amostras contendo SIH e a amostra sem SIH para as duas condições de oxigenação.  $\lambda_{ex}$ . 495nm;  $\lambda_{em}$ . 520nm.

Com esta suposição e com o objetivo específico de investigar se os processos de formação de DAFT na presença do quelante SIH são os mesmos do que na sua ausência, em seguida, foi avaliado se espécies antioxidantes, como ácido ascórbico e ácido úrico, inibem o processo de nitrosação do DAF2 na presença de SIH, da mesma forma como inibem na ausência de SIH (Figura 12). Na figura 22 estão apresentados os resultados de ensaios que foram realizados na presença de ácido úrico, hexacianoferrato (FCN) e ácido ascórbico. Todos os compostos inibiram completamente a formação de DAFT independentemente da presença do quelante SIH, o que reforça a noção de que mesmo na presença do quelante, os mecanismos de nitrosação e nitrosilação oxidativa são os dois únicos processos que governam a formação de DAFT em células RAW 264.7.

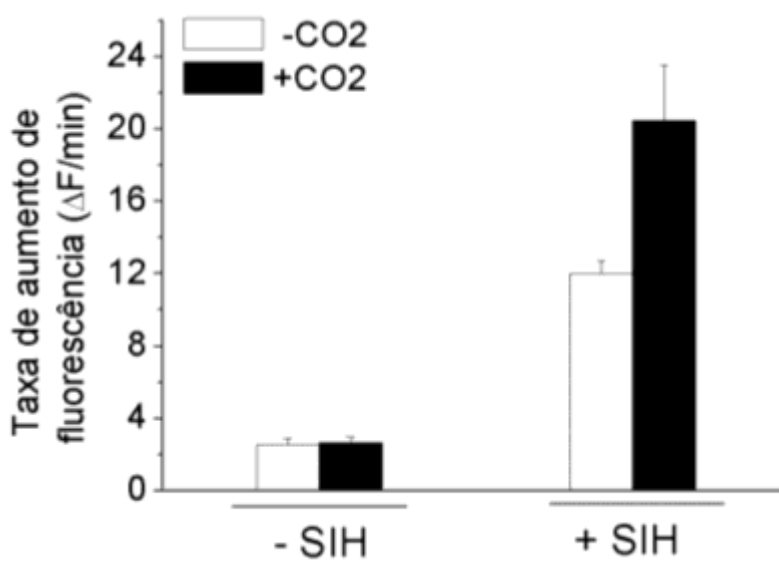


**Figura 22** – Efeito de SIH na presença de antioxidantes. Células tratadas com DAF2-DA foram expostas à  $\bullet$ NO na presença de diferentes antioxidantes que reagem com derivados de peroxinitrito rapidamente na ausência e na presença de SIH. Os valores representam as médias de 3 medidas  $\pm$ D.P.  $\lambda_{ex}$ . 495nm;  $\lambda_{em}$ . 520nm.

FCN, ácido úrico<sup>152</sup> e ascorbato, não reagem diretamente com peroxinitrito rapidamente, de forma que os efeitos observados na formação de DAFT somente podem ser consequência de reações com os radicais derivados de peroxinitrito que estimulam a formação de DAFT ( $\text{NO}_2^{\bullet}$ ,  $\text{CO}_3^{\bullet-}$ ,  $\bullet\text{OH}$ ). Além disso, nestes

experimentos, apenas ascorbato estava presente no interior celular devido ao tratamento das células por 3 horas antes dos experimentos, conforme descrito na parte 1. FCN e ácido úrico foram introduzidos no tampão de trabalho imediatamente antes dos ensaios, portanto, ficam retidos no espaço extracelular, sugerindo que a espécie derivada de peroxinitrito mais relevante para a formação de DAFT é difusível, novamente apontando para  $\text{NO}_2^{\cdot}$ , assim como tinha sido observado anteriormente e confirmado aqui, para a situação na ausência do quelante.

Finalmente foi avaliado se a produção líquida de radicais derivados de peroxinitrito intracelular devido à presença de  $\text{CO}_2$ <sup>111; 112; 113</sup> poderia afetar a taxa de formação de DAFT na presença de SIH. Observa-se que não houve aumento na taxa de formação de DAFT na amostra preparada em tampão equilibrado com 25mM de bicarbonato e sper/NO 15  $\mu\text{M}$  quando comparado com o controle, o que difere do resultado obtido anteriormente. Mas, curiosamente, a taxa de formação de DAFT na presença de SIH aumenta na presença de  $\text{CO}_2$  adicional (figura 23).



**Figura 23** – Influência do aumento da concentração de  $\text{CO}_2$  na taxa de formação de DAFT na presença e na ausência de SIH. Células tratadas com DAF2-DA foram suspensas em tampão PBS contendo 25mM de bicarbonato de sódio e expostas a sper/NO 15 $\mu\text{M}$ . Nas amostras contendo SIH a concentração do quelante, adicionado 5 minutos antes da adição de sper/NO, é de 100 $\mu\text{M}$ . Os valores representam as médias de 3 amostras  $\pm$ D.P. As médias não apresentaram diferenças significativas para as amostras sem SIH. As médias das amostras contendo SIH são significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ).  $\lambda_{\text{ex}}$  495nm;  $\lambda_{\text{em}}$  520nm.

### **4.2.3. Hipóteses para a aceleração de formação de DAFT na presença de quelantes.**

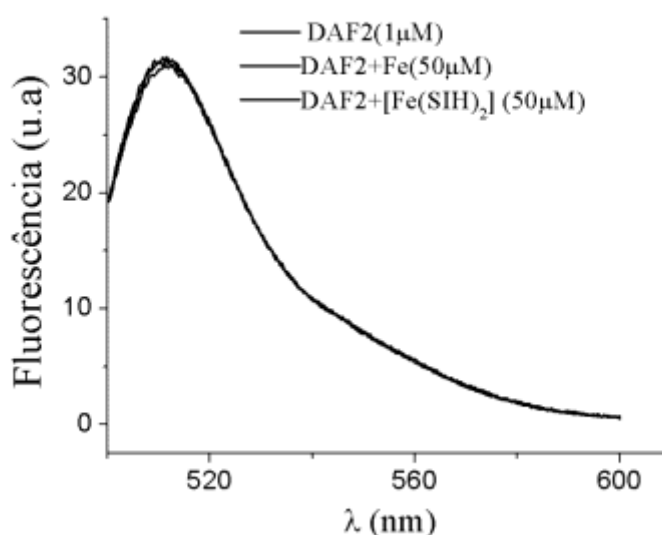
Os resultados mostrados nas figuras 20-23 demonstram que os mecanismos que governam a formação de DAFT na ausência de quelante são os mesmos que governam a formação de DAFT na sua presença. Isto é, ocorrem via nitrosação e nitrosilação oxidativa e dependem de superóxido. Em seguida foram testadas experimentalmente várias hipóteses que poderiam explicar este fenômeno. Obviamente, toda hipótese válida deve ser consistente com o envolvimento de superóxido, peroxinitrito e seus derivados.

#### **4.2.3.1. Complexação de DAF2 e LIP.**

A primeira hipótese considerada e que poderia explicar os resultados apresentados até aqui seria a de que DAF2 complexa LIP, atuando essencialmente como um quelante. DAF2 contém duas aminas vicinais como substituintes de um anel aromático em sua estrutura, geometria adequada para complexação de metais. Esta complexação tornaria DAF2 indisponível para reações de formação de DAFT. Assim, SIH e BIPY poderiam complexar LIP inicialmente coordenado ao DAF2, liberando DAF2 no interior celular e aumentando a taxa de fluorescência.

Esta hipótese foi testada pela mistura de sulfato de ferro (II) ou do complexo  $[\text{Fe}(\text{SIH})_2]$  (sulfato de ferro (II) + excesso de SIH) e DAF2 dissolvido em PBS sem DTPA previamente desoxigenado. A possível reação foi investigada por espectroscopia de fluorescência, já que DAF2 é fluorescente e fluorescência é altamente sensível a metais. Assim, a fluorescência de DAF2 deveria ser dramaticamente alterada em consequência de complexação com  $\text{Fe}^{2+}$ . Entretanto, os espectros apresentados na figura 24A revelaram que não há alteração do espectro de emissão de DAF2 nem na presença de íons  $\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})}$ , nem na presença do complexo de  $[\text{Fe}(\text{SIH})_2]$ . Este resultado sugere que DAF2 não deve formar complexos com LIP nestas condições.

Coerentemente, a estrutura de DAF2 é muito volumosa para complexar ferro fortemente. A hipótese de que DAF2 coordena LIP também pode ser racionalmente descartada considerando as concentrações relativas de LIP e DAF2 no interior das células. Sabe-se que a concentração de LIP é menor que  $10\mu\text{M}$  enquanto que a concentração de DAF2 no interior das células é próxima de  $1\text{mM}^{93}$ . Assim, não é razoável propor que a liberação de no máximo  $30\mu\text{M}$  (considerando uma estequiometria de 3:1 entre DAF2 e LIP), o que representa apenas 3 % do DAF2 intracelular total, resultaria em aumento de pelo menos 4-5 vezes a velocidade de formação de DAFT na presença de SIH.

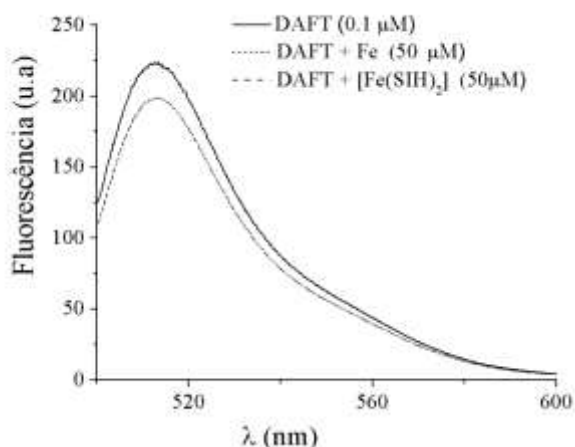


**Figura 24** – Espectro de fluorescência do DAF2 na presença de  $\text{Fe}^{2+}$  ( $50\mu\text{M}$ ) e do complexo  $[\text{Fe}(\text{SIH})_2]$ . DAF-2  $1\mu\text{M}$  foi dissolvido em PBS sem DTPA e à solução foi adicionado solução previamente desoxigenada de  $\text{FeSO}_4$  dissolvido em  $\text{HCl}$   $0,1\text{ mol L}^{-1}$  ou na presença do complexo  $\text{Fe}(\text{SIH})_2$   $50\mu\text{M}$ . O espectro foi coletado com  $\lambda_{\text{exc}}$   $495\text{ nm}$  e abertura de fendas de  $3\text{ nm}$ .

#### 4.2.3.2. Supressão de fluorescência de DAFT por LIP.

Uma segunda possibilidade é a de que LIP poderia interagir com o produto fluorescente DAFT diretamente, suprimindo sua fluorescência. Esta interação não pode ser por complexação. Neste caso, como a concentração de DAFT em células é baixa, remoção de LIP por complexação poderia ter efeito considerável na

fluorescência. Na figura 25 foi avaliada se ocorriam mudanças no espectro de emissão de DAFT na presença de íons de  $\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})}$  ou na presença do complexo  $[\text{Fe}(\text{SIH})_2]$ . Para este experimento, DAFT foi preparado a partir da reação de DAF-2 com excesso de nitrito em meio ácido, assumindo conversão estequiométrica e quantitativa. A formação de DAFT foi confirmada pelo aumento substancial da fluorescência após a reação. Em nenhum dos casos a presença de íons de  $\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})}$  ou do complexo  $[\text{Fe}(\text{SIH})_2]$  alterou as propriedades de fluorescência de DAFT.



**Figura 25** – Efeito da presença de  $\text{Fe}^{2+}$  e do complexo  $[\text{Fe}(\text{SIH})_2]$  na fluorescência de DAFT. DAFT preparado a partir da reação entre excesso nitrito e DAF2 em meio ácido foi dissolvido em PBS sem Dtpa na presença de solução de  $\text{FeSO}_4$   $50\mu\text{M}$  e na presença do complexo  $[\text{Fe}(\text{SIH})_2]$   $50\mu\text{M}$ . Os espectros de fluorescência foram registrados com  $\lambda_{\text{exc.}} = 495\text{nm}$  e fendas de  $3\text{nm}$ .

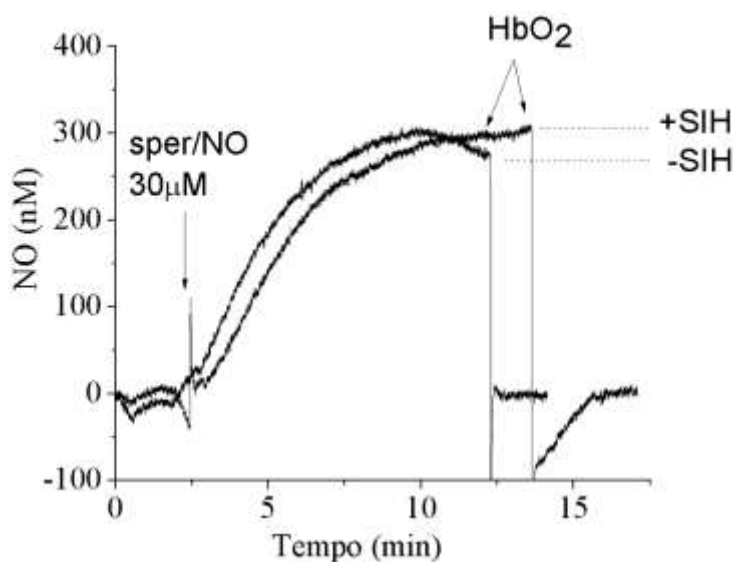
#### 4.2.3.3. Aumento da concentração de $\bullet\text{NO}$ .

Outra hipótese que poderia ser considerada e que explicaria bem os resultados mostrados nas figuras 17-19 seria o consumo de  $\bullet\text{NO}$  promovido por LIP. De fato, LIP é um alvo celular importante de  $\bullet\text{NO}$  que leva à formação de DNIC, como mencionado anteriormente<sup>49; 81</sup>. Neste caso, LIP consumiria  $\bullet\text{NO}$ , diminuindo sua disponibilidade para formação de espécies capazes de nitrosar DAF2; a adição de SIH removeria LIP, proporcionando aumento da concentração de  $\bullet\text{NO}$  consequentemente aumentando da taxa de formação de DAFT.

Apesar de ser plausível, esta hipótese pode ser descartada em função dos resultados apresentados na primeira parte deste trabalho (Figuras 6A-B), que

demonstram que a taxa de formação de DAFT é independente da concentração de  $\bullet\text{NO}$  acima de 100-110 nM ou (8-10  $\mu\text{M}$  do doador sper/NO).

Isto é, o aumento da concentração de  $\bullet\text{NO}$  não resultaria em aumento da taxa de formação de DAFT com 15  $\mu\text{M}$  de sper/NO, como observado para SIH e BIPY. Apesar de termos descartado racionalmente esta possibilidade, foram realizados experimentos onde a concentração de  $\bullet\text{NO}$  em uma suspensão celular exposta a sper/NO foi acompanhada utilizando eletrodos seletivos para  $\bullet\text{NO}$  na presença e ausência de SIH (Figura 26).



**Figura 26** – Variação da concentração de  $[\text{NO}]_{\text{est}}$  na presença de SIH. Células ( $3 \times 10^6$  células/mL) foram suspensas em PBS a  $37^\circ\text{C}$ , sob agitação, na presença e ausência de SIH. Em cada amostra  $30\mu\text{M}$  de sper/NO foi adicionado à suspensão celular e o acompanhamento da concentração de  $\bullet\text{NO}$  foi feito por cerca de 10 minutos. Ao final,  $5\mu\text{M}$  de hemoglobina foram adicionados para consumir o  $\bullet\text{NO}$  remanescente.

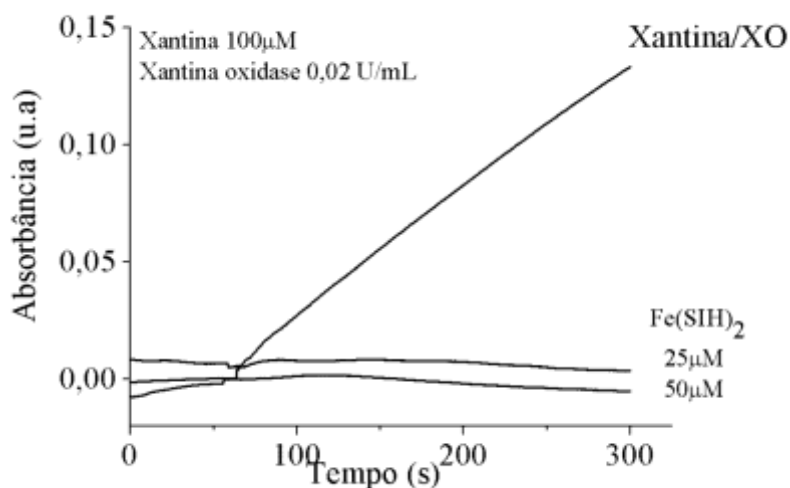
Como esperado, a presença de SIH não altera significativamente  $[\bullet\text{NO}]_{\text{est}}$ , o que nos permite descartar de vez a hipótese de que o efeito observado pela adição de SIH fosse decorrente de aumento na concentração de  $\bullet\text{NO}$ . O suposto aumento da concentração de  $\bullet\text{NO}$  poderia ocorrer ainda por dois processos, o primeiro seria modificando a taxa de liberação de  $\bullet\text{NO}$  pelo doador. Se este fosse o caso, seria razoável esperar que a amostra contendo SIH tivesse maior taxa de aumento da concentração de  $\bullet\text{NO}$ , isto é, a inclinação da curva antes de atingir o estado estacionário seria mais acentuada, o que não ocorre. A segunda seria a diminuição



do consumo celular de  $\bullet\text{NO}$ , neste caso, a concentração de  $\bullet\text{NO}$  no estado estacionário seria maior na presença de SIH, o que também não acontece.

#### 4.2.3.4. Produção de superóxido ou oxidantes capazes de estimular nitrosação de DAF2 por quelantes.

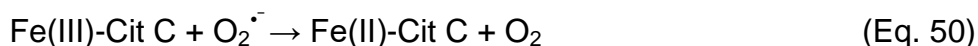
Outra possibilidade consistente com os resultados seria que SIH livre ou na forma complexada com ferro promovesse formação de espécies oxidantes que estimulam processos nitrosativos, notadamente superóxido. Esta hipótese foi avaliada por estudos em PBS e em células, usando diferentes abordagens. Primeiro, foi investigado se SIH e principalmente o complexo  $[\text{Fe}(\text{SIH})_2]$ , usado como modelo para simular complexação de LIP por SIH, reduz  $\text{O}_2$  a  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . A possibilidade foi estudada pelo ensaio tradicional de redução de citocromo c férrico, com acompanhamento espectrofotométrico em PBS sem DTPA a  $25^\circ\text{C}$ .



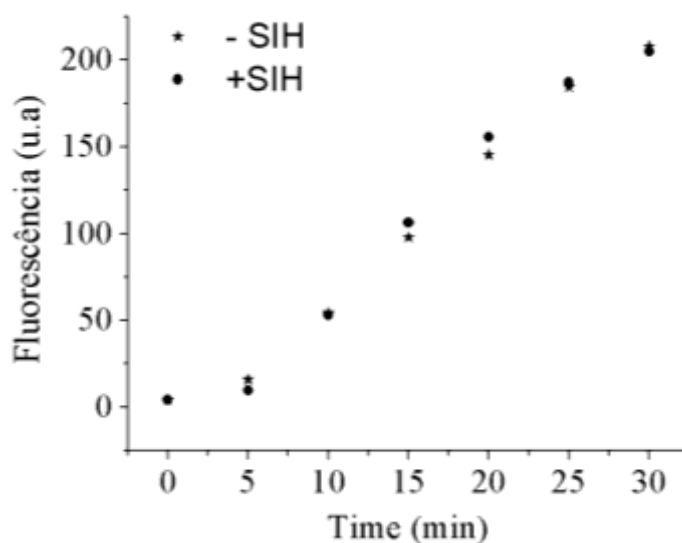
**Figura 27** – Redução do citocromo c férrico na presença do complexo  $\text{Fe}(\text{SIH})_2$ . Citocromo C férrico ( $25\mu\text{M}$ ) foi dissolvido em PBS sem DTPA, na presença e na ausência do complexo  $[\text{Fe}(\text{SIH})_2]$  em concentrações 25 e  $50\mu\text{M}$ . O acompanhamento da redução do citocromo C foi feita via espectroscopia UV-VIS em  $\lambda = 550\text{nm}$ .

Na figura 27 é apresentada a variação da absorbância em 550 nm na presença de complexos  $\text{Fe}(\text{SIH})_2$  e na presença do sistema produtor de superóxido

Xantina/Xantina oxidase como controle positivo. Como esperado, X/XO promove redução do Fe(III)Cit- C formando Fe(II)Cit-C, conforme a reação 50. Ao contrário, é evidente que o complexo [Fe(SIH)<sub>2</sub>] (ou SIH livre) não promove formação de superóxido a partir da transferência de um elétron do ferro para o O<sub>2</sub> dissolvido. Importante, íons de Fe<sup>2+</sup><sub>(aq)</sub> reduzem citocromo c férrico muito rapidamente, mas tal redução é inibida na presença de SIH, mostrando que a complexação altera propriedades redox e reatividade de íons de Fe<sup>2+</sup><sub>(aq)</sub>.



Contudo, na complexidade do ambiente celular, na presença de muitos outros componentes, é possível que o complexo [Fe(SIH)<sub>2</sub>] ou mesmo o quelante SIH livre possa promover produção de superóxido ou outros oxidantes. É pouco provável, mas não impossível, que o quelante livre ou complexado com LIP de alguma forma interaja, por exemplo, com componentes da cadeia respiratória, produzindo O<sub>2</sub><sup>·-</sup>. Para avaliarmos se a produção de superóxido intracelular aumenta na presença de SIH, suspensões celulares tratadas com DHE (dihidroetidina) foram expostas a SIH com acompanhamento espectralfluorimétrico em função do tempo. Dihidroetidina é permeável à membrana celular e reage com O<sub>2</sub><sup>·-</sup> com elevada constante de velocidade, produzindo especificamente o produto catiônico fluorescente 2-hidroxi-etídio (2-OH-E)<sup>+</sup> <sup>153</sup>. Este produto é fluorescente, sendo comumente empregado como detector intracelular de superóxido <sup>154; 155; 156</sup>, permitindo acompanhamento espectralfluorimétrico com λ<sub>ex</sub>. 490nm e λ<sub>em</sub> 560-570nm. O ensaio da figura 28 mostra que no intervalo de tempo observacional de 30 minutos a taxa de oxidação de DHE é essencialmente a mesma independentemente da presença de SIH, indicando que SIH livre ou complexado com LIP não produz O<sub>2</sub><sup>·-</sup>.



**Figura 28** – Oxidação de DHE na presença e ausência de SIH. Células foram expostas a DHE (20 $\mu$ M) e suspensas em PBS por 30 minutos a 37°C e agitação constante, na presença e na ausência de SIH. Os espectros foram coletados com  $\lambda_{ex}$  = 490 nm,  $\lambda_{em}$  = 570 nm.

Entretanto, DHE é oxidado por outras espécies para o cátion etídio ( $E^+$ )<sup>153</sup>, que, também, fluoresce na região próxima à do 2-OH- $E^+$ . Segundo Zhao et al.<sup>157</sup>  $E^+$  é na verdade o principal produto da oxidação de DHE em células e este problema impossibilita detecção de específica  $O_2^{\cdot-}$  intracelular usando DHE via fluorescência. Para tanto, estes autores recomendam separação via HPLC dos produtos de oxidação do DHE (2-OH- $E^+$  e  $E^+$ ) presentes no extrato celular após os ensaios, questionando de certo modo o significado dos resultados da figura 28. Entretanto, no trabalho de Zhao et al.<sup>157</sup> ficou claro que adição de menadiona, uma quinona capaz de produzir superóxido intracelular via ciclos redox assim como paraquat e DMNQ, aumenta tanto a quantidade de 2-OH- $E^+$  quanto de  $E^+$  no extrato celular. Zhao et al.<sup>157</sup> afirma não compreender os motivos ou mecanismos que levam ao aumento da concentração de  $E^+$  nestes experimentos, porém, é possível especular que a formação de  $E^+$  deva ser decorrente de processos secundários, como produção de peróxido de hidrogênio e outras espécies capazes de oxidar DHE formando  $E^+$ . O mais importante é que seus resultados demonstram que o aumento da concentração de  $E^+$  é proporcional à concentração de superóxido, e que o aumento da concentração de 2-OH- $E^+$  na presença de geradores de superóxido é proporcionalmente maior do que o aumento da concentração de  $E^+$ . Isso permite

especular que SIH não aumenta produção de superóxido em células. Se assim fosse, seria observada mudança na taxa de aumento na fluorescência em função do tempo.

Não obstante todas estas considerações de especificidade, o resultado da figura 28 permite afirmar com segurança que SIH não aumenta produção de oxidantes em geral que poderiam estimular formação de DAFT. Ensaio semelhante realizado com H<sub>2</sub>DCF também apontam para mesma direção. Com isso, a hipótese de que o efeito de SIH na taxa de formação de DAFT seja decorrente do aumento de produção de superóxido ou outros oxidantes é pouco provável.

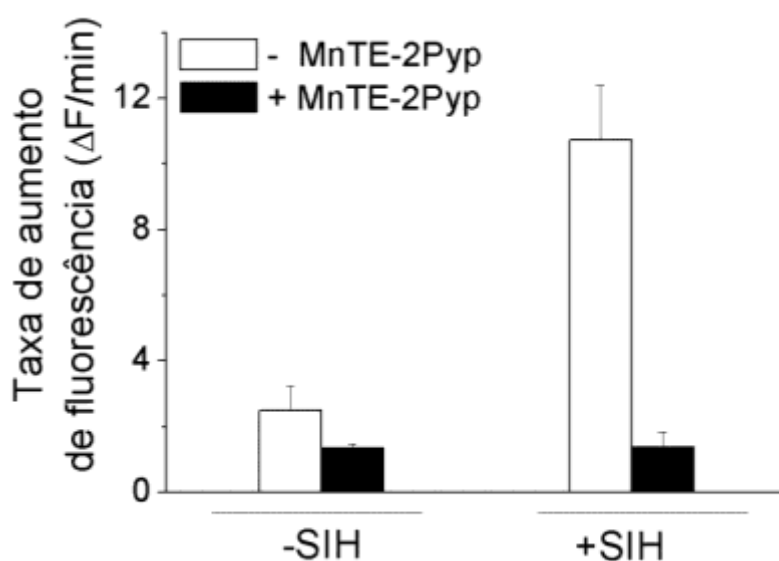
#### **4.2.4. Avaliação da reação entre LIP e peroxinitrito: Experimentos com competidores.**

Sem dúvida, metais representam um dos principais alvos de peroxinitrito em células. As reações entre peroxinitrito e metais são universais (Fe, Cu, Mn) e são rápidas, com constantes de velocidade que tipicamente superam  $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ <sup>158; 159; 160; 161</sup>. Considerando que os mecanismos de formação de DAFT passam por peroxinitrito, foi cogitada a hipótese de que LIP reaja diretamente com peroxinitrito produzindo compostos não oxidantes e não nitrosantes. Complexação de LIP com SIH inibiria esta reação e resultaria no aumento da formação de DAFT pelos mecanismos dependentes de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> e peroxinitrito, portanto, explicando todos os resultados sem invocar mecanismos alternativos.

De acordo com essa hipótese, qualquer espécie que reaja com peroxinitrito, sem produzir oxidantes, leva à diminuição da taxa de formação de DAFT e diminuição da aceleração da formação de DAFT induzida pela presença de SIH. O experimento apresentado na figura 23, onde foi avaliado o efeito de CO<sub>2</sub> na taxa de formação de DAFT, de certa forma também avaliou como a nitroação do DAF2 é afetada pela presença de competidores que reagem com peroxinitrito. Porém, neste caso, ocorreu o aumento da velocidade de formação de DAFT em virtude da

formação de espécies radicalares que são reconhecidamente atuantes em processos nitrosativos.

Uma outra tentativa foi realizada utilizando o captador de peroxinitrito MnTE-2-PYP. Como discutido anteriormente, este composto reage com peroxinitrito e forma espécies não nitrosantes<sup>102; 104</sup>, assim, espera-se que sua adição na suspensão de células tratadas com DAF2 provoque diminuição da taxa de formação de DAFT mesmo na presença de SIH.



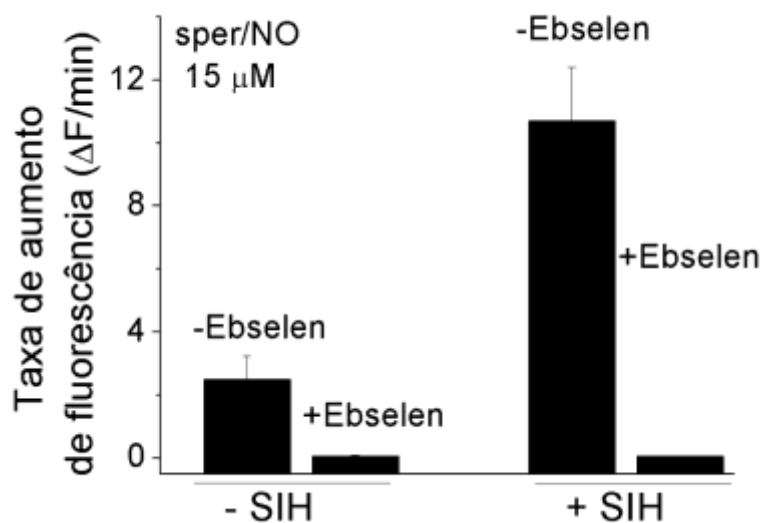
**Figura 29** – Efeito de captadores de peroxinitrito na formação de DAFT na presença e ausência de SIH. Células tratadas com DAF2 foram suspensas em PBS, na presença e na ausência de MnTE-2-PYP (30 $\mu$ M). O efeito do SIH foi avaliado pela adição de 100 $\mu$ M antes da adição de sper/NO 15 $\mu$ M. T = 37°C. Os valores representam as médias de 3 medidas  $\pm$ D.P. O teste t-Student revelou que as médias para amostras sem SIH são significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ). As médias das amostras tratadas com SIH também são significativamente diferentes.  $\lambda_{ex}$  = 495nm;  $\lambda_{em}$  = 520nm.

Coerentemente com a hipótese, a porfirina de manganês causa redução da taxa de formação de DAFT na ausência e presença de SIH. Na verdade, este resultado vem fortalecer a noção de que a formação de DAFT ocorre por mecanismos dependentes de superóxido e peroxinitrito, mas não fortalece a hipótese de que LIP reage com peroxinitrito. Para isso, seria necessário conduzir experimentos com concentrações cada vez menores da porfirina, testando se o efeito de aceleração de SIH diminui proporcionalmente com a concentração da porfirina. Contudo, é sempre importante ressaltar que embora essa porfirina reaja

rapidamente com peroxinitrito, com constante da ordem de  $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ <sup>106</sup>, existe ainda a possibilidade de que a porfirina reaja com superóxido, o que também é consistente com a hipótese e também explicaria a diminuição da taxa de formação de DAFT. Devido a estas incertezas, fica claro que a utilização de compostos que reagem mais especificamente com peroxinitrito seriam melhor para testar a hipótese.

Entre estes compostos foram selecionados Ebselen (2-fenil-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-ona) e compostos derivados de ácido borônico. Todos reagem com peroxinitrito com elevadas constantes de velocidade e mostram elevada resolução cinética com relação a superóxido e outros peróxidos.

Ebselen reage rapidamente com  $\text{ONOO}^-$  ( $k = 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )<sup>107; 108</sup> de acordo com a equação 32, produzindo óxido de ebselen e íons  $\text{NO}_2^-$ , nenhum produto é oxidante ou nitrosante. Desta forma, espera-se que adição deste competidor resulte na redução da taxa de formação de DAFT bem como redução da aceleração induzida pelo quelante SIH.



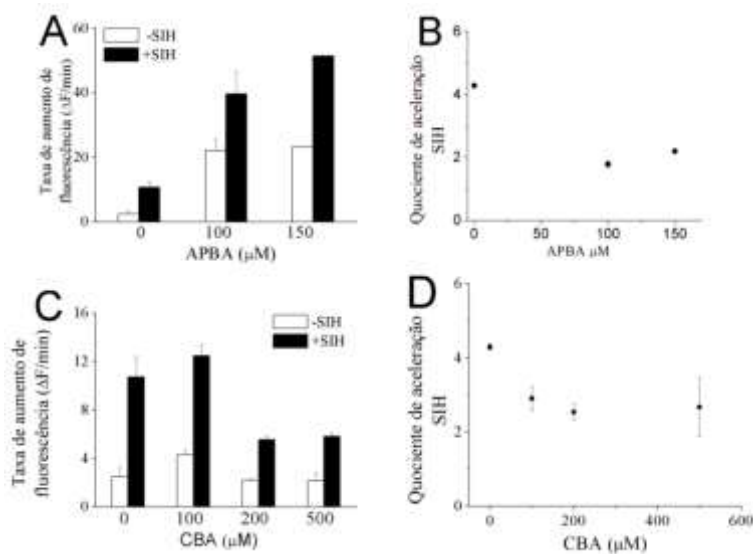
**Figura 30** – Efeito da remoção de peroxinitrito com ebselen. Células tratadas com DAF2-DA foram suspensas em PBS contendo Ebselen ( $10\mu\text{M}$ ) na presença e na ausência de SIH ( $100\mu\text{M}$ ).  $T = 37^\circ\text{C}$ . Os valores representam as médias de 3 medidas  $\pm$ D.P. O teste t-Student mostrou que as médias são significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ) para amostras comparadas pertencentes ao mesmo grupo.  $\lambda_{\text{ex.}} 495\text{nm}$ ;  $\lambda_{\text{em.}} 520\text{nm}$ .

Coerentemente, ebselen resultou na diminuição na taxa de formação de DAFT. Na verdade, inibiu completamente a nitroação do DAF2 independentemente da presença de SIH, demonstrando mais uma vez que o processo de nitroação de

DAF2 depende de peroxinitrito na ausência e na presença de SIH, mas oferecendo pouca informação sobre uma reação direta entre  $\text{ONOO}^-$  e LIP.

Foram realizados ensaios utilizando concentrações de Ebselen menores que  $10\mu\text{M}$  ( $1,0\mu\text{M} - 0,1\mu\text{M}$ ), porém, em todos os casos ebselen inibiu a formação de DAFT completamente. O óxido de ebselen pode ser reduzido no interior celular<sup>108; 109</sup>, portanto ebselen teoricamente funciona com um antioxidante catalítico contra peroxinitrito, o que pode explicar inibição completa da formação de DAFT com concentrações tão baixas.

Em seguida, a hipótese de reação direta entre LIP e peroxinitrito foi testada com captadores de peroxinitrito derivados do ácido borônico. Estes compostos reagem com  $\text{ONOO}^-$  rapidamente, com constantes de velocidade superiores a  $10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ <sup>127; 162</sup>, e dependendo da identidade do captador empregado, o produto da reação com peroxinitrito é fluorescente, permitindo que se faça a detecção de peroxinitrito intracelular em tempo real<sup>127</sup>. A hipotética competição entre ferro lábil e indicadores específicas por peroxinitrito foi avaliada empregando-se dois tipos de derivados de ácido borônico, são eles: ácido 4-acetilfenilborônico (APBA) e ácido cumarinoborônico (CBA). Inicialmente, estes dois indicadores foram empregados em células tratadas com DAF2-DA para avaliar o efeito que adição destes compostos exercia na taxa de formação de DAFT (Figura 31) na ausência e na presença de SIH.

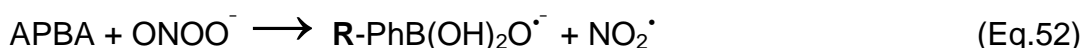


**Figura 31** – Ação de boronatos na taxa de formação de DAFT na presença e na ausência de SIH. A) Variação da taxa de fluorescência para diferentes concentrações de APBA. B) Quociente de aceleração de SIH para diferentes concentrações de APBA. O quociente de aceleração representa a razão entre a taxa

de aumento de fluorescência na presença de SIH e a taxa de aumento de fluorescência na ausência de SIH. C) Variação da taxa de fluorescência para diferentes concentrações de CBA. B) Quociente de aceleração de SIH para diferentes concentrações de CBA. Os valores representam a média de 3 medidas  $\pm$  D.P. Nos painéis A e C as médias são significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ) para amostras expostas à mesma concentração de APBA ou CBA.  $\lambda_{ex.} = 495\text{nm}$ ,  $\lambda_{em} = 520$ .

Surpreendentemente, a figura 31A mostra que APBA induz aumento considerável da taxa de formação de DAFT na ausência do quelante. Esperava-se que ocorresse diminuição da taxa de formação de DAFT na presença do boronato. Entretanto, o aumento observado pode ser decorrente do mecanismo de reação entre boronato e peroxinitrito descrito nos estudos de Sikora et al<sup>163</sup>, que demonstram que a reação entre boronatos e  $\text{ONOO}^-$  pode levar à produção de radicais como  $\text{NO}_2^\bullet$  e radicais fenila.

A primeira etapa da reação corresponde ao ataque nucleofílico do  $\text{ONOO}^-$  sobre o átomo de boro, que é naturalmente deficiente eletronicamente, formando um intermediário tetraédrico contendo peroxinitrito como substituinte. Subsequentemente, a ligação peroxo (O-O) do peroxinitrito neste intermediário pode ser clivada heteroliticamente, resultando na formação de  $\text{NO}_2^-$  (equação 51), ou homoliticamente resultando na formação de um radical derivado do Boro e  $\text{NO}_2^\bullet$  (equação 52), que correspondem respectivamente a cerca de 90% e 10% do produto final. Em tampão, o radical derivado do Boro reage com  $\text{O}_2$  e mesmo  $\text{NO}_2^\bullet$ , levando à formação dos produtos 4'-hidroxi-3-nitroacetofenona e 4'-nitroacetofenona consumindo parte do  $\text{NO}_2^\bullet$  produzido. Porém, em células seu destino não é conhecido. Na presença de componentes celulares em concentração mais elevada, como é o caso de DAF2 intracelular, o  $\text{NO}_2^\bullet$  produzido pode estimular nitroação de DAF2. Portanto, excesso de APBA pode na verdade aumentar a produção líquida de  $\text{NO}_2^\bullet$  a partir de peroxinitrito em células deslocando peroxinitrito de suas reações com peroxirredoxinas (que produzem íons nitrito exclusivamente), o que justificaria o aumento na velocidade de formação de DAFT observado na figura 31A.



Onde: R = grupo acetil; Ph = grupo fenil



Embora APBA apresente complicações devido a produção de radicais, estes experimentos reforçam a hipótese que a formação de DAFT depende de peroxinitrito e demonstram competição entre LIP e APBA por peroxinitrito. A figura 31B mostra como varia o quociente de aceleração da formação de DAFT na presença de SIH em função da concentração de APBA empregada.

Este quociente foi definido como a razão entre a taxa de aumento de fluorescência da amostra com SIH e a taxa de aumento de fluorescência sem SIH. Esta grandeza reflete o quanto a velocidade de formação de DAFT é aumentada pela remoção de LIP na presença do competidor boronato. A análise da curva da figura 31B mostra que o quociente de aceleração de SIH diminui de  $4,0 \pm 0,1$  com o aumento da concentração do boronato, nivelando-se a partir de  $100 \mu\text{M}$  de APBA para  $2,5 \pm 0,8$ . Isto significa que a remoção de LIP pela adição de SIH torna-se cada vez menos importante e foi interpretado com progressiva diminuição de peroxinitrito disponível para reação com LIP com o aumento da concentração de APBA. Este resultado sugere fortemente que LIP reage com peroxinitrito produzindo espécies não oxidantes e não nitrosantes.

A interpretação dos resultados das figuras 31A e 31B podem ser aplicadas aos experimentos das figuras 31C e 31D usando CBA como boronato alternativo, porém, é notável que o efeito da adição de CBA foi bem menor quando comparado com o efeito provocado por APBA. Esta diferença pode refletir as diferenças na permeabilidade celular ou ainda da proporção da homólise hererolítica / homolíticas dos dois boronatos. O importante é que os experimentos demonstram que a adição de espécies capazes de reagir com  $\text{ONOO}^-$  tendem a diminuir a influência de LIP (e SIH) no processo de nitrosação do DAF2, como é mostrado pela diminuição do quociente de aceleração de SIH. Este efeito era exatamente o esperado e consistente com a hipótese da reação entre LIP e peroxinitrito.

Uma análise cuidadosa destes experimentos utilizando ebselen e boronatos, separadamente ou em conjunto, revela outros significados não óbvios e talvez complementares. Primeiro, coincidência ou não, o quociente de aceleração de SIH alcança um mínimo praticamente idêntico para os dois derivados borônicos. Isto pode indicar que nas concentrações máximas utilizadas, ambos compostos reagem com praticamente todo peroxinitrito produzido, o que é esperado, e produzem praticamente a mesma quantidade de oxidantes que estimulam formação de DAFT.

Ainda sobre este detalhe, teoricamente, o aumento da concentração de boronato deveria levar a taxa de aceleração de SIH à zero, como ocorre nos ensaios com ebselen e porfirina de manganês.

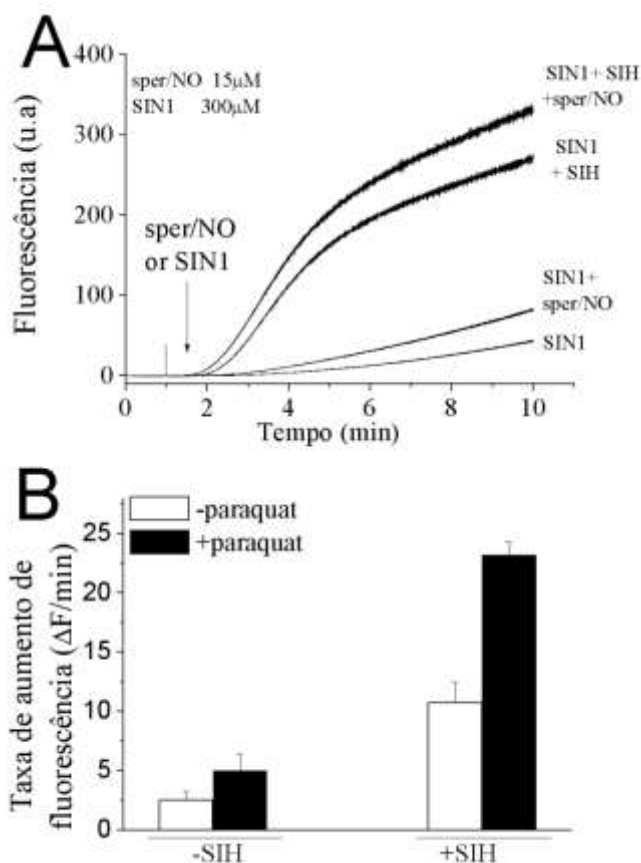
A aceleração de SIH resistente a boronatos pode ter duas razões: i) pode existir limite da quantidade de boronato que consegue entrar nas células; neste caso, aceleração na presença de SIH resistente a boronato ainda pode ser consequência da remoção de LIP. ii) não se pode descartar a possibilidade de que LIP também reaja com  $\text{NO}_2^\bullet$  derivado de peroxinitrito e da reação entre peroxinitrito e boronato. Considerando que os experimentos na presença de bicarbonato apontam na mesma direção e que metais reconhecidamente reagem muito rapidamente com estes oxidantes radicalares, a segunda possibilidade é mais plausível.

#### **4.2.5. LIP previne processos nitrosativos em condições de *stress*?**

A hipótese de que LIP reage com peroxinitrito mostrou-se sólida quando testada em experimentos de competição com porfirina de Mn, ebselen e dois compostos derivados de ácido borônico. Em seguida, experimentos na presença de compostos que produzem fluxo contínuo de peroxinitrito foram realizados com dois propósitos. Primeiro, para fortalecimento da hipótese da reação direta entre LIP e  $\text{ONOO}^-$ . Depois, para investigar se LIP pode prevenir processos nitrosativos em situação de estresse. Para esta finalidade, foram utilizados Paraquat (dicloridrato de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridino) e SIN-1 (cloridrato de 3-morpholinossidnonimina). SIN-1 se decompõe espontaneamente levando à produção estequiométrica de  $\bullet\text{NO}$  e  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , o que resulta na produção contínua de  $\text{ONOO}^-$ .

Tanto paraquat (na presença do doador de  $\bullet\text{NO}$  sper/NO) quanto SIN-1 (na ausência e na presença de sper/NO) na suspensão de células tratadas com DAF2-DA proporcionam formação de DAFT a taxas superiores às aquelas de sper/NO isoladamente, como é evidenciado pelo coeficiente angular das curvas de fluorescência vs tempo (Figura 32A e 32B). Mais importante, em ambos os casos, a presença de SIH aumenta a taxa de formação de DAFT consideravelmente, fortalecendo a hipótese de que LIP reage com peroxinitrito produzindo compostos

não nitrosantes, agora em condições onde peroxinitrito é seguramente formado. O resultado indica também que LIP pode exercer papel de proteção em situações estresse nitrosativo, onde espécies derivadas de  $\bullet\text{NO}$  são produzidas em maior quantidade.



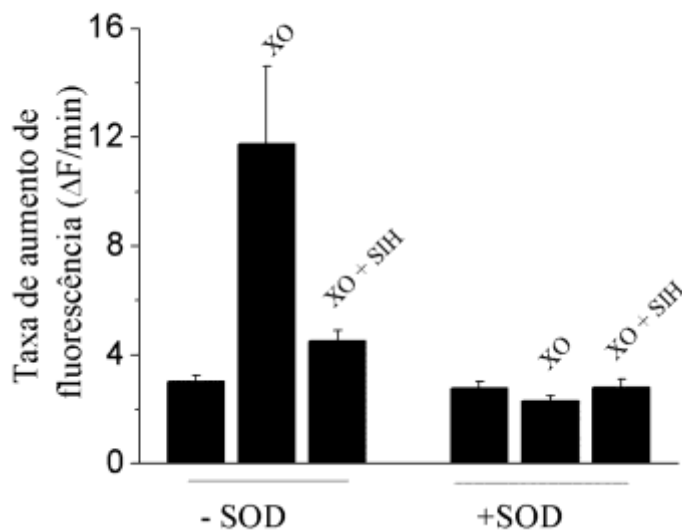
**Figura 32** – Aceleração da nitrosação de DAF-2 promovida por SIH em condições onde há fluxo de  $\text{ONOO}^-$ . A) Células tratadas com DAF-2DA foram suspensas em PBS/DTPA contendo +/- 300  $\mu\text{M}$  de SIN-1 na presença e ausência de SIH. Para comparação foram realizados controles com sper/NO 15  $\mu\text{M}$ . B) Células tratadas com DAF-2DA foram suspensas em PBS/DTPA contendo Paraquat (10 $\mu\text{M}$ ) na presença e ausência de SIH. A produção de  $\text{ONOO}^-$  foi garantida pela adição de sper/NO 15 $\mu\text{M}$ . Nos dois experimentos  $T = 37^\circ\text{C}$ . Os valores representam a média de 3 medidas  $\pm\text{D.P.}$  De acordo com o teste t-Student os valores são significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ) para amostras que pertençam ao mesmo grupo (-SIH e +SIH).  $\lambda_{\text{ex.}} = 495\text{nm}$ ;  $\lambda_{\text{em.}} = 520\text{nm}$ .

#### 4.2.6. O efeito de SIH é dependente de células?

Os resultados de todos os experimentos apresentados estão de acordo com a hipótese de que LIP reage diretamente com peroxinitrito formando espécies não nitrosantes, o que sugere que esta reserva de ferro seja protetiva em situações onde as células encontram-se sob *stress* nitrosativo dependente de peroxinitrito. Esta premissa naturalmente leva à conclusão de que processos nitrosativos dependentes de peroxinitrito não podem ser reproduzidos em sistema não celular, simplesmente porque LIP não está presente. Felizmente, isto é facilmente testável. Para isso, a formação de DAFT em PBS estimulada pelo sistema X/XO e do doador de NO sper/NO foi investigada na ausência e na presença de SIH.

Na ausência de XO, a formação de DAFT é decorrente da reação de auto-oxidação de  $\bullet\text{NO}$ , devido a formação de  $\text{NO}_2^\bullet$  e  $\text{N}_2\text{O}_3$ , e pode ocorrer via nitrosação e nitrosilação oxidativa. Embora auto-oxidação seja irrelevante em sistemas celulares ele é predominante em sistemas não celulares. Na presença do sistema X/XO, com fluxo de superóxido de  $10 \text{ nMs}^{-1}$  previamente determinado, observa-se aumento considerável da taxa de formação de DAFT, confirmando resultados anteriores de que  $\text{O}_2^\bullet$  estimula a formação de DAFT.

Coerentemente, este aumento é completamente revertido na presença de SOD. Espey et al.<sup>86</sup> elucidaram a formação de DAFT, que nesta situação ocorre via nitrosação e principalmente via nitrosilação oxidativa, os mesmos mecanismos observados em células. Relevantemente, SIH não acelera a formação de DAFT nestas condições. Pelo contrário, a taxa de formação de DAFT é inibida por SIH, sugerindo que SIH reaja com peroxinitrito ou derivados radicalares de peroxinitrito, produzindo espécies não oxidantes e não nitrosantes. Este resultado é importante, pois confirma a expectativa de que a aceleração da formação de DAFT depende de células, isto é, de constituinte celular que reage com SIH e BIPY. Adicionalmente, revela que reações diretas de peroxinitrito com SIH ou de radicais de peroxinitrito com SIH não ocorrem extensivamente no interior celular, do contrário, observaríamos diminuição e não aumento de processos nitrosativos. Finalmente, tais reações não produzem agentes oxidativos ou nitrosativos. Do contrário, produziriam aumento da formação de DAFT.

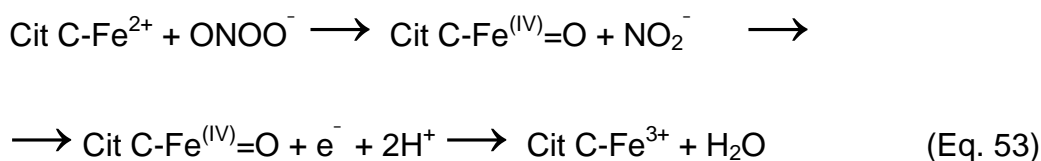


**Figura 33** – O efeito do SIH é dependente da presença de células. Solução de DAF-2 (1 $\mu$ M) em PBS contendo 100 $\mu$ M de xantina e xantina oxidase foram expostas a SIH (100 $\mu$ M) e sper/NO (15 $\mu$ M) na presença e ausência de SOD (100U/mL). Os espectros foram coletados com  $\lambda_{ex}$ = 495nm, e os gráficos construídos a partir da emissão em  $\lambda_{em}$ = 520nm. Os valores representam médias de 3 medidas  $\pm$ D.P. As amostras são significativamente diferente entre si dentro do conjunto sem SOD ( $p < 0,05$ ), porém não apresentaram diferenças significativas na presença de SOD.

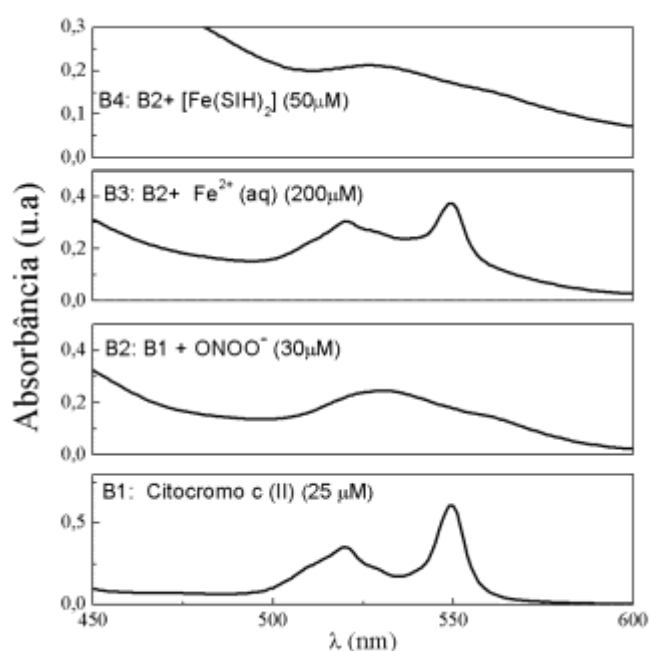
#### 4.2.7. LIP, um possível agente antioxidante?

A premissa de que LIP reage com peroxinitrito ou com radicais derivados de peroxinitrito é sustentada na observação de que remoção de LIP com quelantes aumenta processos nitrosativos que formam DAFT. Naturalmente, portanto, o complexo formado por LIP e SIH não deve reagir com peroxinitrito. Do contrário, a hipótese deveria ser modificada. Para testar esta hipótese desenvolvemos uma abordagem experimental de competição entre o complexo  $[\text{Fe}(\text{SIH})_2]$  e Fe(II)Citocromo C por peroxinitrito. Esta ferro-heme-proteína reage com peroxinitrito com constante de velocidade de  $2,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ <sup>164</sup>, produzindo Fe(III)Citocromo C e  $\text{NO}_2^\bullet$ . Fe(II)Citocromo C foi selecionado para esta competição porque a constante de velocidade da sua reação com peroxinitrito não é tão elevada. De fato, a velocidade da reação direta entre Fe(II)Citocromo C e peroxinitrito é apenas 10 vezes mais rápida do que a quebra homolítica do ácido peroxinitroso. Então, racionalmente, se

excesso do complexo  $[\text{Fe}(\text{SIH})_2]$  não compete com  $\text{Fe}(\text{II})$ Citocromo C não deve competir nem mesmo com a quebra homolítica do ácido peroxinitroso.



A reação de peroxinitrito com citocromo c (II) na presença ou ausência do complexo  $[\text{Fe}(\text{SIH})_2]$  foi acompanhada via UV/VIS na região das bandas  $\alpha$  e  $\beta$  do citocromo c, entre 600 e 450 nm.



**Figura 34** – LIP protege citocromo C de ser oxidado por outras espécies.  $\text{Fe}(\text{II})$ Citocromo C, previamente preparado pela redução com ditionito de sódio, foi dissolvido em PBS sem DTPA, e exposto a diferentes situações e seu espectro UV-vis coletado. 1) Citocromo C  $25\mu\text{M}$ . 2) Citocromo C  $25\mu\text{M}$  na presença de  $\text{ONOO}^-$   $30\mu\text{M}$ . 3) Citocromo C  $25\mu\text{M}$  na presença de  $\text{Fe}^{2+}$   $200\mu\text{M}$  e  $\text{ONOO}^-$   $30\mu\text{M}$ . 4) Citocromo C  $25\mu\text{M}$  na presença de  $[\text{Fe}(\text{SIH})_2]$   $50\mu\text{M}$  +  $\text{ONOO}^-$   $30\mu\text{M}$ .

O primeiro espectro da figura 34 apresenta o espectro de absorção de  $25\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}(\text{II})$ Citocromo C, com sua banda característica em  $550\text{nm}$ . Em seguida,  $30\mu\text{M}$  de  $\text{ONOO}^-$  foi adicionado e o espectro coletado novamente 30 segundos após. No segundo espectro é notável que adição de  $\text{ONOO}^-$  oxidou completamente o  $\text{Fe}(\text{II})$ Citocromo C para  $\text{Fe}(\text{III})$ Citocromo C, caracterizado por sua banda larga em  $530\text{nm}$ . Peroxinitrito absorve em comprimentos de onda abaixo de  $400\text{nm}$ , assim, podemos descartar qualquer interferência desta espécie no espectro obtido. Além

disso,  $\text{ONOO}^-$  decompõe-se rapidamente em pH 7,4 formando espécies que também não absorvem na faixa de comprimento de onda observado. Em seguida,  $\text{ONOO}^-$  foi adicionado a uma mistura contendo 25  $\mu\text{M}$  de Fe(II)Citocromo C e 50, 100 ou 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  (aq) em solução desoxigenada.

Embora não seja possível reproduzir as propriedades químicas de LIP em sistemas não celulares, 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  protegeu a oxidação de Fe(II)Citocromo C por cerca de 50% (espectro 3). Mais importante, não há proteção da oxidação de Fe(II)Citocromo C por peroxinitrito na presença de 50  $\mu\text{M}$  do complexo  $[\text{Fe}(\text{SIH})_2]$ . Também não houve proteção da oxidação de Fe(II)Citocromo C em experimento idêntico repetido com 10  $\mu\text{M}$  de Fe(II)Citocromo C. Isto é, o complexo  $[\text{Fe}(\text{SIH})_2]$  não protege a oxidação de Fe(II)Citocromo C nem mesmo numa proporção de 5:1. Embora muito importante, este resultado era esperado. Oxidação de metais por peroxinitrito geralmente requer coordenação do peroxinitrito pelo metal<sup>160</sup>, o que não é possível para o complexo  $[\text{Fe}(\text{SIH})_2]$ , já que duas moléculas de SIH saturam a esfera de coordenação do ferro. Não foi possível realizar experimentos com concentrações do complexo  $[\text{Fe}(\text{SIH})_2]$  maiores devido ao limite de solubilidade de SIH, que é em torno de 150  $\mu\text{M}$ .

#### 4.2.8. Discussão – Parte II

LIP é uma reserva de ferro que está associada a proteínas de baixo peso molecular e que atua como uma espécie de reserva imediata de ferro para ser incorporada em ferro-proteínas<sup>165</sup>. Embora o ferro seja uma espécie química importante para as células, fazendo parte da composição de muitas proteínas e se envolvendo em diversos processos biológicos fundamentais, a facilidade com a qual o metal se engaja em reações redox pode tornar essa espécie perigosamente tóxica. Coerentemente, o controle dos níveis de ferro intracelular é cuidadosamente regulado por mecanismos homeostáticos nos níveis sistêmicos e celular,<sup>131</sup>. Estas proteínas são capazes de manter a concentração celular de LIP em um nível ótimo, onde pode ser usado para suas funções específicas sem que cause danos às células.

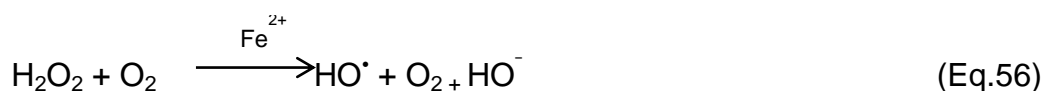
A dificuldade de se isolar e determinar a composição química do LIP dificulta a definição das propriedades químicas que esta reserva de ferro possui. Sabe-se que LIP é facilmente removido por quelantes permeáveis a membranas celulares, além disso, sabe-se que em situações em que a concentração de LIP é aumentada pela adição de sais de Fe, as células tornam-se mais susceptíveis a danos quando expostas a condições de estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio.

A capacidade que LIP possui de participar de reações redox com espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) pode resultar na formação de espécies ainda mais reativas que seus precursores, causando oxidação e nitroação de componentes celulares <sup>146; 147; 148; 149; 150</sup> com consequente perda de função destes componentes, ou danos irreparáveis capazes de levar as células à morte.

A reação de Fenton corresponde a uma destas reações potencialmente tóxicas catalisadas por LIP. Nesta reação, peróxido de hidrogênio reage com  $\text{Fe}^{2+}$  levando à formação de radical hidroxila  $\text{HO}^\bullet$ , que reage com inúmeros componentes celulares muito rapidamente e indiscriminadamente. A produção de  $\text{HO}^\bullet$  pode se tornar catalítica se uma espécie reduzir  $\text{Fe}^{3+}$  para  $\text{Fe}^{2+}$ , como ilustrado pela equação 55 com  $\text{O}_2^{\bullet-}$  como redutor. Em conjunto as equações 54-56 constituem o processo de Haber – Weiss.



A equação global é dada por:



Embora este processo seja bem conhecido e disseminado na literatura, sua relevância biológica já foi colocada em dúvida devido à cinética desfavorável ( $10^2 < k < 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) da reação 54. Adicionalmente, o processo é inibido na presença de  $\bullet\text{NO}$  devido à reação deste com  $\text{Fe}^{2+}$ , que resulta na formação de DNIC, que são complexos estáveis e aparentemente inativos para processos redox.



A questão fundamental que permanece é: LIP catalisa a formação de espécies reativas e aumenta processos nitroxidativos nas células?

Aparentemente sim. Não é difícil encontrar estudos na literatura que correlacionam o aumento de LIP com danos a componentes biológicos, por exemplo, quelantes geralmente previnem oxidação de lipoproteínas de baixo peso molecular (LDL) protegendo células *HUVEC* da citotoxicidade provocada por LDL oxidado<sup>166</sup>. Observou-se ainda que diferentes linhagens de células de linfoma de rato tipo L5178Y apresentavam diferentes resistências a danos de DNA provocado por peróxido de hidrogênio. A linhagem denominada LY-R, a mais sensível a peróxido de hidrogênio, apresenta um conteúdo de LIP cerca de 3 vezes maior que a outra linhagem, conhecida como LY-S. A quantidade de LIP presente nestas células apresentou correlação com o dano em DNA provocado pela exposição de  $H_2O_2$ <sup>146</sup>, mais uma vez demonstrando que nestes casos quanto maior a concentração de LIP maior o dano em DNA. Observa-se ainda que o emprego do quelante SIH mostrou-se eficiente na proteção de cardiomioblastos H92C contra stress oxidativo causado por exposição a peróxido de hidrogênio<sup>151</sup>, sugerindo que terapia de quelação pode ser empregado no combate de doenças cardiovasculares induzidas por excesso de Ferro.

Embora seja comum encontrar estudos que demonstrem o papel pró-oxidativo exercido por LIP, é importante ressaltar que grande parte destes estudos são conduzidos expondo as células à condições extremas de estresse oxidativo. Geralmente estes estudos são realizados pela adição de grandes quantidades de peróxido de hidrogênio, ou ainda, pelo aumento da concentração intracelular de ferro. Nestas duas condições é razoável esperar que a reação de Fenton torne-se relevante, uma vez que a concentração de uma (ou mais de uma) das espécies envolvidas no processo é aumentada. Com isso, a conclusão apresentada nestes estudos apesar de correta, podem não refletir a realidade nas condições normais em que as células se encontram.

Neste trabalho, a compreensão das reações redox nas quais LIP se envolve foi ampliada pela identificação da reação direta entre LIP e peroxinitrito e possivelmente pelas reações entre LIP e os radicais derivados da decomposição de  $ONOO^-$ . Este novo olhar sobre a química redox do LIP pode contribuir para o entendimento do papel que LIP exerce no interior das células, pois, como foi

mostrado, a remoção de LIP por quelantes (especialmente SIH) provoca aumento da nitroação de DAFT dependente de superóxido e peroxinitrito. Devido a natureza radicalar dos mecanismos de formação de DAFT, não é incorreto extrapolar que remoção de LIP também implique em aumento da nitroação de outros componentes celulares, como proteínas, DNA ou lipídios. Estas expectativas serão estudadas nos Laboratórios do grupo.

A tese de que LIP atue como agente antinitrosante e possivelmente antioxidante foi construída a partir da observação de que adição de um quelante permeável à membrana celular (SIH ou BIPY) aumentam a taxa de nitroação de DAF-2. Isso significa dizer que a remoção de LIP favorece a ocorrência de estresse nitrosativo e oxidativo dependente de peroxinitrito, o que aparentemente vai contra o que é normalmente relatado na literatura.

Em nossos ensaios descobrimos que a presença de LIP reduz a nitroação de DAF-2 em cerca de 75% e testes preliminares (não apresentados neste trabalho) mostraram que LIP também previne cerca de 60% a oxidação de H<sub>2</sub>DCF (dihidrofluoresceína).

Interpretamos os resultados obtidos focando na possibilidade de que LIP e peroxinitrito reagem entre si, diminuindo a nitroação de DAF2, e especulamos que LIP, nas condições experimentais que trabalhamos, também deve proteger outras biomoléculas de serem oxidadas, nitrosiladas e nitrosadas.

Reações entre peroxinitrito e ferro proteínas não representam nenhuma novidade. Mecanismos de isomerização de peroxinitrito para nitrato, catalisado por hemoglobina ou mioglobina, são conhecidos<sup>167; 168</sup> e se processam através da formação de um intermediário ferril, (Fe<sup>iv</sup>=O), que pode ser posteriormente reduzido por outras espécies no interior das células.

Para que LIP possa exercer papel de proteção contra oxidação e nitroação é necessário que o produto final da reação não seja oxidante, ou nitrosante, portanto, especulamos que reação entre LIP e ONOO<sup>-</sup> possa ser descrita pela equação 57.



Na primeira etapa da reação, os produtos são  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{LIPFe}^{\text{IV}}=\text{O}$ , e a espécie ferril pode ser reduzida por algum componente celular regenerando LIP ou pode ainda reagir com outra molécula de  $\text{ONOO}^-$  de acordo com a equação 58, formando  $\text{LIPFe}^{\text{(III)}}$ . Uma vez que LIP nos estados  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  parecem ser interconversíveis no interior das células pela ação de redutores, a reação entre LIP e  $\text{ONOO}^-$  deve ser catalítica, o que garante proteção contínua sem esgotamento do ferro intracelular.

A reação entre LIP e  $\text{ONOO}^-$  poderia ser questionada se for considerada a velocidade com que  $\text{ONOO}^-$  se decompõe, especialmente na presença de  $\text{CO}_2$ , que catalisa a decomposição de peroxinitrito produzindo espécies nitrosantes. Contudo, foi demonstrado a reação de mioglobina ( $\text{MbFe}^{2+}$ ) com  $\text{ONOO}^-$  ( $k = 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) é cerca de duas ordens de magnitude maior que reação entre  $\text{ONOO}^-$  e  $\text{CO}_2$  ( Eq.35) o que é consistente com os resultados que foram obtidos em nossos ensaios.

O aumento de marcadores de estresse oxidativo (peroxidação lipídica) pela remoção de ferro com quelante já foi identificado anteriormente. Sergent et al.<sup>169</sup> demonstraram que a remoção de complexos de ferro de baixa massa molecular pela adição de quelantes aumenta a peroxidação lipídica em células hepáticas previamente estimuladas a produzir  $\bullet\text{NO}$  (estímulo com LPS) e enriquecidas com ferro. O grupo interpretou os resultados com base na reação de LIP e  $\bullet\text{NO}$ , formando complexos inativos do ponto de vista redox. Com isso, a remoção de ferro pelo quelante inibiria a formação de tais complexos e aumentaria reações que levam à peroxidação lipídica dependentes de  $\bullet\text{NO}$ .

Os resultados obtidos por Sergent et al.<sup>169</sup> poderiam facilmente ser interpretados do ponto de vista da reação entre LIP e  $\text{ONOO}^-$ . O quelante removeria LIP presente nos hepatócitos, evitando a reação de peroxinitrito com LIP e aumentando a produção de espécies nitrosantes. É importante ressaltar que nos experimentos realizados por Sergent et al.<sup>169</sup> foram encontradas evidências de que ferro também era capaz de promover peroxidação lipídica. Nestes casos, o tratamento das células com nitriloacetato de ferro promovia aumento da concentração de ferro intracelular, e este aumento resultava em maior índice de peroxidação lipídica, demonstrando que o efeito do ferro em processos deste tipo é dependente de sua concentração intracelular.

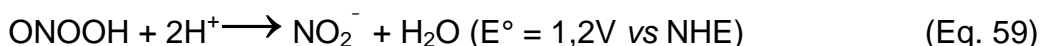
Fritsche et al.<sup>170</sup> relatam que aumento da concentração de ferro em co-culturas de *plasmodium falciparum* e macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e  $\gamma$ -IFN aumenta a sobrevivência do *plasmodium*, enquanto que a remoção de ferro via desferrioxamina diminui a sobrevivência do *plasmodium*. Os autores interpretam estes resultados pela biodisponibilidade de ferro, mas será que LIP não protege *plasmodium* de ataques oxidativos de peroxinitrito oriundo dos macrófagos?

Controversamente à nossa proposta, existem estudos que apontam o papel pró-oxidativo do ferro em reações com  $\text{ONOO}^-$  ou outros oxidantes, especialmente  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Metaloporfirinas de  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Mn}^{3+}$  mostraram-se capazes de reduzir peroxinitrito por um elétron, produzindo  $\text{NO}_2^\bullet$  e composto ferril-oxo, o que resulta em aumento da quantidade de espécies oxidantes quando comparado com a reação de decomposição de peroxinitrito<sup>171; 172; 173</sup>. Inclusive enzimas como  $\text{Cu}^{2+}$ -Zn SOD e  $\text{Mn}^{3+}$ -Zn SOD aumentam nitração e oxidação de substratos pela redução monoelétrica de  $\text{ONOO}^-$ <sup>171; 174; 175; 176</sup>.

Apesar disso, complexos metálicos que agem como antioxidantes prevenindo dano causado por peroxinitrito já foram relatados e explorados em testes clínicos com animais<sup>177</sup>. Exemplos destes complexos incluem porfirinas de ferro e de manganês como, 5,10,15,20-tetrakis(4-fenilsulfonato)porfirinato de ferro (III) (FeTPPS), 5,10,15,20-tetrakis(2,4,6-trimetil-3,3-disulfonatophenil) porfirinato de ferro (III) (FeTMPS) e 5,10,15,20-tetrakis(N-metil-4'-piridil)porfirinato de ferro (III) (FeTMPyP)<sup>178</sup>. Estes complexos foram inicialmente idealizados para remoção de superóxido intracelular, mas também reagem com peroxinitrito e mostraram ser eficientes em tratamentos de situações patológicas supostamente associadas com peroxinitrito<sup>177; 178; 179</sup>. Apesar destes complexos serem administrados tipicamente no estado de oxidação 3+, no interior das células eles podem ser reduzidos para o estado 2+ por flavoenzimas, glutatona, ascorbato e até por superóxido em condições normais de oxigenação<sup>106; 180</sup>.

A redução parece ser um pré-requisito para que estes complexos possam exercer papel de antioxidante na presença de peroxinitrito<sup>179</sup>, pois, ao contrário do que acontece com os complexos nos estados de oxidação +3, os complexos divalentes reagem com peroxinitrito em reações que envolvem dois elétrons, formando espécies oxo ( $\text{M}^{4+}=\text{O}$ ) e nitrito, com constante de velocidade da ordem de  $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  em reações similares com a reação apresentada na equação 57.

Como mostrado, a proposta de que LIP pode atuar como agente antinitrosante (e antioxidante) apesar de parecer incompatível com muitos trabalhos, possui precedentes na literatura. Estes precedentes se apresentam do ponto de vista cinético, que trata da possibilidade de que  $\text{ONOO}^-$  seja reduzido por dois elétrons por metais de transição em ambiente celular, do ponto de vista termodinâmico, a partir do potencial de redução mostrado na equação 51, e do ponto de vista biológico, como discutido acima.



Com isso, consideramos,  $\text{Fe}^{2+}$  deve ser o responsável pelo fator de proteção conferido pelo LIP, pois deve ser capaz de reduzir peroxinitrito por dois elétrons, enquanto que  $\text{Fe}^{3+}$  deve ser a espécie potencialmente tóxica, por promover a redução monoelétrica de peroxinitrito para  $\text{NO}_2^\cdot$ , provocando danos.

Ao longo do trabalho foram realizadas diversas tentativas de aumentar a concentração intracelular de ferro pela adição de sais de ferro ( $\text{FeSO}_4$ ), ou pela promoção de condições de hipóxia, como descrito por Lancaster et al.<sup>181</sup>, para avaliar o efeito que este aumento provoca na taxa de formação de DAFT. Infelizmente os resultados foram variados, em alguns casos o tratamento com sais de ferro aumentava a formação de DAFT em outros diminuía. Portanto, não foi possível chegar a nenhuma conclusão clara de como o aumento da concentração de ferro interfere na taxa de formação de DAFT nas nossas condições experimentais.

É possível especular que a variação apresentada nos resultados pode ser decorrente de variações na proporção de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ , o que em alguns momentos levaria a diminuição da nitrosação enquanto que em outros aumento.

Em termos biológicos, situações crônicas onde há aumento da concentração de LIP pode provocar esgotamento da capacidade que as células possuem de manter LIP no estado de oxidação 2+. Com isso, a reação entre LIP e  $\text{ONOO}^-$  pode deixar de exercer papel antioxidante e passa a exercer papel pro-oxidante, causando danos aos mais diversos componentes celulares. Este inclusive deve ser o caso de estudos que aumentam a concentração de LIP pela adição de sais de ferro, como de Fritsche et al.<sup>170</sup>.

Todas estas observações fazem com seja necessário analisar cuidadosamente o papel que LIP exerce em processos oxidativos e nitrosativos. Esta análise deve ser feita caso a caso, evitando ao máximo fazer generalizações, pois como demonstrado, o *status* redox do LIP pode modificar completamente o papel que exerce.

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que LIP possa exercer algum papel nos mecanismos de formação de s-nitrosotióis. Foi demonstrado que LIP pode participar do mecanismo de formação de s-nitrosoproteínas a partir de sua reação com  $\bullet\text{NO}$ , que resulta na produção de DNIC, que por sua vez é capaz de transferir um de seus ligantes nitrosilo para o grupo tiol de proteínas diretamente em um processo conhecido como trans-nitrosação<sup>47</sup>.

Em condições normais, o mecanismo de trans-nitrosação deve ser o principal responsável pela formação de s-nitrosoproteínas. Porém, com o aumento da concentração de  $\bullet\text{NO}$ , SOD começa a perder a competição por superóxido e a reação entre  $\bullet\text{NO}$  e  $\text{O}_2^{\bullet-}$  torna-se relevante, levando à produção de  $\text{ONOO}^-$ . Este por sua vez pode desencadear a formação de processos nitrosativos dependentes de peroxinitrito, incluindo a formação de s-nitrosotióis.

Bosworth et al.<sup>47</sup> demonstraram ainda que em células RAW 264.7 a quantidade de s-nitrosoproteínas triplica quando as células são expostas a condições de estresse oxidativo pela adição de DMNQ, que atua produzindo superóxido no interior celular. Este aumento é cancelado pela adição de captadores de  $\text{ONOO}^-$  como MnTbap. Realizamos testes preliminares para verificar o efeito que adição de quelantes exercia na formação de s-nitrosoproteínas em condições de estresse oxidativo simuladas pela adição de SIN-1 + sper/ $\bullet\text{NO}$  e Paraquat + sperNO. Nestes testes observou-se que em todos os casos remoção de LIP provocou redução na quantidade de s-nitrosoproteínas, o que é consistente com a observação de Bosworth et al.<sup>47</sup> de que adição de SIH reduz parcialmente a quantidade s-nitrosoproteínas formadas na presença de DMNQ.

O papel que LIP exerce na formação de s-nitrosoproteínas em condições de estresse ainda não é compreendido, pois a presença de oxidantes pode alterar a quantidade de LIP no estado de oxidação 3+, promovendo nitrosação como já foi discutido. E, além disso, não é possível estudar o papel que LIP no estado de oxidação 2+ exerce na formação de s-nitrosoproteínas sem expor as células a

condições de estresse oxidativo, o que cria uma espécie de paradoxo dificultando o estudo.

Está claro que LIP pode exercer um papel antagônico quando se trata da formação de s-nitrosoproteínas. Sabe-se que LIP pode promover s-nitrosação de proteínas através da formação de DNIC's. Neste processo, DNIC formado a partir de LIP e  $\bullet\text{NO}$  pode nitrosar proteínas via trans-nitrosação. As reações de trans-nitrosação entre proteínas são, possivelmente, específicas devido ao reconhecimento entre proteínas e, portanto, devem corresponder a processos de sinalização dependentes de  $\bullet\text{NO}$ . Por outro lado, como é mostrado aqui, LIP exerce papel de proteção contra s-nitrosação indiscriminada promovida por radicais derivados do  $\text{ONOO}^-$ . O papel protetor é decorrente da reação entre LIP e  $\text{ONOO}^-$  com consequente produção de espécies não nitrosantes, como  $\text{NO}_2^-$ .

## **5. Conclusão**



O presente trabalho buscava analisar processos nitrosativos intracelulares do ponto de vista da nitroação do indicador fluorescente 4,5-diaminofluoresceína (DAF2). Ficou claro que a nitroação do DAF2 é estimulada por superóxido endógeno e este processo ocorre por dois mecanismos distintos que se processam por intermédio de peroxinitrito. Estes mecanismos, que já foram previamente descritos, se processam simultaneamente e são chamados nitrosilação oxidativa e nitroação, de modo que o primeiro mecanismo prevalece sobre o segundo em todas as condições estudadas. Foi observado ainda que a nitroação do DAF2 segue um perfil cinético peculiar e inédito, apresentado transição cinética de primeira ordem relativa à  $\bullet\text{NO}$  para ordem zero. A mudança no perfil cinético está relacionada com esgotamento do superóxido endógeno que limita a velocidade quando a concentração de  $\bullet\text{NO}$  é alta. Adicionalmente ficou claro que processos nitrosativos estimulados por superóxido podem apresentar perfil cineticamente diferente, ainda que se processem pelos mesmos mecanismos, quando o local da recombinação entre  $\bullet\text{NO}$  e  $\text{O}_2^{\bullet-}$  ocorre no ambiente intra ou extracelular.

O ponto mais importante do estudo foi a identificação do papel fundamental que ferro lábil (LIP) exerce em processos nitrosativos e oxidativos. Foi constatado que, ao contrário do que é normalmente relatado, LIP é capaz de inibir processos nitrosativos dependentes de superóxido. A atuação antinitrosante (e antioxidante) do LIP está relacionada com sua reação com peroxinitrito (ou com seus produtos de decomposição;  $\text{NO}_2^{\bullet}$ ,  $\text{CO}_3^{\bullet-}$ ), formando nitrito e outras espécies não nitrosantes. Quimicamente, as hipóteses de que LIP pode reduzir  $\text{ONOO}^-$  e seus derivados inibindo nitroação são totalmente plausíveis, contudo, baseado em nossos estudos e em considerações cinéticas, é mais provável que a reação entre LIP e  $\text{ONOO}^-$  ocorra antes da homólise de  $\text{ONOO}^-$ . Estas descobertas evidenciam que LIP possui um papel antagônico, podendo atuar como agente pró-oxidante ou antioxidante, e este antagonismo parece estar intimamente relacionado com *status* redox do LIP e das condições em que a célula se encontra.

Está claro que processos nitrosativos intracelulares podem ocorrer a partir de reações que envolvem oxidantes fortes como  $\text{NO}_2^{\bullet}$ ,  $\text{CO}_3^{\bullet-}$ ,  $\text{ONOO}^-$ . Esta via radicalar possui baixa especificidade em função das características das espécies envolvidas, o que faz com que tais processos sejam potencialmente tóxicos. Com relação à formação de s-nitrosoproteínas, quando esta modificação pós traducional

se processa a partir destes mecanismos radicalares oxigênio deixa de ser um inibidor de tais processos e passa a ser uma espécie fundamental para que ocorram, ao contrário dos processos de formação de s-nitrosoproteínas controlados como transnitrosação. Da mesma forma, ferro lábil pode inibir a formação de s-nitrosoproteínas consumindo espécies capazes de s-nitrosar proteínas, o que é um comportamento contrário ao apresentado em outros trabalhos que mostram correlação positiva entre LIP, DNIC e s-nitrosotióis. O papel que LIP e oxigênio exercem na formação de s-nitrosoproteínas bem como as vias pelas quais estes processos ocorrem parece ter relação com a concentração das espécies reativas e com o do *status* redox celular. É muito provável que a forma como estas espécies atuam no processo de formação de s-nitrosoproteínas define se tais modificações serão tóxicas ou se regularão alguma função biológica importante.

## **6. Referências Bibliográficas**

- 1 YETIK-ANACAK, G.; CATRAVAS, J. Nitric oxide and the endothelium: History and impact on cardiovascular disease. **Vascular Pharmacology**, v. 45, n. 5, p. 268-276, 2006.
- 2 ALCIDES, O. O. **Química Inorgânica**. São Paulo Edgar Blucher LTDA, 1973. 428 p.
- 3 FUKUTO, J. **Nitric Oxide Biochemistry, Molecular Biology and Therapeutic Implications**. 1. San Diego, California: Academic Press, 1995. 530
- 4 TOLEDO, J. C.; AUGUSTO, O. Connecting the chemical and biological properties of nitric oxide. **Chemical Research in Toxicology**, v. 25, n. 5, p. 975-89, 2012.
- 5 BARTBERGER, M. et al. The reduction potential of nitric oxide (NO) and its importance to NO biochemistry. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 17, p. 10958-10963, 2002.
- 6 ABU-SOUD, H. M.; HAZEN, S. L. Nitric oxide is a physiological substrate for mammalian peroxidases. **Journal Biological Chemistry**, v. 275, n. 48, p. 37524-32, 2000.
- 7 SARTI, P. et al. Cytochrome c oxidase and nitric oxide in action: Molecular mechanisms and pathophysiological implications. **Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics**, v. 1817, n. 4, p. 610-619, 2012.
- 8 JOSHI, M. S. et al. Nitric oxide is consumed, rather than conserved, by reaction with oxyhemoglobin under physiological conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 16, p. 10341-10346, 2002.
- 9 WOLAK, M.; VAN ELDIK, R. To be or not to be NO in coordination chemistry? A mechanistic approach. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 230, n. 1-2, p. 263-282, 2002.
- 10 ENEMARK, J.; FELTHAM, R. Principles of structure, bonding, and reactivity for metal nitrosyl complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 13, n. 4, p. 339-406, 1974.
- 11 EISENBERG, R.; MEYER, C. The coordination chemistry of nitric oxide. **Accounts of chemical research**, v. 8, p. 9, 1975.

- <sup>12</sup> FRANKE, A.; RONCAROLI, F.; VAN ELDIK, R. Mechanistic studies on the activation of NO by iron and cobalt complexes. **European Journal of Inorganic Chemistry**, n. 6, p. 773-798, 2007.
- <sup>13</sup> LANCASTER, J. Nitroxidative, nitrosative, and nitrative stress: Kinetic predictions of reactive nitrogen species chemistry under biological conditions. **Chemical Research in Toxicology**, v. 19, n. 9, p. 1160-1174, 2006.
- <sup>14</sup> CALCERRADA, P.; PELUFFO, G.; RADI, R. Nitric Oxide-Derived Oxidants with a Focus on Peroxynitrite: Molecular Targets, Cellular Responses and Therapeutic Implications. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 35, p. 3905-3932, 2011
- <sup>15</sup> BECKMAN, J.; KOPPENOL, W. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: The good, the bad, and the ugly. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 271, n. 5, p. p.1424-C1437, 1996.
- <sup>16</sup> GOLDSTEIN, S.; LIND, J.; MERENYI, G. Chemistry of peroxynitrites as compared to peroxynitrates. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 6, p. 2457-2470, 2005
- <sup>17</sup> PRYOR, W.; LIGHTSEY, J. Mechanism of nitrogen-dioxide reactions - Initiation of lipid peroxidation and the production of nitrous acid. **Science**, v. 214, n. 4519, p. 435-437, 1981.
- <sup>18</sup> FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-6, 1980.
- <sup>19</sup> IGNARRO, L. et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric-oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 24, p. 9265-9269, 1987.
- <sup>20</sup> PALMER, R.; FERRIGE, A.; MONCADA, S. Nitric-oxide release, accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, n. 6122, p. 524-526, 1987.
- <sup>21</sup> PALMER, R.; ASHTON, D.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v. 333, n. 6174, p. 664-666, 1988

- 22 PALMER, R. et al. L-Arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium dependent relaxation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 153, n. 3, p. 1251-1256, 1988
- 23 AKTAN, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. **Life Sciences**, v. 75, n. 6, p. 639-653, 2004.
- 24 ALDERTON, W.; COOPER, C.; KNOWLES, R. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochemical Journal**, v. 357, p. 593-615, 2001.
- 25 WHITE, K.; MARLETTA, M. Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein. **Biochemistry**, v. 31, n. 29, p. 6627-6631, 1992.
- 26 BREDD, D.; SNYDER, S. Nitric-oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 22, p. 9030-9033, 1989.
- 27 MARLETTA, M. Nitric-oxide synthase structure and mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 17, p. 12231-12234, 1993.
- 28 COLEMAN, J. Nitric oxide in immunity and inflammation. **International Immunopharmacology**, v. 1, n. 8, p. 1397-1406, 2001.
- 29 HIBBS, J.; TAINTOR, R.; VAVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity - Role for L-arginine deiminase and imino-nitrogen oxidation to nitrite. **Science**, v. 235, n. 4787, p. 473-476, 1987.
- 30 LIEW, F. et al. Resistance to leishmanina-major infection correlates with nitric-oxide synthase in murine macrophages. **European Journal of Immunology**, v. 21, n. 12, p. 3009-3014, 1991.
- 31 KRONCKE, K. et al. Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in gene regulation, cell death and cell survival. **International Immunopharmacology**, v. 1, n. 8, p. 1407-1420, 2001.
- 32 ARNOLD, W. et al. Nitric-oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3'-5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 8, p. 3203-3207, 1977

- 33 IGNARRO, L. Heme-dependent activation of cytosolic guanylate-cyclase by L-arginine-derived nitric oxide represents a novel transduction mechanism for transcellular signaling **European Journal of Pharmacology**, v. 183, n. 5, p. 1624-1625, JUL 1990.
- 34 \_\_\_\_\_. Heme-dependent activation of guanylate-cyclase and cyclic-GMP formation by endogenous nitric oxide- A unique transduction mechanism for transcellular signaling. **Pharmacology & Toxicology**, v. 67, n. 1, p. 1-7, 1990.
- 35 WOLIN, M.; WOOD, K.; IGNARRO, L. Guanylate-cyclase from bovine lung - A kinetic-analysis of the regulation of the purified soluble enzyme by protoporphyrin-IX, heme, and nitrosyl-heme. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 22, p. 13312-13320, 1982.
- 36 MARTIN, E. et al. **Nitric Oxide Cell Singnaling Mediated by cGMP**. 1. Boca Raton: CRC Press, 2006. 430 p.
- 37 HALL, C.; GARTHWAITE, J. What is the real physiological NO concentration in vivo? **Nitric Oxide-Biology and Chemistry**, v. 21, n. 2, p. 92-103, 2009.
- 38 BATCHELOR, A. et al. Exquisite sensitivity to subsecond, picomolar nitric oxide transients conferred on cells by guanylyl cyclase-coupled receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 51, p. 22060-22065, 2010.
- 39 MARTINEZ-RUIZ, A.; CADENAS, S.; LAMAS, S. Nitric oxide signaling: Classical, less classical, and nonclassical mechanisms (vol 51, pg 17, 2011). **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 3, p. 791-791, 2011
- 40 CLEETER, M. et al. Reversible inhibition of cytochrome-C-oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory-chain, by nitric oxide - Implications for neurodegenerative diseases. **Febs Letters**, v. 345, n. 1, p. 50-54, 1994.
- 41 BROWN, G. Nitric oxide and mitochondrial respiration. **Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics**, v. 1411, n. 2-3, p. 351-369, 1999.
- 42 SARTI, P.; GIUFRÈ, A.; BRUNORI, M. **Nitric Oxide, Cell Signaling and Gene Expression**. Boca Raton: CRC Press, 2006. 430 p.
- 43 BLOKZIJL.MF; VANGELDE.BF. Biochemical and biophysical studiess on cytochrome-AA3. EPR spectrum of NO-ferrocycytochrome A3. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 234, n. 3, p. 493-&, 1971

- 44 LANDER, H. M. et al. A molecular redox switch on p21(ras). Structural basis for the nitric oxide-p21(ras) interaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 7, p. 4323-6, 1997.
- 45 SARKAR, S. et al. Complex inhibitory effects of nitric oxide on autophagy. **Molecular Cell**, v. 43, n. 1, p. 19-32, 2011.
- 46 ANAND, P.; STAMLER, J. S. Enzymatic mechanisms regulating protein S-nitrosylation: implications in health and disease. **Journal of Molecular Medicine**, v. 90, n. 3, p. 233-44, 2012.
- 47 BOSWORTH, C. et al. Dinitrosyliron complexes and the mechanism(s) of cellular protein nitrosothiol formation from nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 12, p. 4671-4676, 2009.
- 48 DAIBER, A. et al. Chemical model systems for cellular nitros(yl)ation reactions. **Free Radicals Biology & Medicine**, v. 47, n. 4, p. 458-67, 2009.
- 49 FEELISCH, M. et al. Concomitant S-, N-, and heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo. **FASEB Journal**, v. 16, n. 13, p. 1775-85, 2002.
- 50 HESS, D. T. et al. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 2, p. 150-166, 2005.
- 51 BENHAR, M.; FORRESTER, M. T.; STAMLER, J. S. Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 10, p. 721-732, 2009.
- 52 BENHAR, M.; STAMLER, J. S. A central role for S-nitrosylation in apoptosis. **Nature Cell Biology**, v. 7, n. 7, p. 645-646, 2005.
- 53 HESS, D.; STAMLER, J. Regulation by S-Nitrosylation of Protein Post-translational Modification. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 7, p. 4411-4418, 2012.
- 54 MOHR, S.; STAMLER, J.; BRUNE, B. Posttranslational modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by S-nitrosylation and subsequent NADH attachment. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 8, p. 4209-4214, 1996.



- 55 KOKKOLA, T. et al. S-Nitrosothiols modulate G protein-coupled receptor signaling in a reversible and highly receptor-specific manner. **Bmc Cell Biology**, v. 6, p.1471-2121, 2005.
- 56 TAKAHASHI, H. et al. Hypoxia enhances S-nitrosylation-mediated NMDA receptor inhibition via a thiol oxygen sensor motif. **Neuron**, v. 53, n. 1, p. 53-64, 2007.
- 57 SUN, J. et al. Cysteine-3635 is responsible for skeletal muscle ryanodine receptor modulation by NO. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 20, p. 11158-11162, 2001.
- 58 BELLINGER, A. et al. Hypernitrosylated ryanodine receptor calcium release channels are leaky in dystrophic muscle. **Nature Medicine**, v. 15, n. 3, p. 325-330, 1078-8956, 2009.
- 59 HASHEMY, S.; HOLMGREN, A. Regulation of the catalytic activity and structure of human thioredoxin 1 via oxidation and S-nitrosylation of cysteine residues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 32, p. 21890-21898, 2008.
- 60 FANG, J. et al. S-nitrosylation of peroxiredoxin 2 promotes oxidative stress-induced neuronal cell death in Parkinson's disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 47, p. 18742-18747, 2007.
- 61 REINARTZ, M. et al. Nitrosative stress leads to protein glutathiolation, increased S-nitrosation, and up-regulation of peroxiredoxins in the heart. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 25, p. 17440-17449, 2008
- 62 WILLIAMS, J.; PAPPU, K.; CAMPBELL, S. Structural and biochemical studies of p21(Ras) S-nitrosylation and nitric oxide-mediated guanine nucleotide exchange. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 11, p. 6376-6381, 2003.
- 63 HEO, J.; CAMPBELL, S. Mechanism of p21(Ras) S-nitrosylation and kinetics of nitric oxide-mediated guanine nucleotide exchange. **Biochemistry**, v. 43, n. 8, p. 2314-2322, 2004.

- 64 OLIVEIRA, C. et al. The low molecular weight S-nitrosothiol, S-nitroso-N-acetylpenicillamine, promotes cell cycle progression in rabbit aortic endothelial cells. **Nitric Oxide-Biology and Chemistry**, v. 18, n. 4, p. 241-255, 2008.
- 65 TSUJITA, M. et al. The nitric oxide-sensitive p21Ras-ERK pathway mediates S-nitrosoglutathione-induced apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 369, n. 4, p. 1001-1006, 2008
- 66 KELLEHER, Z. et al. NOS2 regulation of NF-kappa B by S-nitrosylation of p65. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 42, p. 30667-30672, 2007.
- 67 MARSHALL, H.; STAMLER, J. Inhibition of NF-kappa B by S-nitrosylation. **Biochemistry**, v. 40, n. 6, p. 1688-1693, 2001.
- 68 CONTESTABILE, A. Regulation of transcription factors by nitric oxide in neurons and in neural-derived tumor cells. **Progress in Neurobiology**, v. 84, n. 4, p. 317-328, 2008.
- 69 LI, F. et al. Regulation of HIF-1 alpha stability through S-nitrosylation. **Molecular Cell**, v. 26, n. 1, p. 63-74, 2007.
- 70 MANNICK, J. Regulation of apoptosis by protein S-nitrosylation. **Amino Acids**, v. 32, n. 4, p. 523-526, 2007.
- 71 HUANG, B.; CHEN, S.; WANG, D. Shear flow increases S-nitrosylation of proteins in endothelial cells. **Cardiovascular Research**, v. 83, n. 3, p. 536-546, 2009.
- 72 LIU, L. et al. A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. **Nature**, v. 410, n. 6827, p. 490-494, 2001.
- 73 NIKITOVIC, D.; HOLMGREN, A. S-nitrosoglutathione is cleaved by the thioredoxin system with liberation of glutathione and redox regulating nitric oxide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 32, p. 19180-19185, 1996.
- 74 ZHANG, Y.; HOGG, N. The mechanism of transmembrane S-nitrosothiol transport. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 21, p. 7891-7896, 2004.
- 75 SUN, J. et al. Nitric oxide, NOC-12, and S-nitrosoglutathione modulate the skeletal muscle calcium release channel/ryanodine receptor by different

- mechanisms - An allosteric function for O<sub>2</sub> in S-nitrosylation of the channel. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 10, p. 8184-8189, 2003.
- 76 ZHANG, Y.; HOGG, N. Formation and stability of S-nitrosothiols in RAW 264.7 cells. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 287, n. 3, p. p.467-474, 2004.
- 77 KORNBURG, M. et al. GAPDH mediates nitrosylation of nuclear proteins. **Nature Cell Biology**, v. 12, n. 11, p. 1094-1100, 2010.
- 78 BENJAMIN, N. et al. STOMACH NO SYNTHESIS. **Nature**, v. 368, n. 6471, p. 502-502, 1994.
- 79 MCKNIGHT, G. et al. Chemical synthesis of nitric oxide in the stomach from dietary nitrate in humans. **Gut**, v. 40, n. 2, p. 211-214, 1997.
- 80 PINHEIRO, L. C. et al. Gastric S-nitrosothiol formation drives the antihypertensive effects of oral sodium nitrite and nitrate in a rat model of renovascular hypertension. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 87, p. 252-62, 2015.
- 81 TOLEDO, J. et al. Nitric Oxide-induced Conversion of Cellular Chelatable Iron into Macromolecule-bound Paramagnetic Dinitrosyliron Complexes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 43, p. 28926-28933, 2008.
- 82 SENGUPTA, R. et al. Thioredoxin catalyzes the denitrosation of low-molecular mass and protein S-nitrosothiols. **Biochemistry**, v. 46, n. 28, p. 8472-8483, 2007.
- 83 BEIGI, F. et al. Dynamic denitrosylation via S-nitrosoglutathione reductase regulates cardiovascular function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 11, p. 4314-4319, 2012.
- 84 WINTERBOURN, C. The challenges of using fluorescent probes to detect and quantify specific reactive oxygen species in living cells. **Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1840, n. 2, p. 730-738, 2014.
- 85 KOJIMA, H. et al. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 13, p. 2446-53, 1998.

- 86 ESPEY, M. G. et al. Focusing of nitric oxide mediated nitrosation and oxidative nitrosylation as a consequence of reaction with superoxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 17, p. 11127-11132, 2002.
- 87 \_\_\_\_\_. Distinction between nitrosating mechanisms within human cells and aqueous solution. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 32, p. 30085-30091, 2001.
- 88 NAMIN, S. et al. Kinetic analysis of DAF-FM activation by NO: Toward calibration of a NO-sensitive fluorescent dye. **Nitric Oxide-Biology and Chemistry**, v. 28, p. 39-46, 2013.
- 89 PONKA, P. et al. A study of intracellular iron metabolism using pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and other synthetic chelating agents. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 586, n. 2, p. 278-97, 1979.
- 90 LI, Q.; LANCASTER, J. Calibration of nitric oxide flux generation from diazeniumdiolate (NO)-N-center dot donors. **Nitric Oxide-Biology and Chemistry**, v. 21, n. 1, p. 69-75, 2009.
- 91 COMPTON, S. J.; JONES, C. G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. **Analytical Biochemistry**, v. 151, n. 2, p. 369-74, 1985.
- 92 JOURD'HEUIL, D. Increased nitric oxide-dependent nitrosylation of 4,5-diaminofluorescein by oxidants: implications for the measurement of intracellular nitric oxide. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 5, p. 676-84, 2002.
- 93 RODRIGUEZ, J. et al. Performance of diamino fluorophores for the localization of sources and targets of nitric oxide. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 38, n. 3, p. 356-368, 2005.
- 94 JOURD'HEUIL, D. Increased nitric oxide-dependent nitrosylation of 4,5-diaminofluorescein by oxidants: Implications for the measurement of intracellular nitric oxide. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 5, p. 676-684, 2002.
- 95 WARDMAN, P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: Progress, pitfalls, and prospects. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 7, p. 995-1022, 2007.

- 96 GARDNER, P. R. et al. Dioxygen-dependent metabolism of nitric oxide in mammalian cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 2, p. 191-204, 2001.
- 97 GUNTHER, M.; STURGEON, B.; MASON, R. Nitric oxide trapping of the tyrosyl radical-chemistry and biochemistry. **Toxicology**, v. 177, n. 1, p. 1-9, 2002.
- 98 GANT, T. et al. Redox cycling and sulphhydryl arylation - Their relative importance in the mechanism of quinone cyto-toxicity to isolated hepatocytes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 65, n. 2, p. 157-173, 1988
- 99 SHI, M. et al. Quinone-induced oxidative stress elevates glutathione and induces gamma-glutamylcysteine synthetase-activity in rat lung epithelial L2 cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 42, p. 26512-26517, 21 1994.
- 100 KOPPENOL, W. H. The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 25, n. 4-5, p. 385-91, 1998.
- 101 MIRIYALA, S. et al. Manganese superoxide dismutase, MnSOD and its mimics. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 5, p. 794-814, 2012.
- 102 RABBANI, Z. et al. Antiangiogenic action of redox-modulating Mn(III) meso-tetrakis(N-ethylpyridinium-2-yl) porphyrin, MnTE-2-PyP5+, via suppression of oxidative stress in a mouse model of breast tumor. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 7, p. 992-1004, 2009.
- 103 BATINIC-HABERLE, I. et al. Diverse functions of cationic Mn(III) N-substituted pyridylporphyrins, recognized as SOD mimics. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 5, p. 1035-1053, 2011.
- 104 \_\_\_\_\_. Pure MnTBAP selectively scavenges peroxynitrite over superoxide: Comparison of pure and commercial MnTBAP samples to MnTE-2-PyP in two models of oxidative stress injury, an SOD-specific Escherichia coli model and carrageenan-induced pleurisy. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, n. 2, p. 192-201, 2009.
- 105 REBOUCAS, J.; SPASOJEVIC, I.; BATINIC-HABERLE, I. Pure manganese(III) 5,10,15,20-tetrakis(4-benzoic acid)porphyrin (MnTBAP) is not

a superoxide dismutase mimic in aqueous systems: a case of structure-activity relationship as a watchdog mechanism in experimental therapeutics and biology. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 13, n. 2, p. 289-302, 2008.

- 106 FERRER-SUETA, G. et al. Reduction of manganese porphyrins by flavoenzymes and submitochondrial particles: A catalytic cycle for the reduction of peroxynitrite. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 41, n. 3, p. 503-512, 2006 .
- 107 MASUMOTO, K. et al. Kinetic study of the reaction of ebselen with peroxynitrite. **Febs Letters**, v. 398, n. 2-3, p. 179-182, 1996.
- 108 MASUMOTO, H.; SIES, H. The reaction of ebselen with peroxynitrite. **Chemical Research in Toxicology**, v. 9, n. 1, p. 262-267, 1996.
- 109 DAIBER, A. et al. Ebselen as a peroxynitrite scavenger in vitro and ex vivo. **Biochemical Pharmacology**, v. 59, n. 2, p. 153-160, 2000.
- 110 LYMAR, S.; HURST, J. Rapir reaction between peroxynitrite ion and carbon-dioxide - Implications for biological activity **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 34, p. 8867-8868, 1995.
- 111 AUGUSTO, O. et al. Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: Two emerging radicals in biology. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, n. 9, p. 841-859, 2002 .
- 112 BONINI, M. et al. Direct EPR detection of the carbonate radical anion produced from peroxynitrite and carbon dioxide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 16, p. 10802-10806, 1999.
- 113 MEDINAS, D. et al. The carbonate radical and related oxidants derived from bicarbonate buffer. **Iubmb Life**, v. 59, n. 4-5, p. 255-262, 2007.
- 114 BONINI, M. G. et al. Production of the carbonate radical anion during xanthine oxidase turnover in the presence of bicarbonate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 50, p. 51836-43, 2004.
- 115 HODGSON, E.; FRIDOVICH, I. Mechanism of activity-dependent luminescence of xanthine-oxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 172, n. 1, p. 202-205, 1976.

- 116 GOLDSTEIN, S.; CZAPSKI, G. Direct and indirect oxidations by peroxynitrite. **Inorganic Chemistry**, v. 34, n. 16, p. 4041-4048, 1995.
- 117 \_\_\_\_\_. Indirect oxidation of ferrocyanide by peroxynitrite - Evidence against the formation of hydroxyl radicals. **Nitric Oxide-Biology and Chemistry**, v. 1, n. 5, p. 417-422, 1997.
- 118 SIGNORELLI, S. et al. Nitrogen dioxide solubility and permeation in lipid membranes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 512, n. 2, p. 190-6, 2011.
- 119 SQUADRITO, G. L.; POSTLETHWAIT, E. M. On the hydrophobicity of nitrogen dioxide: could there be a "lens" effect for NO(2) reaction kinetics? **Nitric Oxide**, v. 21, n. 2, p. 104-9, 2009.
- 120 BARTESAGHI, S. et al. Mechanistic studies of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration in membranes using the hydrophobic probe N-t-BOC-L-tyrosine tert-butyl ester. **Biochemistry**, v. 45, n. 22, p. 6813-25, 2006.
- 121 DREW, R.; MINERS, J. O. The effects of buthionine sulphoximine (BSO) on glutathione depletion and xenobiotic biotransformation. **Biochemical Pharmacology**, v. 33, n. 19, p. 2989-94, 1984.
- 122 FUJIHARA, M. et al. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 100, n. 2, p. 171-94, 2003.
- 123 LIU, X. et al. Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erythrocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 30, p. 18709-18713, 1998.
- 124 AUGUSTO, O. et al. Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: Two emerging radicals in biology. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, n. 9, p. 841-859, 2002.
- 125 FOSTER, M. W. et al. A genetic analysis of nitrosative stress. **Biochemistry**, v. 48, n. 4, p. 792-799, 2009.
- 126 ZIELONKA, J. et al. Peroxynitrite is the major species formed from different flux ratios of co-generated nitric oxide and superoxide: direct reaction with boronate-based fluorescent probe. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 19, p. 14210-6, 2010.

- 127 \_\_\_\_\_ . Boronate probes as diagnostic tools for real time monitoring of peroxynitrite and hydroperoxides. **Chemical Research in Toxicology**, v. 25, n. 9, p. 1793-9, 2012.
- 128 \_\_\_\_\_ . Global Profiling of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Biological Systems HIGH-THROUGHPUT REAL-TIME ANALYSES. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 5, p. 2984-2995, 2012.
- 129 CORTESE-KROTT, M. M. et al. A multilevel analytical approach for detection and visualization of intracellular NO production and nitrosation events using diaminofluoresceins. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, n. 11, p. 2146-58, 2012.
- 130 JOURD'HEUIL, D. et al. The bell-shaped curve for peroxynitrite-mediated oxidation and nitration of NO/O<sub>2</sub>-\* is alive and well. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 35, p. 1e15; author reply 1e16, 2010.
- 131 EPSZTEJN, S. et al. Fluorescence analysis of the labile iron pool of mammalian cells. **Analytical Biochemistry**, v. 248, n. 1, p. 31-40, 1997.
- 132 KONIJN, A. M. et al. The cellular labile iron pool and intracellular ferritin in K562 cells. **Blood**, v. 94, n. 6, p. 2128-34, 1999.
- 133 PETRAT, F.; RAUEN, U.; DE GROOT, H. Determination of the chelatable iron pool of isolated rat hepatocytes by digital fluorescence microscopy using the fluorescent probe, phen green SK. **Hepatology**, v. 29, n. 4, p. 1171-9, 1999.
- 134 ROUAULT, T. A. The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. **Nature Chemical Biology**, v. 2, n. 8, p. 406-14, 2006.
- 135 KAKHLON, O.; CABANTCHIK, Z. I. The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes(1). **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 8, p. 1037-46, 2002.
- 136 BOSWORTH, C. A. et al. Dinitrosyliron complexes and the mechanism(s) of cellular protein nitrosothiol formation from nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 12, p. 4671-4676, 2009.
- 137 HICKOK, J. R. et al. Dinitrosyliron complexes are the most abundant nitric oxide-derived cellular adduct: biological parameters of assembly and



- disappearance. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 8, p. 1558-1566, 2011.
- 138 LEWANDOWSKA, H. et al. Crucial role of lysosomal iron in the formation of dinitrosyl iron complexes in vivo. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 12, n. 3, p. 345-52, 2007.
- 139 MECZYNSKA, S. et al. Variable inhibitory effects on the formation of dinitrosyl iron complexes by deferoxamine and salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone in K562 cells. **Hemoglobin**, v. 32, n. 1-2, p. 157-63, 2008.
- 140 TOLEDO, J. C. et al. Nitric Oxide-induced Conversion of Cellular Chelatable Iron into Macromolecule-bound Paramagnetic Dinitrosyliron Complexes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 43, p. 28926-28933, 2008.
- 141 VANIN, A. F. Dinitrosyl iron complexes with thiolate ligands: Physico-chemistry, biochemistry and physiology. **Nitric Oxide-Biology and Chemistry**, v. 21, n. 1, p. 1-13, 2009.
- 142 WATTS, R. N. et al. Nitrogen monoxide (NO)-mediated iron release from cells is linked to NO-induced glutathione efflux via multidrug resistance-associated protein 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 20, p. 7670-7675, 2006.
- 143 NAMIN, S. M. et al. Kinetic analysis of DAF-FM activation by NO: Toward calibration of a NO-sensitive fluorescent dye. **Nitric Oxide**, v. 28, p. 39-46, 2013.
- 144 ALI, A. A. et al. The contribution of N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> to the cytotoxicity of the nitric donor drug DETA/NO; an emerging role for S-nitrosylation. **Bioscience Reports**, 2013.
- 145 JOURD'HEUIL, D.; JOURD'HEUIL, F. L.; FEELISCH, M. Oxidation and nitrosation of thiols at low micromolar exposure to nitric oxide. Evidence for a free radical mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 18, p. 15720-6, 2003.
- 146 KRUSZEWSKI, M.; IWANENKO, T. Labile iron pool correlates with iron content in the nucleus and the formation of oxidative DNA damage in mouse lymphoma L5178Y cell lines. **Acta Biochimica Polonica**, v. 50, n. 1, p. 211-215, 2003.

- 147 KOSKENKORVA-FRANK, T. et al. The complex interplay of iron metabolism, reactive oxygen species, and reactive nitrogen species: Insights into the potential of various iron therapies to induce oxidative and nitrosative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 1174-1194, 2013.
- 148 CRAGG, L. et al. The iron chelator L1 potentiates oxidative DNA damage in iron-loaded liver cells. **Blood**, v. 92, n. 2, p. 632-638, 1998.
- 149 KRUSZEWSKI, M. The role of labile iron pool in cardiovascular diseases. **Acta Biochimica Polonica**, v. 51, n. 2, p. 471-480, 2004.
- 150 MENEGHINI, R. Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 23, n. 5, p. 783-792, 1997.
- 151 SIMUNEK, T. et al. SIH - a novel lipophilic iron chelator - protects H9c2 cardiomyoblasts from oxidative stress-induced mitochondrial injury and cell death. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 39, n. 2, p. 345-354, 2005.
- 152 HOOPER, D. et al. Uric acid, a natural scavenger of peroxynitrite, in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 2, p. 675-680, 1998.
- 153 ZHAO, H. et al. Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. **Free Radic Biol Med**, v. 34, n. 11, p. 1359-68, 2003.
- 154 MILLER, F. et al. Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. **Circulation Research**, v. 82, n. 12, p. 1298-1305, 1998.
- 155 KAWASE, M. et al. Exacerbation of delayed cell injury after transient global ischemia in mutant mice with CuZn superoxide dismutase deficiency. **Stroke**, v. 30, n. 9, p. 1962-8, 1999.
- 156 KIM, G. et al. Manganese superoxide dismutase deficiency exacerbates cerebral infarction after focal cerebral ischemia/reperfusion in mice - Implications for the production and role of superoxide radicals. **Stroke**, v. 33, n. 3, p. 809-815, 2002.

- 157 ZHAO, H. et al. Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 16, p. 5727-5732, 2005.
- 158 FURTMULLER, P. et al. Peroxynitrite efficiently mediates the interconversion of redox intermediates of myeloperoxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 337, n. 3, p. 944-954, 2005.
- 159 CROW, J. Peroxynitrite scavenging by metalloporphyrins and thiolates. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, n. 10, p. 1487-1494, 2000.
- 160 HEROLD, S.; KOPPENOL, W. Peroxynitritometal complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 249, n. 3-4, p. 499-506, 2005.
- 161 LEE, J.; HUNT, J.; GROVES, J. Mechanisms of iron porphyrin reactions with peroxynitrite. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 30, p. 7493-7501, 1998..
- 162 SIKORA, A. et al. Direct oxidation of boronates by peroxynitrite: Mechanism and implications in fluorescence imaging of peroxynitrite. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 10, p. 1401-1407, 2009.
- 163 \_\_\_\_\_. Reaction between Peroxynitrite and Boronates: EPR Spin-Trapping, HPLC Analyses, and Quantum Mechanical Study of the Free Radical Pathway. **Chemical Research in Toxicology**, v. 24, n. 5, p. 687-697, 2011.
- 164 THOMSON, L. et al. Kinetics of cytochrome C(2+) oxidation by peroxynitrite - Implications for superoxide measurements in nitric oxide - producing biological - systems. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 319, n. 2, p. 491-497, 1995.
- 165 KAKHLON, O.; CABANTCHIK, Z. The labile iron pool: Characterization, measurement, and participation in cellular processes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 8, p. 1037-1046, 2002.
- 166 MATTHEWS, A. et al. Iron and atherosclerosis: Inhibition by the iron chelator deferiprone (L1). **Journal of Surgical Research**, v. 73, n. 1, p. 35-40, 1997.
- 167 EXNER, M.; HEROLD, S. Kinetic and mechanistic studies of the peroxynitrite-mediated oxidation of oxymyoglobin and oxyhemoglobin. **Chemical Research in Toxicology**, v. 13, n. 4, p. 287-293, 2000.

- 168 KALINGA, S. Interaction of peroxynitrite with myoglobin and hemoglobin. **Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie**, v. 84, n. 5, p. 788-793, 2006.
- 169 SERGENT, O. et al. Effect of nitric oxide on iron-mediated oxidative stress in primary rat hepatocyte culture. **Hepatology**, v. 25, n. 1, p. 122-127, 1997.
- 170 FRITSCHE, G. et al. Regulatory interactions between iron and nitric oxide metabolism for immune defense against Plasmodium falciparum infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 183, n. 9, p. 1388-1394, 2001.
- 171 FERRER-SUETA, G. et al. Reactions of manganese porphyrins and manganese-superoxide dismutase with peroxynitrite. **Superoxide Dismutase**, v. 349, p. 23-37, 2002.
- 172 BALAVOINE, G.; GELETII, Y.; BEJAN, D. Catalysis of peroxynitrite reactions by manganese and iron porphyrins. **Nitric Oxide-Biology and Chemistry**, v. 1, n. 6, p. 507-521, 1997.
- 173 SHIMANOVICH, R.; GROVES, J. Mechanisms of peroxynitrite decomposition catalyzed by FeTMPS, a bioactive sulfonated iron porphyrin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 387, n. 2, p. 307-317, 2001.
- 174 ISCHIROPOULOS, H. et al. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide-dismutase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 298, n. 2, p. 431-437, 1992.
- 175 CAMPOLO, N.; BARTESAGHI, S.; RADI, R. Metal-catalyzed protein tyrosine nitration in biological systems. **Redox Report**, v. 19, n. 6, p. 221-231, 2014.
- 176 DEMICHELI, V. et al. Inactivation and nitration of human superoxide dismutase (SOD) by fluxes of nitric oxide and superoxide. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, n. 9, p. 1359-1368, 2007.
- 177 SZABO, C.; ISCHIROPOULOS, H.; RADI, R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 8, p. 662-680, 2007.
- 178 RABKIN, S.; KLASSEN, S. Metalloporphyrins as a therapeutic drug class against peroxynitrite in cardiovascular diseases involving ischemic reperfusion injury. **European Journal of Pharmacology**, v. 586, n. 1-3, p. 1-8, 2008.

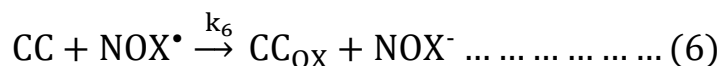
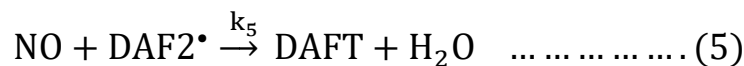
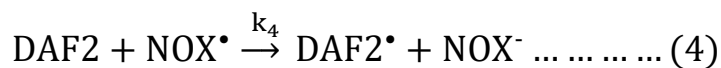
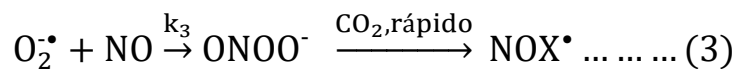
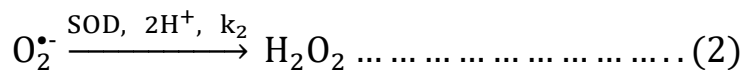
- 179 CARBALLAL, S.; BARTESAGHI, S.; RADI, R. Kinetic and mechanistic considerations to assess the biological fate of peroxynitrite. **Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1840, n. 2, p. 768-780, 2014 2014.
- 180 KACHADOURIAN, R. et al. Flavin-dependent antioxidant properties of a new series of meso-N,N'-dialkyl-imidazolium substituted manganese(III) porphyrins. **Biochemical Pharmacology**, v. 67, n. 1, p. 77-85, 2004.
- 181 LI, Q. et al. Nitrosothiol formation and protection against Fenton chemistry by nitric oxide-induced dinitrosyliron complex formation from anoxia-initiated cellular chelatable iron increase. **Journal of Biological Chemistr**, v. 289, n. 29, p. 19917-27, 2014.

## **Apêndice**

## Cinética de formação de DAFT

A análise cinética para dedução da equação de velocidade de formação de DAFT parte de um conjunto de considerações mostradas abaixo.

- 1) Superóxido é continuamente produzido pelas células.
  - 2) Em nosso modelo experimental, o consumo de superóxido ocorre por duas vias distintas, através da dismutação promovida por SODs e através da reação com  $\bullet\text{NO}$ .
  - 3) As espécies radicalares produzidas a partir da reação entre  $\bullet\text{NO}$  e  $\text{O}_2^{\bullet-}$  chamadas coletivamente de  $\text{NOX}^{\bullet}$  oxidam DAF2 produzindo a espécie DAF $^{\bullet}$ .
  - 4) Componentes presentes nas células, coletivamente chamados de CC podem reagir com espécies reativas ( $\text{NOX}^{\bullet}$ ).
  - 5) Apenas o principal mecanismo nitrosativo foi considerado.
- Estas reações estão resumidas no quadro abaixo



De acordo com o esquema 1 a taxa de formação de DAFT deve ser dada por:

$$\frac{d[\text{DAFT}]}{dt} = k_5[\text{DAF2}^\bullet][\text{NO}] \quad (7)$$

Para que seja possível resolver a equação 6 devemos assumir a condição de estado estacionário para  $[\text{DAF2}^\bullet]$ . Essa aproximação é razoável considerando que o intermediário  $[\text{DAF2}^\bullet]$  provavelmente não se acumula quando comparada com outros reagentes e que, portanto, não deve consumir  $\bullet\text{NO}$  em quantidade suficiente para alterar o estado estacionário. Coerentemente, a taxa de formação de DAFT torna-se linear logo após a adição de  $\text{sp}^\bullet/\text{NO}$  (Figura 5A) e assim permanece até o fim do experimento. Portanto podemos assumir que:

$$\frac{d[\text{DAF}^\bullet]}{dt} = k_4[\text{DAF2}][\text{NOX}^\bullet] - k_5[\text{DAF2}^\bullet][\text{NO}] = 0 \quad (8)$$

Rearranjando para  $[\text{DAF2}^\bullet]$  temos:

$$[\text{DAF2}^\bullet] = k_4[\text{DAF2}][\text{NOX}^\bullet]/k_5[\text{NO}] \quad (9)$$

onde  $\text{NOX}^\bullet$  representa espécies oxidantes derivadas da decomposição de peroxinitrito ( $\text{NO}_2^\bullet$  e  $\text{CO}_3^{\bullet-}$ ). No esquema 1 a equação de formação de  $\text{NOX}^\bullet$  é a combinação das equações simplificada em (3). No estado estacionário podemos escrever que:

$$\frac{d[\text{NOX}^\bullet]}{dt} = k_3[\text{NO}][\text{O}_2^\bullet] - k_4[\text{DAF2}][\text{NOX}^\bullet] - k_6[\text{CC}][\text{NOX}^\bullet] = 0 \quad (10)$$

Rearranjando para  $[\text{NOX}^\bullet]$ :

$$[\text{NOX}^\bullet] = \frac{k_3[\text{NO}][\text{O}_2^\bullet]}{k_4[\text{DAF2}] + k_6[\text{CC}]} \quad (11)$$

Substituindo a equação (11) na equação (9) temos:



$$[\text{DAF2} \cdot] = \frac{k_3 k_4 [\text{DAF2}] [\text{NO}] [\text{O}_2^{\cdot-}]}{k_5 [\text{NO}] (k_4 [\text{DAF2}] + k_6 [\text{CC}])} \quad (12)$$

A equação 12 pode ser simplificada se assumirmos que  $k_6[\text{CC}] \gg k_4[\text{DAF}]$ . Isto é razoável já que as constantes de velocidade de oxidação de DAF2 ou componentes celulares devem ser ambas elevadas e praticamente da mesma magnitude. Por outro lado, é razoável supor que  $[\text{CC}] \gg [\text{DAF}]$ , desde que  $[\text{CC}]$  corresponde à soma de todos os componentes celulares que podem reagir com  $[\text{NOX}^{\cdot}]$ . A partir destas considerações obtemos:

$$[\text{DAF2} \cdot] = \frac{k_3 k_4 [\text{DAF2}] [\text{O}_2^{\cdot-}]}{k_5 k_6 [\text{CC}]} \quad (13)$$

Finalmente, substituindo a equação para  $[\text{DAF2}^{\cdot}]$  em (7):

$$\frac{d[\text{DAFT}]}{dt} = \frac{k_3 k_4 [\text{DAF2}] [\text{NO}] [\text{O}_2^{\cdot-}]}{k_6 [\text{CC}]} \quad (14)$$

Neste ponto, podemos fazer a consideração que  $[\text{CC}]$  está em grande excesso a  $[\text{NOX}^{\cdot}]$  acumulado, portanto sua concentração deve ser constante durante todo o processo de formação de DAFT. Com isso, a equação 14 colapsa para:

$$\frac{d[\text{DAFT}]}{dt} = k_{\text{obs}} [\text{DAF2}] [\text{O}_2^{\cdot-}] [\text{NO}] \quad (15)$$

$$\text{onde, } k_{\text{obs}} = \frac{k_3 k_4}{k_6 [\text{CC}]} \quad (16)$$

A equação 14 descreve bem as observações experimentais que obtivemos no nosso estudo. Ela mostra que a formação de DAFT é diretamente proporcional à concentração de NO e de superóxido e que é inversamente proporcional a qualquer espécie presente nas células  $[\text{CC}]$  que consuma  $\text{NOX}^{\cdot}$ . Por exemplo, ascorbato e glutatona reagem rapidamente com  $\text{NOX}^{\cdot}$ . E, aumento de ascorbato e diminuição de

glutathiona causaram diminuição e aumento da taxa de formação de DAFT. Além disso, a equação antecipa a existência de transição cinética de primeira ordem para zero ordem com relação a  $\bullet\text{NO}$ .

Para entender esta antecipação, precisamos avaliar como dever variar a concentração de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  no estado estacionário com o aumento da concentração de NO. Superóxido é continuamente produzido pelas células, (reação 1, esquema 1) e é consumida principalmente pela ação de SOD, equação (2). A dismutação contínua promovida por SOD faz com que os níveis de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  intracelular permaneça constantemente baixos, possivelmente menores que a concentração mais baixa de NO empregada nos ensaios. O estado estacionário para  $\text{O}_2^{\bullet-}$  é dado por:

$$\frac{d[\text{O}_2^{\bullet-}]}{dt} = k_1 - k_2 [\text{O}_2^{\bullet-}][\text{SOD}] - k_3 [\text{O}_2^{\bullet-}][\text{NO}] = 0 \quad (17)$$

Resolvendo para  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , temos:

$$[\text{O}_2^{\bullet-}] = \frac{k_1}{k_2[\text{SOD}] + k_3[\text{NO}]} \quad (18)$$

onde  $k_1$  representa a velocidade para a produção de superóxido em  $\text{Ms}^{-1}$ ,  $k_2$  representa a constante de velocidade de dismutação de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  catalisada por SOD e  $k_3$  a constante de velocidade para recombinação entre  $\bullet\text{NO}$  e  $\text{O}_2^{\bullet-}$ .

Quando a concentração de  $\bullet\text{NO}$  é baixa, SOD deve consumir quase todo  $\text{O}_2^{\bullet-}$  produzido pelas células, assim, é razoável presumirmos que  $k_2[\text{SOD}] \gg k_3[\text{NO}]$ , com isso a concentração de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  passa a ser:

$$[\text{O}_2^{\bullet-}] = \frac{k_1}{k_2[\text{SOD}]} \quad (19)$$

Aplicando a equação 19 na equação 16 e tomando  $[\text{SOD}]$  como uma constante, obtemos:

$$\frac{d[\text{DAFT}]}{dt} = \frac{k'_{\text{obs}}[\text{DAF}][\text{NO}]}{[\text{SOD}]} \quad (20)$$

$$\text{com } k'_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{obs}}k_1}{k_2} \quad (21)$$

A equação 20 é de primeira ordem com relação a  $\bullet\text{NO}$  para baixas concentrações de  $\bullet\text{NO}$ , justamente como observado experimentalmente (fase de primeira ordem da figura 6B) na medida em que SOD sofre progressiva competição com  $\bullet\text{NO}$  com o aumento da concentração de  $\bullet\text{NO}$ . Também mostra que é inversamente proporcional a concentração de SOD, como observado experimentalmente em experimentos usando PEG-SOD.

No outro extremo da situação, isto é, para concentrações de  $\bullet\text{NO}$  suficientemente elevadas para que todo superóxido produzido reaja com  $\bullet\text{NO}$ , podemos assumir que  $k_3[\text{NO}] \gg k_2[\text{SOD}]$ , e a concentração de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  torna-se:

$$[\text{O}_2^{\bullet-}] = \frac{k_1}{k_3[\text{NO}]} \quad (22)$$

Aplicando 21 em 15 obtemos:

$$\frac{d[\text{DAFT}]}{dt} = k''_{\text{obs}}[\text{DAF}^2] \quad (23)$$

$$k''_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{obs}}k_1}{k_3} \quad (24)$$

A equação 22 é de ordem zero com relação a  $[\text{NO}]$ . Isto é, a equação prevê que a taxa de formação de DAFT será independente da concentração de  $\bullet\text{NO}$  (ordem zero relativo a  $\bullet\text{NO}$ ) para concentrações de  $\bullet\text{NO}$  mais elevadas, justamente como foi observado experimentalmente. Finalmente, para ambos os casos a velocidade de formação de DAFT é proporcional a concentração de DAF2 segundo a equação e isto também foi observado experimentalmente. Embora, não seja

evidência concreta e irrefutável com relação ao mecanismo, esta análise cinética suporta os mecanismos propostos.

A construção deste modelo cinético possui um conjunto de considerações que foram omitidas, mas que consideramos ser bem razoáveis: i) peroxinitrito reage rapidamente com muitos alvos celulares, porém, considerando que estes alvos estejam em concentrações relativamente altas relativo a peroxinitrito e NOX e que suas concentrações não variem entre experimentos, como é de se supor devido a homeostase celular, a proporção de NOX produzida via peroxinitrito também não deve se alterar significativamente; ii) Esta argumentação também valida a suposição de que a decomposição de peroxinitrito em seus radicais (NOX•) seja tratado como um processo rápido (vide (3), esquema 1); iii) a formação de DAFT partir de DAF2• e •NO foi tratada com uma etapa elementar. Embora esta reação seja mais complexa, envolvendo recombinação e condensação, a simplificação não prejudica a análise cinética de estado estacionário.