

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

GÉRSIKA BITENCOURT SANTOS

**INIBIÇÃO DA ATIVIDADE CATALÍTICA DA PROTEÍNA DISSULFETO
ISOMERASE POR TEMPOL**

Alfenas/MG
2011

GÉRSIKA BITENCOURT SANTOS

**INIBIÇÃO DA ATIVIDADE CATALÍTICA DA PROTEÍNA DISSULFETO
ISOMERASE POR TEMPOL**

Dissertação apresentada ao programa do curso de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Obtenção de insumos farmacêuticos e avaliação da atividade biológica

Orientador: Prof^a. Dr^a. Máisa Ribeiro Pereira Lima
Brigagão

Alfenas/MG
2011

GÉRSIKA BITENCOURT SANTOS

**INIBIÇÃO DA ATIVIDADE CATALÍTICA DA PROTEÍNA DISSULFETO
ISOMERASE POR TEMPOL**

A Banca examinadora, abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Obtenção de insumos farmacêuticos e avaliação da atividade biológica.

Aprovada em 07 de fevereiro de 2011.

Prof^o. Dr. Pio Colepicolo Neto

Instituição Universidade de São Paulo – IQ-USP **Assinatura:** _____

Prof^a. Dr^a. Lira Celeste Alves

Instituição Universidade Federal de Alfenas **Assinatura:** _____

Prof^a. Dr^a. Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão

Instituição Universidade Federal de Alfenas **Assinatura:** _____

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

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Alfenas - MG, pela oportunidade de realização dessa dissertação.

À Prof^a. Dr^a. Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão pela orientação, dedicação e confiança para a realização desse trabalho.

Aos companheiros do Laboratório de Bioquímica Básica que colaboraram para a execução deste trabalho. Agradeço imensamente ao Samuel e Ana Carolina que se tornaram não apenas colegas de laboratório, mas grandes amigos.

Aos amigos e colegas de Mestrado, que nestes dois anos sempre acrescentaram em minha formação e vida, principalmente a Lidi, Flávia e Talita, eterna gratidão a todos.

Aos Funcionários da Unifal-MG, em especial, aos Funcionários do Laboratório de Bioquímica Básica, Gabriel, Val, Marta e Rose pela colaboração e ajuda prestada diariamente.

Ao Laboratório de Bioquímica Clínica, Fernanda, Eliane, Giulia e Rita pelos auxílios durante a realização de experimentos.

Ao Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto, Prof^a. Dr^a. Ohara Augusto e Dr^a. Edlaine Linares, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP), que gentilmente cederam seus laboratórios para a execução de alguns experimentos.

À CAPES, CNPq-Redoxoma; Unifal-MG, pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que de alguma maneira colaboraram para a execução deste trabalho.

RESUMO

Espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (ERO/ERN) produzidas por neutrófilos através do complexo NADPH oxidase (Nox2) estão diretamente associadas às ações deletérias surgidas quando a inflamação escapa do controle da homeostase. A ativação da NADPH oxidase de neutrófilos requer o acoplamento das subunidades citosólicas aos componentes de grânulos e translocação do complexo à membrana do fagossoma. A PDI (Proteína Dissulfeto Isomerase, EC 5.3.4.1) é uma chaperona envolvida no tráfego proteico celular, sendo encontrada na superfície de diversas células procarióticas e eucarióticas. Trabalhos prévios sugeriram que PDI pode ser um dos componentes responsáveis pela montagem de Nox2, facilitando o enovelamento correto das subunidades do complexo e/ou auxiliando o trânsito das subunidades até à membrana do fagossoma. Neste trabalho foi testada a atividade de Nox2 de neutrófilos inflamatórios correlacionada à atividade redutase de PDI de membrana e o efeito do nitróxido 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxil (Tempol) sobre esses processos. Neutrófilos dormentes apresentaram baixa atividade de PDI e não foi detectado consumo de oxigênio associado ao sistema Nox2, conforme ensaios realizados com uso de um pseudo-substrato para PDI e monitoramento com eletrodo de Clark, respectivamente. Sob estímulo de forbol (PMA), os fagócitos consumiram quantidade significativa de oxigênio (6.5 ± 0.58 nmol.min⁻¹) e apresentaram alta atividade de PDI, cerca de quatro vezes maior que as células dormentes. Quando os fagócitos foram previamente tratados com Tempol houve decréscimo dose-dependente da atividade de Nox2 (ED₅₀: 45 µg/10⁶ neutrófilos), em correlação direta com o decréscimo da atividade de PDI. Testes com inibidores padrões de PDI (bacitracina e ácido ditionitrobenzóico- DTNB) confirmaram que a inibição de PDI determina decréscimo da atividade de Nox2, resultados obtidos através de ensaios espectrofotométricos (redução de citocromo c, 550 nm) e quimioluminescentes (sistema luminol-peroxidase). Em conjunto, os resultados apontam que, simultaneamente à atividade de Nox2 em neutrófilos estimulados, ocorre atividade redutase de PDI, confirmando que essa chaperona está diretamente associada à ativação e/ou manutenção da atividade da oxidase fagocitária. Adicionalmente, esse trabalho mostrou que o nitróxido Tempol é capaz

de modular negativamente a atividade de Nox2, cujo efeito, ao menos em parte, é decorrente da inibição de PDI, sugerindo um novo mecanismo anti-inflamatório dos nitróxidos.

Palavras-chave: Proteína dissulfeto isomerase. NADPH oxidase. Tempol.

ABSTRACT

Protein disulfide isomerase (PDI, EC 5.3.4.1) is an ubiquitously expressed enzyme that catalyses the rearrangement of disulfide bonds in target proteins. Previous studies suggest that PDI, which is a chaperone involved in protein trafficking and translocates to the cell surface, may regulate the phagocytic NADPH oxidase complex (Nox2). This study examines whether the nitroxide 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy (Tempol) inhibits the regulatory activity of PDI interconnected to Nox2 in inflammatory neutrophils. Phorbol-triggered superoxide anion release was correlated with the PDI reductase activity detected in neutrophils, as determined by oxygen consumption and cleavage of a fluorescent probe, respectively. Both events were significantly inhibited in a concentration-dependent manner when neutrophils were pre-treated with Tempol, which has an ED₅₀ of 45 μM. To substantiate that Tempol's action on PDI activity is related to Nox2 downregulation, assays with the known PDI inhibitors bacitracin and dithionitrobenzoic acid were performed to confirm their ability to decrease the neutrophil respiratory burst. This study shows that Tempol's inhibition of Nox2 activity is correlated with decreased PDI reductase activity at the neutrophil cellular membrane, suggesting a close association between the enzymes of activated phagocytes and pointing to a novel anti-inflammatory mechanism for Tempol.

Key words: Protein disulfide isomerase. NADPH oxidase. Tempol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura e ativação do complexo enzimático NADPH oxidase no fagócito.....	20
Figura 2- Produção de ERO/ERN por fagócitos.....	21
Figura 3- Organização dos domínios da PDI	23
Figura 4- Esquema ilustrativo da atividade da PDI como chaperona molecular.....	24
Figura 5- Atividade catalítica na formação e rompimento e na isomerização de pontes dissulfeto intra-moleculares catalisadas por PDI.....	25
Figura 6- Estrutura química dos nitróxidos cíclicos.....	28
Figura 7- O processo redox de metabolização de nitróxidos.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
cGMP	guanosina monofosfato cíclica
DAG	diacilglicerol
DGC	doença granulomatosa crônica
DNA	ácido desoxirribonucléico
DTNB	ácido ditionitrobenzóico
EC	classificação enzimática
ED ₅₀	dose efetiva para inibição de 50%
EPR	ressonância paramagnética eletrônica
ERO/ERN	espécie reativa de oxigênio/ espécie reativa de nitrogênio
FAD	flavina adenina dinucleotídeo
fMLP	formil-metionil-leucil-fenilalanina
Gr	glutathione redutase
GSH	glutathione reduzida
GSSG	glutathione oxidada
GST	glutathione S-transferase
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HO•	radical hidroxila
HO ₂ •	radical hidroperoxil
HOCl	ácido hipocloroso
MPO	mieloperoxidase
MRI	imagem de ressonância magnética

NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF- κ B	fator de transcrição nuclear kappa B
\cdot NO	óxido nítrico
Nox	oxidase não fagocítica
1 O ₂	oxigênio singlete
O ₂	oxigênio
O ₂ \cdot^-	ânion radical superóxido
ONOO $^-$	peroxinitrito
PAO	óxido de fenilarsina
PDI	proteína dissulfeto isomerase
PMA	forbol 12-miristato 13-acetato
PMN	polimorfonucleares
RE	retículo endoplasmático
RRP	região rica em prolina
Se-Gpx	glutathiona peroxidase
SOD	superóxido dismutase
Txr	tiorredoxina redutase

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA.....	13
1.1	INFLAMAÇÃO.....	13
1.2	PRODUÇÃO DE ERO/ERN E CONTROLE METABÓLICO DO ESTRESSE OXIDATIVO.....	16
1.3	COMPONENTES DA NADPH OXIDASE E SUA REGULAÇÃO.....	18
1.4	PROTEÍNA DISSULFETO ISOMERASE.....	22
1.4.1	Propriedades catalíticas da PDI e correlação com estados fisiológicos.....	26
1.5	NITRÓXIDOS CÍCLICOS.....	27
1.5.1	Propriedades antioxidantes e antiinflamatórias dos nitróxidos.....	30
2	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	35
3	RESULTADOS.....	36
3.1	ARTIGO.....	36
	REFERÊNCIAS.....	68
	APÊNDICE A.....	76
	APÊNDICE B.....	77

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 INFLAMAÇÃO

Conceitua-se inflamação como uma reação dos tecidos vascularizados a um agente agressor, caracterizada morfológicamente pela saída de líquidos e células do sangue para o interstício tissular. Por meio dela, o organismo localiza e elimina células, elementos estruturais alterados, microrganismos e outros agentes reconhecidamente estranhos. Embora seja um mecanismo defensivo desenvolvido ao longo de séculos de evolução, o qual envolve uma complexa rede de moléculas e células, em muitos casos pode causar danos ao organismo. Isso ocorre quando a capacidade de eliminar substâncias estranhas ou tecidos lesados fica comprometida, ou ainda quando os mecanismos de regulação fisiológica sofrem distúrbios. Nesses casos, a inflamação não traz benefícios, acarretando perda da função do órgão ou tecido (BRASILEIRO FILHO, 2004; ABBAS ; LICHTMAN, 2005; RUBIN et al. 2006).

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

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

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

Inflamação aguda é um estágio inicial de inflamação (imunidade inata), a qual é mediada através da ativação do sistema imune. Este tipo de inflamação persiste apenas por um curto tempo e é normalmente benéfico para o hospedeiro. Se a inflamação dura por um longo período de tempo, a segunda fase da inflamação, ou inflamação crônica, pode predispor o hospedeiro a várias doenças crônicas, incluindo câncer (LIN ; KARIN, 2007).

As características mais importantes da inflamação aguda incluem: acúmulo de líquidos e componentes do plasma no tecido afetado, estimulação intravascular de plaquetas e a migração de leucócitos polimorfonucleares (PMN – principalmente neutrófilos) do espaço intraluminal até o tecido extravascular. Por outro lado, os componentes celulares característicos da inflamação crônica são os linfócitos, plasmócitos e macrófagos.

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

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

Na maioria dos casos, as primeiras células a deixar os vasos são os PMN. Por isso mesmo, eles constituem as células predominantes no exsudato nas primeiras 24 horas após o início do processo. Os monócitos começam a sair dos vasos 18 a 24 horas depois de iniciada a exsudação, mas, a partir daí, se acumulam rapidamente, passando a constituir as células dominantes após 24 horas. Os PMN têm vida média muito curta após a exsudação (oito horas em média), ao passo que os macrófagos, originados dos monócitos, sobrevivem por maior intervalo de tempo. Essa é uma das razões pelas quais, nas inflamações agudas, em geral predominam

PMN, enquanto que nas crônicas, os leucócitos mais numerosos são aqueles derivados de mononucleares, linfócitos e plasmócitos (BRASILEIRO FILHO, 2004).

Os neutrófilos medem 10-20 μm de diâmetro e têm núcleo segmentado, com três a cinco lóbulos. No citoplasma, exibem dois tipos principais de grânulos (cerca de 600 por célula). Os azurófilos (ou primários), que representam 10-20% do total, são lisossomos verdadeiros e contêm mieloperoxidase, catepsina G, elastase, colagenase, muramidase, várias proteínas catiônicas microbicidas, defensinas, além de hidrolases existentes nos lisossomos das demais células. O segundo tipo, os grânulos específicos (ou secundários), contém lisozima, lactoferrina, ativador de plasminogênio, histaminase e fosfatase alcalina (BRASILEIRO FILHO, 2004; ABBAS; LICHTMAN, 2005).

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

Muitas células inflamatórias, incluindo monócitos, macrófagos tissulares, células dendríticas e neutrófilos possuem a capacidade de reconhecer, internalizar e digerir materiais estranhos, como microorganismos ou fragmentos celulares através de um processo conhecido como fagocitose (RUBIN et al. 2006).

A sequência de eventos na qual estas células fagocitárias reconhecem e eliminam estes agentes estranhos ao organismo é bem conhecida, tendo sido reportada pela primeira vez nos finais de 1800 por um cientista russo, (METCHNIKOFF, 1883, citado por BABIOR, 2000) constituindo o processo de fagocitose. Nesse processo, agentes estranhos ao organismo, após o engolfamento pela membrana plasmática dos fagócitos, com formação do fagossoma, são internalizados e destruídos.

Vários estímulos atuam cooperativamente para ativar os fagócitos e seus mecanismos destrutivos durante a fagocitose, em um processo subsequente à

ativação de receptores semelhantes ao Toll (TLR), acoplados à proteína G, específicos para região Fc de anticorpos, ou porções C3 e 5a do complemento, ou ainda, pela estimulação direta de componentes celulares por substâncias como os ésteres de forbol. Em decorrência dessas interações, dois tipos de mecanismos comuns a todos os fagócitos podem ser ativados simultaneamente. Os mecanismos não oxidativos, que constituem a fusão de lisossomos aos vacúolos fagocíticos com subsequente degranulação de proteínas, e os mecanismos oxidativos, que se caracterizam pela produção de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (ERO/ERN) (GROEMPING et al. 2003; BRASILEIRO FILHO, 2004; ABBAS; LICHTMAN, 2005).

1.2 PRODUÇÃO DE ERO/ERN E CONTROLE METABÓLICO DO ESTRESSE OXIDATIVO

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

Entre os danos mais graves ocasionados por ERO/ERN, estão aqueles causados ao DNA, envolvendo clivagem da ligação fosfodiéster, alteração de ribose e oxidação de bases. O maior gerador de ERO, a mitocôndria, é alvo de oxidação com consequências deletérias, tais como danos oxidativos no DNA da mitocôndria (CIRCU et al. 2009; RACHEK et al. 2009). O acúmulo de lesões no DNA tem consequências relacionadas à mutagênese e carcinogênese. Uma enzima que tenha seus aminoácidos alterados pode perder ou sofrer alteração de sua atividade catalítica. Ocorrendo na membrana celular, a oxidação de lipídios interfere no

transporte ativo e passivo normal através da membrana, ou ocasiona a ruptura dessa, levando à morte celular. A oxidação de lipídios no sangue agride as paredes das artérias e veias, facilitando o acúmulo desses lipídios, com conseqüente aterosclerose, podendo causar trombose, infarto ou acidente vascular cerebral (SIES, 1999; MOREL et al. 2001; NIE et al. 2001; RIBEIRO et al. 2005).

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

O organismo apresenta uma série de mecanismos endógenos e exógenos capazes de manter a concentração de ERO/ERN dentro de limites fisiológicos, os quais, quando ultrapassados seja por uma disfunção biológica ou por atuação de agentes externos, geram uma condição celular oxidativa associada a diversas patologias como, doenças inflamatórias, vasculares, neurodegenerativas, de origem auto-imune, câncer e acidentes que envolvam isquemia e reperfusão. (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BIANCHI; ANTUNES, 1999; KOJDA; HARRISON, 1999; RIBEIRO et al. 2005; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2006).

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

1.3 COMPONENTES DA NADPH OXIDASE E SUA REGULAÇÃO

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

Na inflamação, a produção de ERO/ERN inicia-se quando o fagócito recebe estímulos para o englobamento, originando uma série de alterações metabólicas coordenadas, aproximadamente 30 segundos após a estimulação. A ativação do processo de fagocitose estimula no PMN o evento referido na literatura como *burst* oxidativo ou respiratório, o qual é caracterizado pelo aumento abrupto do consumo de oxigênio, aumento da glicólise anaeróbica, mobilização de cálcio intracelular e produção de ERO/ERN (BABIOR, 2004; SEGAL, 2008). A forma reduzida de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) tem um importante papel nessa resposta por ser o doador de elétrons para o oxigênio extracelular, produzindo o radical ânion superóxido, $O_2^{\bullet-}$ (SEGAL et al. 2000).

Em células não estimuladas, o sistema Nox2 está dormente e dissociado, com componentes presentes tanto no citossol quanto na membrana de grânulos secretórios, podendo ser rapidamente ativado quando os fagócitos são expostos a estímulos adequados. A ativação do *burst* respiratório envolve profundas mudanças de localização e atividades de diferentes componentes deste complexo enzimático (BABIOR, 2004).

Esta oxidase leva os elétrons do NADPH citoplasmático, gerado pela via de hexose monofosfato, e os transfere ao oxigênio no vacúolo fagocítico para produzir $O_2^{\bullet-}$ (WIENTJES; SEGAL, 1995). Esse radical é a primeira espécie reativa formada, sendo produzido pela redução do oxigênio por um único elétron, e dando origem a outras ERO/ERN, uma vez que é capaz de agir como oxidante ou redutor (RIBEIRO et al. 2005). O sistema Nox2 compõe-se por elementos citossólicos e componentes ligados à membrana de grânulos (gp91^{PHOX}, p22^{PHOX} e rap); esses últimos constituem o citocromo b558. A codificação do cDNA destas proteínas foi elucidada

e os diferentes componentes foram clonados e sequenciados e a localização cromossômica foi identificada (HARPER; CHAPLIN; SEGAL, 1985; ROYER-POKORA et al. 1986; DINAUER et al. 1987; TEAHAN et al. 1987; PARKOS et al. 1988; LOMAX et al. 1989; VOLPP et al. 1989; YAMAGUCHI et al. 1989; DINAUER et al. 1990; LETO et al. 1990; TEAHAN et al. 1990).

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



A identificação dos componentes da oxidase foi facilitada pela disponibilidade de células de pacientes com doença granulomatosa crônica (DGC), disponibilidade de ensaios de complementação e de fusão celular (HAMERS et al. 1984).

As duas subunidades gp91^{PHOX} e p22^{PHOX} são proteínas integrais de membrana, sendo que gp91^{PHOX} contém os componentes responsáveis pela transferência de elétrons. A porção C-terminal dessa proteína está voltada para o lado citosólico da membrana e contém os sítios de ligação para FAD (Flavina Adenina Dinucleotideo) e NADPH. A porção N-terminal da proteína forma uma sequência de seis domínios em α - hélice aos quais está ancorado um par de grupos heme (LAMBETH, 2007). Os grupos heme estão orientados perpendicularmente a ambos os lados da membrana, formando um conduto à passagem dos elétrons oriundos do NADPH citosólico em direção ao O_2 extracelular ou intra-fagosômico (ISOGAI; IZUKA; SHIRO, 1995). A subunidade p22^{PHOX} apresenta na porção C-terminal uma região rica em prolina (RRP) que interage com o p47^{PHOX} fosforilado, evento indispensável à ativação do complexo enzimático (LAMBETH, 2007). O citocromo b558 desempenha uma função primordialmente regulatória e suas subunidades estão inativas na célula em estado de repouso. Em resposta a estímulos apropriados, tais como partículas opsonizadas, lipídios bioativos, peptídeos quimiotáticos ou anticorpos, o complexo formado pelas subunidades citosólicas migra do citosol para a membrana plasmática e associa-se ao citocromo

b558 (BABIOR,1999; GROEMPING ; RITTINGER, 2005; SUMIMOTO; MIYANO; TAKEYA, 2005). Uma vez montado o complexo enzimático, os dois grupos heme localizados na subunidade gp91^{PHOX} realizam a transferência de elétrons do NADPH citosólico para o oxigênio molecular, resultando na geração de O₂^{•-} (CROSS, 1999).

Reações subseqüentes no fagossoma levam à produção de uma grande variedade de ERO/ERN, de forma coordenada. A Figura 1 ilustra a ativação do complexo Nox2, destacando-se a liberação do O₂^{•-} no fagossoma.

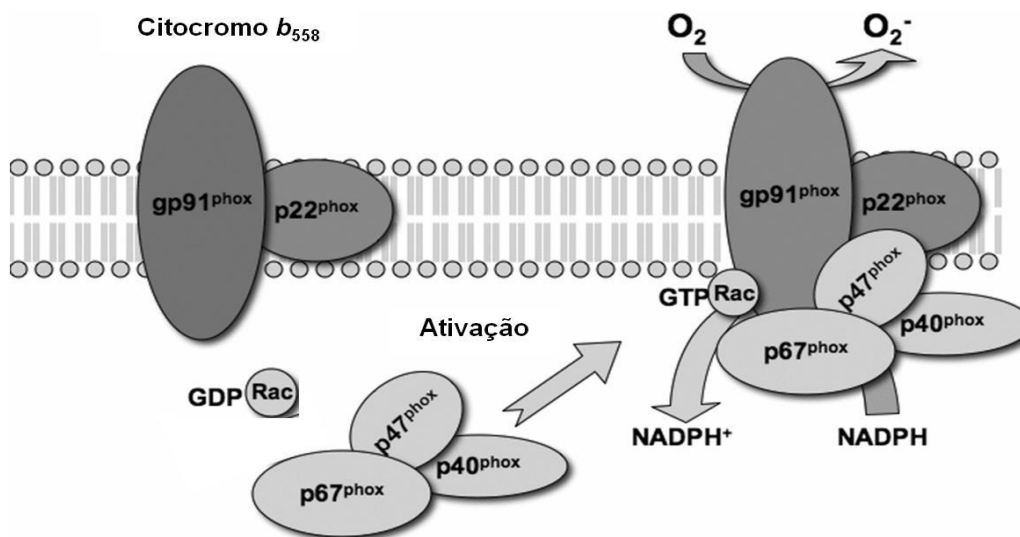


Figura 1- Estrutura e ativação do complexo enzimático NADPH oxidase no fagócito. Em neutrófilos em repouso, os componentes da NADPH oxidase estão espacialmente segregados entre citosol e membrana. Mediante estímulo, o complexo formado pelas unidades citosólicas p67^{PHOX}, p47^{PHOX}, p40^{PHOX} e Rac associa-se ao citocromo b558, possibilitando a transferência de elétrons do NADPH citosólico para o oxigênio molecular, o que resulta na geração de O₂^{•-}. Ilustração adaptada de: Biochem. Soc. Trans.: 34, 960-964, 2006.

A produção de ERO/ERN por fagócitos é reconhecida como uma resposta de defesa contra agentes estranhos ao organismo, e, portanto, essencial para a sobrevivência. A partir do O₂, que se encontra no estado triplete, pode ser produzido O₂^{•-}, por ganho de um elétron, ou oxigênio singlete (¹O₂), por mudança do número de spin de um dos dois elétrons não pareados do O₂ através de uma reação endotérmica. Embora o O₂^{•-} não seja uma espécie oxidante forte, reações subseqüentes deste radical levam à produção de ERO mais eficientes como

microbicidas, por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (HO^\bullet). No fagossoma, o $\text{O}_2^{\bullet-}$ sofre dismutação, resultando na produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que, além de ser capaz de atravessar membranas e oxidar GSH e metionina, ativa a expressão de genes que estão sob o controle do fator de transcrição NF- κ B. Além disso, este peróxido, através de reação de Fenton, na presença de metais como Fe^{2+} origina o radical hidroxila (HO^\bullet), extremamente reativo, capaz de causar danos em fitas de DNA, inativar diferentes enzimas, iniciar a lipoperoxidação de membranas. O $\text{O}_2^{\bullet-}$ pode, adicionalmente, sofrer protonação em meio ácido, originando a forma altamente reativa radical hidroperóxil (HO_2^\bullet). A mieloperoxidase (MPO), enzima que é liberada no fagossoma durante a fagocitose, catalisa a produção de ácido hipocloroso (HOCl), a partir de H_2O_2 e Cl^- . Este ácido, altamente reativo, é capaz de oxidar diferentes biomoléculas, servindo, ainda, de substrato para a produção subsequente de HO^\bullet e $^1\text{O}_2$ (HAMPTON; KETLE; WINTERBOURN, 1998; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007) (Figura 2).

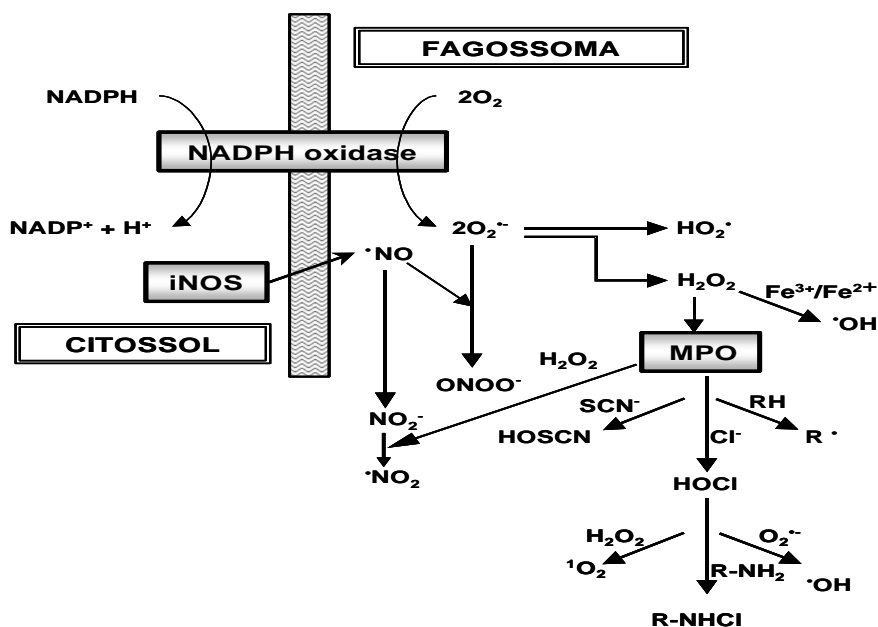


Figura 2- Produção de ERO/ERN por fagócitos. Ressaltam-se os doadores citossólicos de elétrons para o sistema Nox2 que produz $\text{O}_2^{\bullet-}$ no fagossoma. Fonte: HAMPTON et al (1998).

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

Vias bioquímicas diferentes são ativadas na produção de $O_2^{\bullet-}$ por fagócitos, dependendo da natureza das células e do ativador utilizado (JESIATIS et al. 1991; BRIGAGÃO; COLEPICOLO, 1996; BRIGAGÃO; BARROSO; COLEPICOLO, 2000). PMA e alguns de seus análogos são promotores tumorais descritos como capazes de disparar o *burst* respiratório em células fagocitárias através da ativação direta da proteína quinase C (PKC), o que independe de receptores de membranas. Estes forbóis são agonistas que se ligam diretamente ao domínio de ligação de diacilglicerol (DAG) da PKC, ativando-a por mudança conformacional e aumento da afinidade por íon cálcio, em algumas isoformas. Esta ativação determina que a mesma fosforile resíduos de serina e treonina em uma vasta gama de substratos protéicos (DYKE, 1991). Foi mostrado que a proteína p47^{PHOX} é, *in vitro*, substrato para PKC, e que a fosforilação nos seus diferentes resíduos de serina inicia a ativação do complexo Nox2 (BABIOR, 2000; SEGAL, 2008).

1.4. PROTEÍNA DISSULFETO ISOMERASE

A proteína dissulfeto isomerase (PDI, E.C. 5.3.4.1) é membro da grande classe proteica das tiol/dissulfeto oxidoreduases (tioredoxinas) encontradas no lúmen do retículo endoplasmático (RE) em células eucarióticas. Foi descrita pela primeira vez há mais de 40 anos como uma proteína de 58 kDa (PDI58) (GOLDBERGER; EPSTEIN; ANFINSEN, 1963), sendo hoje identificadas várias

isoformas, tanto em células de mamíferos (ERp57, ERp72, ERp44, PDIR, P5, ERdj5 e PDIp) quanto em fungos e plantas (Eps1, Eug1, Mpd 1, Mpd2) e bactérias (DsbA e DsbC/G) (WILKINSON; GILBERT, 2004).

A PDI é organizada em cinco domínios (a, b, b', a', e c) (Figura 3) (DARBY; KEMMINK; CREIGHTON, 1996). O domínio a e a' da PDI são homólogos às tioredoxinas e cada um contém um sítio ativo independente. Cada sítio ativo contém duas cisteínas na sequência WCGHCK que media a atividade da PDI (EDMAN et al. 1985). Os domínios inativos (b e b') não são similares em sequência para as tioredoxinas. Os limites dos domínios são bem definidos pelo mapeamento e expressão proteolítica (DARBY; KEMMINK; CREIGHTON, 1996), e a eliminação e rearranjo de vários mutantes foram feitos (DARBY; PENKA; VINCENELLI, 1998; XIAO et al. 2001). São disponíveis estruturas obtidas por ressonância (RMN) para os domínios a e b (KEMMINK et al. 1996; KEMMINK et al. 1997). O domínio a adota o esperado enovelamento característico de tioredoxina. Apesar da falta de similaridade de sequência significativa, b também adota um enovelamento da tioredoxina (KEMMINK et al. 1997).

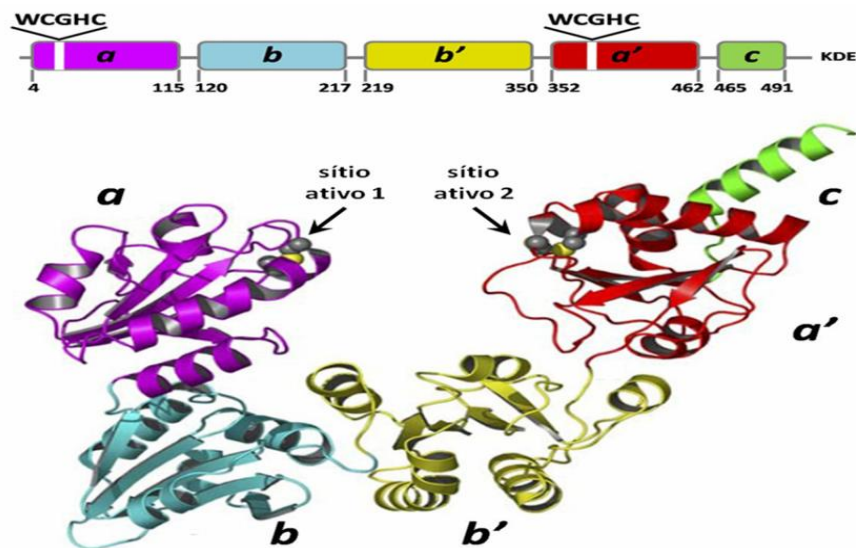


Figura. 3. Organização dos domínios da PDI. Fonte: KLAPPA et al (1998).

Apesar da ausência de dados sobre a estrutura completa da PDI, evidências obtidas por velocidade de sedimentação e medidas de equilíbrio sugerem que esta

proteína é um monômero alongado (WILKINSON ; GILBERT, 2004) que apresenta duas atividades enzimáticas inter-relacionadas: (i) atividade de chaperona molecular, que assiste ao enovelamento de cadeias polipeptídicas nascentes e (ii) atividade de óxidoreductase, quando exerce catálise na formação, redução e isomerização de pontes dissulfeto intra- e/ou inter-moleculares.

O primeiro tipo de atividade catalítica, ilustrado na Figura 4, é essencial para evitar o enovelamento proteico incorreto, sendo que danos e erro de enovelamento às estruturas proteicas estão relacionados com patologias como doença de Alzheimer, enfisema pulmonar e infecções por príons (DOBSON, 2001). Recentemente foram descritas alterações no enovelamento proteico assistido por PDI no RE de células hepáticas associado ao diabetes insulino-dependente, onde as isoformas PDI58 e ERp57 mostraram-se com atividades catalíticas alteradas, fato diretamente ligado ao estado de óxido-redução de grupamentos tióis proteicos microsossomais (KERSTEEN ; RAINES, 2003).

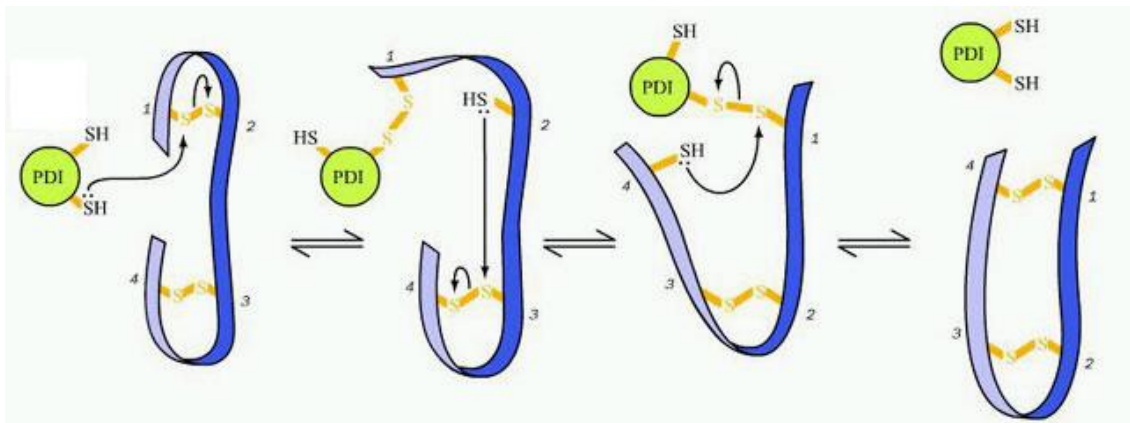


Figura 4. Esquema ilustrativo da atividade da PDI como chaperona molecular. A cadeia polipeptídica nascente (esquerda) se re-enovela, atingindo a conformação correta (direita), através do reposicionamento de pontes dissulfeto intra-moleculares. Fonte: www.bch.msu.edu/faculty.

A atividade catalítica como oxidoreductase da PDI é atribuída ao domínio CXXC, característico das enzimas da família das ditiol/dissulfeto oxidoreductases. Durante a transferência de equivalentes oxidantes ou redutores para os substratos, o domínio CXXC posicionado em ambos os sítios ativos, passa pelo ciclo entre as

formas reduzidas (ditiol) e oxidada (dissulfeto), onde a cisteína nucleofílica próxima à extremidade N-terminal da proteína inicia o ciclo catalítico da enzima (WALKER; LYLES; GILBERT, 1996). A atividade catalítica ocorre tanto na formação ou quebra quanto na isomerização de pontes dissulfeto em diferentes substratos, como mostrado na Figura 5. No primeiro caso, a PDI sofre uma mudança em seu estado de óxido-redução, enquanto que, no segundo evento enzimático, que requer a enzima com cisteínas em estado reduzido, não resulta em nenhuma oxidação na estrutura da PDI.

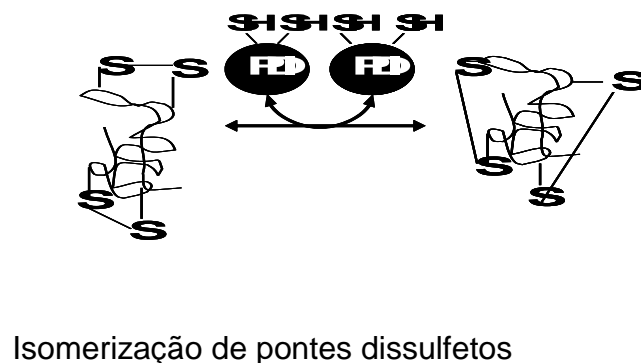
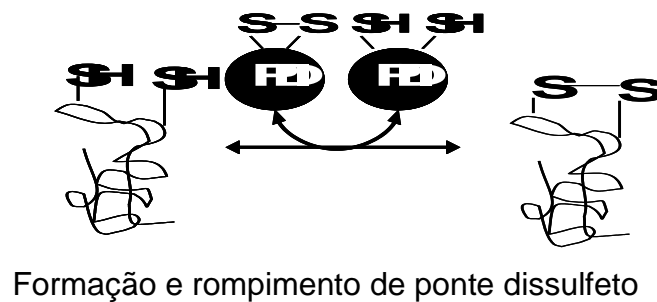


Figura 5. Atividade catalítica na formação e rompimento e na isomerização de pontes dissulfeto intramoleculares catalisadas por PDI. Fonte: Wilkinson; Gilbert, (2004).

A seqüência CXXC do sítio ativo, onde duas cisteínas catalizam a troca de uma ligação dissulfeto com os substratos ou dentro deles, é essencial para a função preliminar das PDI em promover o dobramento oxidativo da proteína no RE. Esse papel foi estendido em anos recentes para incluir papéis em outros processos tais

como a degradação associada ao RE (ERAD), intercâmbio, homeostase do cálcio, apresentação do antígeno e a entrada de vírus em células eucarióticas. Algumas destas funções são executadas pelos membros catalíticos da família que carecem do sítio ativo das cisteínas.

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

1.4.1. Propriedades catalíticas da PDI e correlação com estados fisiológicos

Entre os muitos membros da superfamília tiorredoxina, as diferentes isoformas de PDI são as únicas que catalizam reações de isomerização, ou seja, reorganizam o posicionamento de pontes dissulfeto através de repetidos ciclos de oxidação e redução (WILKINSON ; GILBERT, 2004; ELLGAARD ; RUDDOCK, 2005; NOIVA, 1999; FERRARI ; SOLLING, 1999) (Figura 5). A função clássica da PDI é promover o enovelamento proteico no RE (GRUBER et al. 2006). Esta função é assegurada pelo contínuo fornecimento de equivalentes oxidantes realizado pela Ero1 (*Endoplasmic reticulum oxidase - 1*), uma oxidase residente do RE (APPENZELLER-HERZOG et al. 2008). Esta, por sua vez, é mantida na forma oxidada pela ação da glutathiona oxidada (GSSG) oriunda do citossol (MOLTENI et al. 2004). De fato, a ação da PDI é consideravelmente influenciada pelo potencial redutor do meio, ou seja, pela razão entre as concentrações de glutathiona reduzida/oxidada (GSH)/GSSG. No RE, dadas as condições relativamente oxidantes

(razão GSH:GSSH~2-3:1), a PDI atua principalmente como uma oxidase, enquanto fora dele atua principalmente como uma redutase (razão GSH:GSSG>30-100:1) (WILKINSON; GILBERT, 2004). A PDI também possui atividade chaperona, auxiliando o enovelamento de proteínas destituídas de pontes dissulfeto (MOLTENI et al. 2004). Esta atividade está bem caracterizada como sendo independente dos tióis reativos da proteína (QUAN; FAN; WANG, 1995).

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

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

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

1.5 NITRÓXIDOS CÍCLICOS

permanentes, os nitróxidos são empregados como sondas em estudos envolvendo Ressonância Paraeletromagnética Eletrônica (EPR) e são usados como agentes de contraste para imagem de ressonância magnética (MRI) (SOULE et al. 2007).

Através de processos metabólicos celulares ou reações não enzimáticas, nitróxidos são metabolizados produzindo hidroxilaminas ou cátion oxoamônio (Figura 7). A atividade antioxidante dos nitróxidos está associada com a troca de um elétron envolvendo sua forma reduzida (hidroxilamina) e oxidada (cátion oxoamônio). O par nitróxido e cátion oxoamônio agem como uma eficiente dupla redox suportando processos catalíticos. Ao contrário, o par nitróxido e hidroxilamina não suporta este processo catalítico (ISRAELI et al. 2005; SOULE et al. 2007).

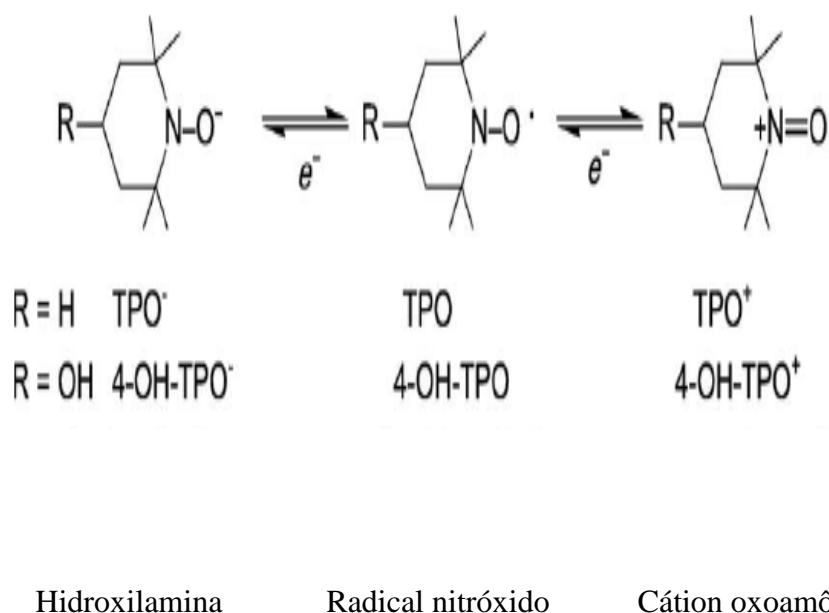


Figura 7. O processo redox de metabolização de nitróxidos. Os nitróxidos passam por uma sequência de reações bioquímicas, formando hidroxilamina ou cátion oxoamônio. Fonte: ISRAELI et al (2005).

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

1.5.1 Propriedades antioxidantes e antiinflamatórias dos nitróxidos

Durante os últimos anos, e com base nas propriedades descritas anteriormente, os nitróxidos têm sido amplamente investigados por sua capacidade antioxidante, mostrando-se capazes de defender células, tecidos, órgãos e animais de laboratório de danos induzidos por oxidantes. Assim, diversos estudos os apontam como candidatos eficientes a atuar contra os danos tissulares causados pelas ações deletérias de células inflamatórias, cuja produção de ERO/ERN fuja ao controle da homeostase orgânica (HAHN; MITCHELL; SHACTER, 1997; ISRAELI et al. 2005; SOULE et al. 2007; LAIGNIER et al. 2008; TIMONER et al. 2008).

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

Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar como os nitróxidos são capazes de atenuar danos oxidativos, o que os difere consideravelmente dos antioxidantes monofuncionais, que desempenham a sua atividade através de uma única maneira de atuação. Ao contrário desses, os nitróxidos apresentam as habilidades que devem estar presentes em antioxidantes realmente efetivos, pois, podem atuar tanto em compartimentos hidrofílicos como lipofílicos; detoxificam uma ampla gama de espécies reativas oxidantes, impedindo o início e a propagação da cadeia oxidativa, além de atuarem de modo que o nitróxido utilizado nessa função possa ser, ao menos parcialmente, reciclado à sua estrutura original. Especificando, os meios pelos quais essa classe atua incluem (i) a dismutação de $O_2^{\bullet-}$, através de uma atividade mimética à da SOD, (ii) aumento da atividade semelhante à da

catalase e de outras heme-proteínas, (iii) a detoxificação de espécies reativas formadas por xenobióticos, (iv) a capacidade de interagir com radicais inativando-os e (v) a modulação da sinalização redox da célula. (KRISHNA et al. 1994; ZHANG et al. 1999; SAMUNI et al. 2002; LAIGNIER et al. 2008; TIMONER et al. 2008).

Uma das primeiras propriedades de interesse foi a capacidade de mimetizar as enzimas SOD, atividade observada inicialmente nos nitróxidos oxazolidina, e confirmada em outras classes. O mecanismo dessa atividade mimética é compreendido atualmente como fruto da atuação do par redox cátion oxoamônio/nitróxido, o qual forma um ciclo que tende a regenerar o nitróxido. Sendo assim, a forma radicalar é oxidada através da doação de um elétron do ânion superóxido, originando um cátion oxoamônio, o qual sofre redução através da doação de um elétron de outro ânion superóxido, restaurando o nitróxido e originando oxigênio molecular. Ou seja, de maneira similar à da SOD, os nitróxidos atuam como catalisadores, e não são consumidos durante o processo de dismutação (SAMUNI et al. 2002; SOULE et al. 2007).

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

Os nitróxidos também atuam como “scavengers” de radicais, realizando reações rápidas que produzem espécies não tóxicas e evitando os efeitos deletérios desses no organismo, podendo encerrar reações em cadeia, como a peroxidação lipídica (GLEBSKA et al. 2003). As interações entre nitróxidos e radicais, em muitos casos,

ainda necessitam ser elucidadas. Um exemplo está na complexidade das interações entre esses compostos e as espécies derivadas do nitrogênio. O óxido nítrico $\bullet\text{NO}$ e peroxinitrito (ONOO^-) não reagem diretamente com os nitróxidos simples em pH neutro, mas eles podem ser oxidados por $\bullet\text{NO}_2$ formado durante a auto-oxidação do $\bullet\text{NO}$ ou da decomposição do ONOO^- . No entanto, reagem diretamente com nitróxidos nitronil, formando imino nitróxidos e $\bullet\text{NO}_2$ (GOLDSTEIN; SAMUNI; MERENYI, 2003).

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

Fernandes e colaboradores demonstraram em 2005 que a inibição da nitração de proteínas, a qual ocorre por mecanismos radicalares, pode ser responsável pela proteção que o Tempol (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil) fornece a tecidos e células em modelos de inflamação. Logo, uma hipótese que desperta atenção de nosso grupo de pesquisa, é a de que nitróxidos possam atuar como “scavengers” de radicais tiila ($\text{RS}\bullet$), especialmente glutationila, impedindo modificações pós-traducionais de diferentes proteínas. O fato, a princípio, reduziria a atividade da quinases, diminuindo a permanência do estado de fosforilação das proteínas responsáveis pela sustentação da atividade do complexo Nox2 de fagócitos, levando a uma redução da produção de oxidantes formadas durante o processo inflamatório.

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

A capacidade antioxidante de nitróxidos já se mostrou eficiente em auxiliar na recuperação e redução de danos causados pela isquemia e reperfusão em corações

de ratos. Esses resultados podem ter sido atingidos, não só combatendo os danos causados por radicais formados sob essa circunstância, mas também potencializando os efeitos positivos ocasionados pela administração de L-arginina e posterior produção de $\bullet\text{NO}$, o qual pode atuar sem que os efeitos deletérios do ONOO^- e derivados estivessem presentes (HOFFMAN et al. 2003).

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

A maioria dos textos encontrados não descreve ou cita nenhuma evidência de que a classe dos nitróxidos possua ação mutagênica, carcinogênica ou teratogênica (SOULE et al. 2007). No entanto, Wang e colaboradores (1996) apontam o fato de que existem informações conflitantes a respeito da mutagenicidade dos nitróxidos, tendo sido observados tanto efeitos citotóxicos, como mutagênicos em células de *S. typhimurium* sensíveis a danos oxidativos e expostas a doses elevadas. Ao contrário do esperado, os nitróxidos também demonstraram baixa capacidade de proteger células mutantes de *Escherichia coli* deficientes em genes de reparo do DNA, podendo potencializar a citotoxicidade do peróxido de hidrogênio e a ocorrência de danos oxidativos no material genético. Contudo, os resultados sugerem que a atividade observada não resulta da ação dos nitróxidos, mas sim da deficiência das células em questão.

Também é conveniente lembrar que existe a possibilidade de que o metabolismo de nitróxidos ocorra de maneira distinta, dependendo do tipo celular, sendo necessário conhecer as vias que ditam esse processo e como obter proveito dessas

descobertas visando, por exemplo, diminuir a metabolização, o que repercutiria na duração e intensidade dos efeitos (NISHIMURA ; SWARTZ, 1994).

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

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

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

Este trabalho teve por objetivo central avaliar o papel da PDI na ativação do complexo Nox2 de neutrófilos inflamatórios. Para tanto, foi testada a atividade de Nox2 em neutrófilos tratados com inibidores conhecidos de PDI. Adicionalmente, o efeito do nitróxido Tempol sobre a atividade do complexo Nox2 foi testado, visando explorar se a modulação da atividade de PDI exercida pelo nitróxido está diretamente correlacionada à regulação da oxidase fagocitária.

Este trabalho proporcionou um melhor conhecimento da mediação de PDI na ativação do complexo Nox2 fagocitário, contribuindo para um melhor entendimento dos sinais moleculares associados à desativação do mecanismo oxidativo de fagócitos. Adicionalmente, foi evidenciado o potencial de nitróxidos como reguladores do processo inflamatório, o que aponta esses compostos como protótipos de fármacos.

3 RESULTADOS

3.1 ARTIGO

Em concordância com o Capítulo IX, Artigo 22 das Normas Acadêmicas do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, a dissertação está apresentada como uma revisão de literatura, e a Metodologia desenvolvida, bem como Resultados e Discussão, constam do artigo originado do projeto de Mestrado.

O artigo mostra os resultados da inibição da atividade catalítica da proteína dissulfeto isomerase pelo nitróxido Tempol, em correlação com a atividade do sistema enzimático NADPH oxidase em neutrófilos inflamatórios.

O artigo foi submetido ao periódico *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, ISSN 0928-0987, Qualis A1 internacional (área de Farmácia) e fator de impacto 2,608.

Tempol downregulates protein disulfide isomerase activity associated with phagocytic NADPH oxidase

Gérsika B. Santos^a, Altamir F. Oliveira^a, Samuel N. P. Lima^a, Ana C. G. Ribeiro^a,
Maísa R. P. L. Brigagão^a

^aLaboratory of Biochemistry, Institute of Exact Sciences; Federal University of Alfenas, Brazil.

Corresponding author:

Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão

Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700

Instituto de Ciências Exatas

37130.000 Alfenas MG Brazil

Phone +55-35-3299-1262

Fax +55-35-3299-1384

E-mail maisa.brigagao@unifal-mg.edu.br

Abstract

Protein disulfide isomerase (PDI) is an ubiquitously expressed enzyme that catalyses the rearrangement of disulfide bonds in target proteins. Previous studies suggest that PDI, which is a chaperone involved in protein trafficking and translocates to the cell surface, may regulate the phagocytic NADPH oxidase complex (Nox2). This study examines whether the nitroxide 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy (Tempol) inhibits the regulatory activity of PDI interconnected to Nox2 in inflammatory neutrophils. Phorbol-triggered superoxide anion release was correlated with the PDI reductase activity detected in neutrophils, as determined by oxygen consumption and cleavage of a fluorescent probe, respectively. Both events were significantly inhibited in a concentration-dependent manner when neutrophils were pre-treated with Tempol, which has an ED₅₀ of 45 µM. To substantiate that Tempol's action on PDI activity is related to Nox2 downregulation, assays with the known PDI inhibitors bacitracin and dithionitrobenzoic acid were performed to confirm their ability to decrease the neutrophil respiratory burst. This study shows that Tempol's inhibition of Nox2 activity is correlated with decreased PDI reductase activity at the neutrophil cellular membrane, suggesting a close association between the enzymes of activated phagocytes and pointing to a novel anti-inflammatory mechanism for Tempol.

1 Introduction

Inflammation is the major mammalian mechanism of defence against trauma and infection. It is the most frequent and immediate response to external and internal insult and is directly linked to inflammatory and autoimmune pathologies (Sobolewski et al. 2010). The effector cells in this process are phagocytes, which are cells that migrate into the inflammatory focus to engulf and eliminate foreign agents. The NADPH oxidase complex (Nox2) found in phagocytes produces superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$), which prompts the production of diverse reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) in phagosome (Lambeth et al. 2008). Activation of Nox2 in intact phagocytes is triggered by diverse stimuli that promote the translocation of cytosolic oxidase components to the phagosome membrane, followed by engagement with granule-bound subunits (Hiran et al. 1998). Nox2 is activated by several agents that are involved in various biochemical pathways through the promotion of the respiratory burst, which is an event characterised by a rapid, cyanide-insensitive increase in phagocyte oxygen uptake, ROS/RNS release, glucose consumption and intracellular $[Ca^{2+}]$ levels (Hampton et al. 1998; Lambeth et al. 2008).

Protein disulfide isomerase (EC 5.4.3.1, PDI) is an ubiquitously expressed enzyme that is widely distributed in eukaryotic tissues at relatively high concentrations; it constitutes nearly 2% of the total protein content of the endoplasmic reticulum (ER) (Molinari, 2007). A central organelle in the cellular secretory pathway, the ER is enriched in enzymes that assist in the folding process and is dedicated to proper

protein assembly, trafficking and secretion (McCracken and Brodsky, 2005; Ruddock and Molinari, 2006; Shimizu and Hendershot, 2007). This chaperone is associated with several NADPH oxidase subunits, including the isoforms Nox1, Nox4 and Nox2 in native vascular smooth muscle cells (VSMCs) or in HEK293 cells transfected with Nox isoforms (Janiszewski et al. 2005). Similar associations and functional interactions have recently been identified in macrophages and endothelial cells (Laurindo et al. 2008). Tempol is a stable, low-molecular-weight piperidine nitroxide that permeates biological membranes and scavenges ROS/RNS (Teke et al., 2008). This nitroxide action involves biochemical mechanisms related to the downregulation of pro-inflammatory cytokines and the enzymatic inhibition of myeloperoxidase-catalysed oxidative damage (Cuzzocrea et al. 2000; Fernandes et al. 2005; Khattab, 2006; Soule et al. 2007; Teke et al., 2008; Thaler et al. 2010; Tshako et al. 2010). We hypothesised that, in addition to its established anti-inflammatory mechanisms, Tempol would decrease the concentration of ROS/RNS released by neutrophils by inhibiting PDI and regulating the catalytic activity of Nox2.

2 Materials and Methods

2.1 Chemicals

Reduced (GSH) and oxidised glutathione (GSSG), Sephadex G-25, 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-piperidine-*N*-oxyl (Tempol), horse heart ferricytochrome c type VI (cyt c), phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), dithiothreitol (DTT) and protein disulfide isomerase from bovine liver (PDI), luminal and horseradish peroxidase

(HRP) were purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) was purchased as part of the Vybrant® MTT cell proliferation assay kit (Eugene, OR, USA). Eosin 5-isothiocyanate was acquired from Invitrogen. K_2HPO_4 , KH_2PO_4 and EDTA were purchased from Vetec Ltd. All other chemical reagents used were of analytical grade.

2.2 Neutrophil preparation

Swiss male mice (25-28 g, 6-8 weeks in age) were obtained from Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, Brazil. The animals were housed in plastic cages, and water and food were available *ad libitum*. The experiments were approved by the Ethics Committee in accordance with an institutional authorised protocol based on the 2010/63/European Union directive.

Neutrophils were obtained and purified as previously described (Brigagão and Colepicolo, 1996). Briefly, animals were injected intraperitoneally with 1.0 ml 12% (w/v) sodium caseinate; after 4 h, the peritoneal cells were harvested in ice-cold phosphate-buffered saline (PBS). After centrifugation (1,000g, 10 min), pelleted cells were resuspended in D-PBS-G (1.35 mg/ml D-glucose), and the number of cells was determined by counting in an AO Spencer hemacytometer chamber. The cell population obtained was 95% neutrophils, and the viability after each experiment was greater than 90% (checked by May-Grunwald-Giemsa staining and MTT assay, respectively). All experiments were performed with cell suspensions containing 1×10^6 neutrophils/ml.

2.3 Action of Tempol and PDI inhibitors on neutrophil Nox2 activity

2.3.1 Neutrophil oxygen consumption

Cellular consumption of oxygen was polarographically measured by detecting changes in the oxygen tension of the reaction media using a Clark-type electrode. Based on the oxygen consumption of neutrophils with stoichiometric $O_2^{\bullet-}$ release (Metcalf et al. 1986), this is a reliable measure of the ability of phagocytes to produce oxygen radicals and is valuable for the discrimination of Nox2 inhibition from nitroxide superoxide dismutase-like activity. Cells were incubated (37°C, 10 min) with Tempol (5-100 μ M), bacitracin (2 mM) or DTNB (5 mM), with subsequent addition of Nox2 stimulation (PMA, 100 ng/ 10^6 neutrophils). Data were recorded as the amount of oxygen consumed per minute per 10^6 cells, and the results are expressed as the percentage of inhibition promoted by each compound. The ED_{50} was defined as the Tempol dose effectively inhibiting 50% of oxygen consumption.

Controls were performed for all experiments using dormant neutrophils incubated with vehicle alone. The oxygen consumption of PMA-stimulated cells with no pre-treatment was considered to be 100%, i.e., equivalent to full Nox2 activity.

2.3.2 Neutrophil respiratory burst quantified by superoxide anion release and luminescence emission

To corroborate the effects of bacitracin and DTNB on phagocytic oxidase activity, neutrophil suspensions were subjected to an identical pre-incubation with both PDI

inhibitors as described in 2.3.1. After PMA addition triggered Nox2 activity, $O_2^{\bullet-}$ release was spectrophotometrically determined using cyt *c* reduction (550 nm) as previously described (Cohen and Chovaniec, 1987). The reaction was monitored over 2 min, and data from the initial 30 s were used to calculate $O_2^{\bullet-}$ production utilising an extinction coefficient of $\epsilon=21,000 M^{-1}\cdot cm^{-1}$.

Alternatively, the inflammatory neutrophil respiratory burst was assessed using the luminol-dependent chemiluminescence assay (Lundqvist and Dahlgren, 1996) with neutrophils under identical treatments. Changes in chemiluminescence were measured in the thermally controlled chamber of a Promega Lomax 20/20 luminometer; the results were compared to those with control PMA-stimulated cells and are expressed as a percentage of full inhibition (Lundqvist and Dahlgren, 1996).

2.4 Tempol action on the reductase activity of PDI in neutrophil suspensions

2.4.1 Preparation of a fluorescent probe to measure PDI reductase activity

Oxidised glutathione (GSSG) was incubated with a molar excess (10-fold) of eosin 5-isothiocyanate in potassium phosphate buffer (100 mM, 2 mM EDTA, pH 8.8) for 8 h at room temperature. The resulting non-fluorescent dimer dieosin glutathione disulfide (Di-E-GSSG) was chromatographically purified (100 mm x 10 mm Sephadex G-25 column, elution buffer potassium phosphate 0.1 M, 2 mM EDTA, pH 7.00, flow rate 1 ml·min⁻¹) and used as a pseudosubstrate for PDI reductase activity as previously described (Raturi and Mutus, 2007). The aliquots (5 to 10) eluted with

high absorbance values at 521 nm were pooled together and quantified ($\epsilon = 88,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

To monitor Di-E-GSSG enzymatic cleavage, a standard plot was generated with commercial purified bovine liver PDI. This plot was used to quantify any reduction of Di-E-GSSG to E-GSH, which was visible through the release of vicinal eosin moieties due to reduction of the disulfide bonds. E-GSH ($\lambda_{\text{exc}}=521 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emi}}=542 \text{ nm}$) was detected using a Varian Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer for incubations (37°C, 10 min) of various Di-E-GSSG concentrations (5-300 nM) with PDI (20 nM) in D-PBS-G buffer with DTT (5 μM , 10 min, 37°C), as previously described. The results are expressed as nM of E-GSH produced per minute (Raturi and Mutus, 2007).

The efficiency of E-GSH production for this method was assessed for aliquots of the enzymatic reaction using high-performance liquid chromatography (HPLC). A method previously described by Anderson et al. (1999), with modifications, was used to identify and quantify thiolic compounds. The column (C-18 Shim-pack VP-ODS, 4.6 mm x 25 cm, 5 μm , connected in series with C18 pre-column model Shim-pack GVP-ODS, 4.6 mm x 10 mm) was pre-equilibrated with 100% buffer A (87% acetate buffer and 14% methanol) at a flow rate of 1 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$. The elution was performed with buffer A and buffer B (10% acetate buffer and 90% methanol). After sample injection (20 μl aliquots filtered with 0.45 μm Millipore® membranes), elution was carried out in gradient mode (75% buffer A and 25% buffer B, 10 min; 25% buffer A and 75% buffer B, 20 min). Identification of E-GSH was performed by comparison with the retention time of authentic standards of GSH labelled with eosin 5-isothiocyanate using a fluorescence detector (model RF-10A) at $\lambda_{\text{exc}} = 521 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{emi}} = 542 \text{ nm}$.

2.4.2 PDI reductase activity on neutrophil membranes

PDI activity on neutrophils was detected using an assay similar to that previously described for surface PDI on blood platelets (Margaritis et al. 2010). Cellular suspensions (10^6 /ml) in D-PBS-G buffer, with 5 μ M DTT to keep PDI in the reduced state, were maintained in the resting state or triggered with PMA after Tempol (5-120 μ M) or bacitracin (2 mM) incubation (10 min, 37°C). Reductase activity PDI assays were performed immediately after the addition of Di-E-GSSG (150 nM) to phagocyte suspensions. The fluorescence intensity variation was scanned and quantified as described in 2.4.1 using a spectrofluorimeter.

2.5 Statistical analysis

All data were expressed as the mean values \pm standard deviation (S.D.). The comparisons among different groups were performed using ANOVA followed by the Tukey *t* test. $p < 0.05$ was accepted as statistically significant.

3 Results

3.1 Effect of Tempol, bacitracin and DTNB on oxygen consumption by activated neutrophils

The nitroxide effect on oxygen consumption by neutrophils due to Nox2 system activity is shown in Figure 1. PMA, a direct stimulant of protein kinase C (PKC), triggered strong oxidase activity and caused substantial oxygen consumption ($6.5 \pm 0.58 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1}$). Tempol inhibited oxygen consumption by neutrophils in a concentration-dependent manner with an ED_{50} of $45 \mu\text{M}$. When phagocytes were pre-incubated with $120 \mu\text{M}$ nitroxide, neutrophil suspensions showed no oxygen consumption or Nox2 activity.

Under the same PKC stimulus, both standard PDI inhibitors had less of an effect on neutrophil oxygen consumption than Tempol. Neither bacitracin nor DTNB efficiently eliminated the polarographic signal arising from oxygen consumption, even at high doses. A 2 mM bacitracin treatment inhibited PMA-triggered oxygen consumption by approximately 60%. Under identical conditions, 5 mM DTNB reduced oxygen consumption by PMA-stimulated neutrophils by only 22%.

Notably, no variation was detected among neutrophil treatments for MTT assay (data not shown). Therefore, the above results cannot be attributed to a decrease in cellular viability.

3.2 Bacitracin and DTNB action on the neutrophil respiratory burst quantified by superoxide anion release and luminescence emission

To confirm that DTNB and bacitracin induced a decrease in Nox2 activity, two other assays of the neutrophil respiratory burst were performed; results are shown in Table 1. Cells pre-treated with both compounds displayed a lower superoxide anion release as determined by cyt *c* reduction, and the decrease was quantitatively similar to that

obtained in oxygen consumption assays. When the action of bacitracin and DTNB on the neutrophil respiratory burst was evaluated in the luminol-peroxidase assay, a quantitative discrepancy was detected when compared to previous assays reported here. The luminescence intensity decrease caused by neutrophil treatment with bacitracin was on the order of 40%. There was a 20% decline in luminescent signal after DTNB addition to phagocytes.

3.3 PDI activity on neutrophil suspensions

The PDI pseudo-substrate Di-E-GSSG is a recently introduced fluorescent probe that is used to monitor disulfide reductase activity. The fluorescent moieties of Di-E-GSSG are covalently attached to the two *N*-terminal residues of GSSG, which demonstrate fluorescence self-quenching (FSQ) that renders the molecule relatively non-fluorescent. Upon addition of reduced PDI, Di-E-GSSG disulfide bonds are cleaved, releasing proximity constraints, and fluorescence is restored (Raturi et al. 2007). We detected the product of this enzymatic reduction through HPLC analysis (Figure 2 A); a single peak (retention time 16.48 minutes) was identified unequivocally as E-GSH, the unique product of PDI reductase activity. We established a very good correlation between the fluorescence increase and E-GSH production by PDI activity (Figure 2 B).

As shown in Figure 3, PMA-triggered neutrophils showed high reductase capability, whereas the activity in dormant cells was very low. This significant difference (a 4-fold increase in fluorescence intensity due to PMA addition) may be attributable to PDI activity because bacitracin efficiently inhibited the fluorescent signal as a result

of E-GSH production, and PMA showed no significant interference in the assays. Notably, Tempol decreased PDI activity more efficiently than bacitracin; a 15 μM treatment with the nitroxide had an effect similar to that of a >100-fold higher concentration of bacitracin.

PDI disulfide reduction activity on neutrophil suspensions was inhibited linearly by Tempol. The concentration that caused complete suppression of fluorescence from PMA-stimulated neutrophils was similar to the concentration that inhibited oxygen consumption (Figure 4). There was a clear parallel decrease in $\text{O}_2^{\bullet-}$ release and reductase PDI inhibition levels in inflammatory neutrophils, as shown in Figure 5.

4 Discussion

Leukocytes are especially important for their ability to efficiently engulf and destroy pathogens. Neutrophils are the most abundant and are usually the first cells to attack inflammatory sites (Dale et al. 2008). Nox2 is the initial source of ROS/RNS within phagocytes, and its overproduction has been implicated in various vascular, immune and inflammatory diseases. As a result, vigorous efforts are underway to develop clinically useful inhibitors of the Nox2 enzyme (Lambeth et al. 2008). The oxidase is assembled by recruitment of the cytosolic subunits p47phox, p67phox and rac2 to the membrane-bound cytochrome b558 formed by the p22phox and gp91phox subunits. Nox2 and analogous oxidases can be inhibited by thiol oxidants, such as the protein chaperone PDI, which has an active-site CXXC sequence (Siems et al. 1997; Wilkinson and Gilbert, 2004; Santos et al. 2009; Margaritis et al. 2010). Thiol oxidoreductases are effective modulators of the thiol redox state of cell membranes

in the ER and cytosol. Considering that spontaneous thiol-disulfide exchange reactions occur at rates too low to permit involvement in regulatory pathways and that PDI is a ubiquitous multifunctional enzyme of the thiol oxidoreductase family that is involved in the regulation of various cellular mechanisms including cellular protein traffic, it is postulate that thiol oxidoreductases may control Nox2 activity on phagocytes (Santos et al. 2009). Our goal was to investigate the interaction between PDI reductase activity and Nox2 action in neutrophils, as well as Tempol action on these synchronized events.

The regulation of Nox2 activity is made possible primarily by two distinct mechanisms: (i) separation of the oxidase subunits into distinct subcellular compartments during the resting state and (ii) modulation of reversible protein-protein interactions between them (Groemping and Rittinger, 2005). Therefore, factors that affect the assembly of subunits and conformational changes to their structure have a central role in the control of the respiratory burst.

Previous reports have shown by western blot analysis that PDI in macrophages is closely associated with the phagosome membrane, where the Nox2 subunit cytochrome b558 is found. In smooth muscle cells, PDI was also found in the membrane fraction, and immunofluorescence assays disclosed a spatial colocalisation of PDI and oxidase (Santos et al. 2009). We therefore investigated neutrophil membrane PDI activity by probing the reductase action of this chaperone. We show here that Nox2 triggering elicits robust oxygen consumption (Figure 1), which is correlated to high reductase activity (Figures 3 and 4). Notably, the same figures show the reductase PDI activity that occurs discretely on dormant neutrophils.

It is clear that the PDI inhibitors bacitracin and DTNB cause a significant decrease in Nox2 activity (Table 1), suggesting matched events in phagocytes (Figure 5).

Dithiol oxidoreductases, especially those belonging to the thioredoxin superfamily, are known to be important in redox signalling mechanisms (Arrigo, 1999; Clissold and Bicknell, 2003; Wilkinson and Gilbert, 2004). Within the thioredoxin superfamily, PDI and their analogues catalyse isomerisation reactions, rearranging the positions of disulfide bonds through repeated cycles of oxidation and reduction (Ferrari and Soling, 1999; Noiva, 1999; Ellgaard and Ruddock, 2005). Leukocytes, despite their short half-life and low levels of ribosomes and ER, abundantly express PDI and release it in soluble form when stimulated with phorbol esters (Bassuk et al. 1990). Given the metabolic importance of controlled ROS/RNS release by leukocytes and various reports on the anti-inflammatory action of Tempol, we tested whether this nitroxide is able to inhibit the catalytic activity of PDI and thereby regulate the respiratory burst.

The results show that Tempol is capable of suppressing PMA-elicited Nox2 activity, as demonstrated by inhibition of oxygen consumption (Figure 1). Inflammatory neutrophils, when incubated with bacitracin and DTNB, which are two known inhibitors of PDI, showed a decrease in oxidative burst evident as a decrease in the release of $O_2^{\bullet-}$ and chemiluminescence, as shown in Table 1.

The effectiveness of the nitroxide in inhibiting the reductase activity of PDI was measured through the cleavage of Di-E-GSSG. As shown in Figure 2, fluorescent detection of E-GSH, generated by the breaking of disulfide bridges of Di-E-GSSG by PDI, was chromatographically analysed. Figure 2 also displays the stoichiometry of the enzymatic reaction, allowing us to explore the activity of PDI in intact neutrophils.

In Figure 3, although there is baseline fluorescence emission, PMA alone elicited no significant interference. However, when neutrophils were triggered with PMA, intense fluorescence emission was detected, implying that respiratory burst stimulation elicits PDI activity at the cellular membrane.

The nitroxide Tempol, as well as bacitracin, inhibited PMA-triggered PDI catalytic activity, as confirmed by the kinetic study shown in Figure 4. It is important to note that the two neutrophil responses, respiratory burst and PDI activity, emerged synchronously in response to both PMA stimulation and Tempol treatment (Figure 5). Many chemicals and peptides are known to inhibit ROS production by Nox2. Among them, phenylarsine oxide, a sulfhydryl reagent for thiol groups, and 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride inhibit the oxidase by preventing assembly of the complex (El-Benna et al. 2010). These compounds and the nitroxide Tempol are not specific chemical inhibitors for the phagocyte oxidase. However, unlike the other compounds, Tempol has few undesirable effects because it is metabolised to oxoammonium cation or hydroxylamine, depending on the redox state and metabolic rate of the cells (Wilcox and Pearlman, 2008),

Raturi and Mutus (2007) reported that if PDI is maintained in a reduced state using a low concentration of DTT that is insufficient for reducing the probe, the reductase activity of PDI can be explored at the cellular surface. The high affinity of Di-E-GSSG was attributed in part to the aromatic rings of eosin, which facilitate a hydrophobic interaction with PDI near its active site that results in high affinity. This hypothesis is based on the fact that active site dithiols in thioredoxin are surrounded by hydrophobic regions. It is reasonable to hypothesise that Tempol may cause a direct inhibition of PDI by attachment to hydrophobic regions of the enzyme. However,

other molecular targets for Tempol have not been ruled out. It is well known that the respiratory burst elicits intracellular production of radical species that act as second messengers to elicit specific biochemical pathways implicated in the triggering and maintenance of Nox2 activity (Dahlgren and Karlsson, 1999). Tempol is an efficient cell-permeable scavenger of peroxy and thiyl radicals and $O_2^{\bullet-}$, among many other ROS/RNS (Wilcox and Pearlman, 2008). The nitroxide may exert an anti-oxidant action and thereby decelerate signalling cascades essential for Nox2 activity. Phosphorylation and S-glutathionylation post-translational processes involved in Nox2 assembly (Hampton et al. 1998; Lim et al. 2010) might be halted in this way. Indeed, Tempol prevented PKC activation (Coppey et al., 2003) and downstream phosphorylation of target proteins in proximal tubules from rats (Banday et al. 2007) and lung cells stimulated with the redox-cycling quinolone paraquat (Kuo et al. 1995). However, the finding that Tempol blocked increases in intracellular $[Ca^{2+}]$ and constriction of vasa recta pericytes after stimulation by the PKC agonist phorbol 12,13-dibutyrate demonstrated that this nitroxide can also interrupt signalling downstream from PKC (Zhang et al. 2004). These mechanisms are under investigation in our laboratory in an effort to clarify the effect of Tempol on phagocytes.

In summary, our results may be explained by the fact that activation of neutrophils induces PDI reductase activity at the neutrophil plasma membrane when the chaperone facilitates the stabilisation of the oxidase complex. To our knowledge, the present work is the first that has analysed the reductase effect of PDI in neutrophils and the effect of Tempol on this process. Based on the data presented here, we suggest that Tempol downregulates neutrophil Nox2 activity, acting at least in part

through the inhibition of PDI. Although other Tempol biochemical mechanisms cannot be ruled out, the present data explain much of the nitroxide's action on inflammatory processes.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). M.R.P.L. Brigagão is member of the INCT de Processos Redox em Biomedicina-Redoxoma (CNPq Process: 573530/2008-4). G.B. Santos was a depositary of a partial scholarship from CAPES and FAPEMIG.

References

- Anderson, M.T., Trudell, J.R., Voehringer, D.W., Tjioe, I.M., Herzenberg, L.A., 1999. An improved monobromobimane assay for glutathione utilizing Tris-(2-carboxyethyl) phosphine as the reductant. *Anal. Biochem.* 272, 107–109.
- Arrigo, A.P., 1999. Gene expression and the thiol redox state. *Free Rad. Biol. Med.* 27, 936-944.

Banday, A.A., Fazuli, F.R., Lokhandwala, M.F., 2007. Oxidative stress causes renal dopamine D1 receptor dysfunction and hypertension via mechanisms that involve nuclear factor kB and protein kinase c. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18, 1446-1457.

Bassuk, J.A., Capodici, C., Berg, R.A., 1990. Protein disulphide isomerase from human peripheral blood neutrophils. *J. Cell. Physiol.* 144, 280-286.

Brigagão, M.R.P.L., Colepicolo, P., 1996. Oscillations in superoxide anion release by polymorphonuclear leukocytes and its inhibition by human saliva. *Biol. Rhythm Res.* 27, 261-268.

Cohen, H.J., Chovaniec, M.E., 1987. Superoxide generation by digitonin-stimulated guinea pig granulocytes: a basis for a continuous assay monitoring superoxide production and for the study of the activation of the generating system. *J. Clin. Invest.* 61, 1081–1087.

Clissold, P.M., Bicknell, R., 2003. The thioredoxin-like fold: hidden domains in protein disulfide isomerases and other chaperone proteins. *BioEssays.* 25, 603-611.

Coppey, L.J., Gellett, J.S., Davidson, E.P., Yorek, M.A., 2003. Preventing superoxide formation in epineurial arterioles of the sciatic nerve from diabetic rats restores endothelium-dependent vasodilation. *Free Rad. Res.* 37, 33-40.

Cuzzocrea, S., McDonald, M.C., Filipe, H.M., Costantino, G., Mazzon, E., Santagati, S., Caputi, A.P., Thiemeermann, C., 2000. Effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model of carrageenan-induced pleurisy. *Eur. J. Pharmacol.* 390, 209-222.

Dale, D.C., Boxer, L., Liles, W.C., 2008 The phagocytes: neutrophils and

monocytes. *Blood*. 112(4), 935-945.

Dahlgren, C., Karlsson, A., 1999. Respiratory burst in human neutrophils

J. Immunol. Methods. 232, 3–14.

El-Benna, J., Dang, P.M.C, Périani, A., 2010. Peptide-based inhibitors of the phagocyte NADPH oxidase. *Biochem. Pharmacol.* 80, 778–785

Ellgaard, L., Ruddock, L.W., 2005. The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. *EMBO Rep.* 6, 28-32.

Fernandes, D.C., Medinas, D.B., Alves, M.J.M., Augusto, O., 2005. Tempol diverts peroxynitrite/carbon dioxide reactivity toward albumin and cells from protein–tyrosine nitration to protein–cysteine nitrosation. *Free Rad. Biol. Med.* 38, 189-200.

Ferrari, D.M., Soling, H.D., 1999. The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds. *Biochem. J.* 339, 1-10.

Groemping, Y., Rittinger, K., 2005. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem. J.* 386, 401-416.

Hampton, M.B., Kettle, A.J., Winterbourn, C.C.,1998. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing, *Blood*. 92, 3007–3017.

Hiran, T.S., Moulton, P.J., Hancock, J.T.,1998. *In situ* detection of superoxide anions within porcine articular cartilage. *B.r J. Biomed. Sci.* 55, 199–203.

Janiszewski, M., Lopes, L.R., Carmo, A.O., Pedro, M.A., Brandes, R.P., Santos, C.X., Laurindo, F.R., 2005. Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 280, 40813-40819.

Khattab, M.M., 2006. TEMPOL, a membrane-permeable radical scavenger, attenuates peroxynitrite- and superoxide anion-enhanced carrageenan-induced paw

edema and hyperalgesia: A key role for superoxide anion. Eur. J. Pharmacol. 548, 167-173.

Kuo, M.L., Lee, K.C., Lin, J.K., Huang, T.S., 1995. Pronounced activation of protein kinase C, ornithine decarboxylase and c-jun proto-oncogene by paraquat-generated active oxygen species in WI-38 human lung cells. Biochim. Biophys. Acta. 1268, 229-236.

Lambeth, J.D., Krause, K.H., Clark, R.A., 2008. NOX enzymes as novel targets for drug development Semin. Immunopathol. 30,339–363

Laurindo, F.R., Fernandes, D.C., Amanso, A.M., Lopes, L.R., Santos, C.X., 2008. Novel Role of Protein Disulfide Isomerase in the Regulation of NADPH Oxidase Activity: Pathophysiological Implications in Vascular Diseases. Antioxid. Redox Signal. 10, 1101–1113.

Lim, S.Y., Raftery, M.J., Goyette, J., Geczy, C.L., 2010 S- Glutathionylation Regulates Inflammatory Activities of S100A9 J. Biol. Chem. CHEM. 285,14377-14388.

Lundqvist, H., Dahlgren, C., 1996. Isoluminol-enhanced chemiluminescence: a sensitive method to study the release of superoxide anion from human neutrophils. Free Rad. Biol. Med. 20, 785-792.

Margaritis, A., Priora, R., Frosali, S., DiGiuseppe, D., Summa, D., Coppo, L., DiStefano, A., DiSimplicio, P., 2010 The role of protein sulfhydryl groups and protein disulfides of the platelet surface in aggregation processes involving thiol exchange reactions. Pharmacol. Res. [doi:10.1016/j.phrs.2010.09.004](https://doi.org/10.1016/j.phrs.2010.09.004).

McCracken, A.A., Brodsky, J.L., 2005. Recognition and delivery of ERAD substrates to the proteasome and alternative paths for cell survival, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 300, 17–40.

Metcalf, J.A., Gallin, J.I., Nauseef, W.M., Root, R.K., 1986. Laboratory manual of neutrophil function. New York: Raven. 96-100.

Molinari, M., 2007. N-glycan structure dictates extension of protein folding or onset of disposal, *Nat. Chem. Biol.* 3, 313–320.

Noiva, R., 1999. Protein disulfide isomerase: the multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 10(5), 481-493.

Raturi, A., Mutus, B., 2007. Characterization of redox state and reductase activity of protein disulfide isomerase under different redox environments using a sensitive fluorescent assay. *Free Rad. Biol. Med.* 42, 62-70

Ruddock, L.W., Molinari, M., 2006. N-glycan processing in ER quality control, *J. Cell. Sci.* 119, 4373–4380.

Santos, C.X.C., Stolf, B.S., Takemoto, P.V.A., Amanso, A.M., Lopes, L.R., Souza, E.B., Goto, H., Laurindo, F.R.M., 2009. Protein disulfide isomerase (PDI) associates with NADPH oxidase and is required for phagocytosis of *Leishmania chagasi* promastigotes by macrophages. *J. Leukocyte Biol.* 86, 989-998.

Shimizu, Y., Hendershot, L.M., 2007. Organization of the functions and components of the endoplasmic reticulum, *Adv. Exp. Med. Biol.* 594,37–46.

Siems, W.C., Capuozzo, E., Verginelli, D., Salerno, C., Crifó, C., Grune, T., 1997. Inhibition of NADPH oxidase-mediated superoxide radical formation in PMA-stimulated human neutrophils by 4-hydroxynonenal-binding to –SH and -NH₂ groups, *Free Rad. Res.* 27, 353-358.

Sobolewski, C., Legrand, N., Morceau, F., Diederich, M., 2010. Inflammation: novel arrows for an ancient target. *Biochem. Pharmacol.* 80, 1769-1770.

Soule, B.P., Hyodo, F., Matsumoto, K., Simone, N.L., Cook, J.A., Krishna, M.C., Mitchell, J.B., 2007. The chemistry and biology of nitroxide compounds, *Free Rad. Bio. Med.* 42,1632-1650.

Teke, Z., Kabay, B., Ozden, A., Yenisey, C., Bir, F., Demirkan, N.C., Bicakci, T., Erdem, E., 2008. Effects of Tempol, a Membrane-Permeable Radical Scavenger, on Local and Remote Organ Injuries Caused by Intestinal Ischemia/Reperfusion in Rats. *J. Surg. Res.* 149, 259-271

Thaler, S., Fiedorowicz, M., Rejdak, R., Choragiewicz, T.J., Sulejczak, D., Stopa, P., Zarnowski, T., Zrenner, E., Grieb, P., Schuettauf, F., 2010. Neuroprotective effects of tempol on retinal ganglion cells in a partial optic nerve crush rat model with and without iron load. *Exp. Eye Res.* 90, 254-260.

Tsuhako, M.H., Augusto, O., Linares, E., Chadi, G., Giorgio, S., Pereira, C.A., 2010. Tempol ameliorates murine viral encephalomyelitis by preserving the blood–brain barrier, reducing viral load, and lessening inflammation *Free Rad. Bio. Med.* 48,704-712.

Wilkinson, B., Gilbert, H.F., 2004. Protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta.* 1699(1-2), 35-44.

Wilcox, C.S., Pearlman, A., 2008. Chemistry and Antihypertensive Effects of Tempol and Other Nitroxides. *Pharmacol. Rev.* 60, 418–469.

Zhang, Z., Rhinehart, K., Kwon, W., Weinman E., Pollone, T.L., 2004. ANG II signaling in vasa recta pericytes by PKC and reactivities oxygen species. *Am. J Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287,H773-H781.

Figure captions

Figure 1. Effect of Tempol and PDI known inhibitors on neutrophils Nox2 activity. Cells were incubated (37°C, 10 min) with Tempo, bacitracin (2mM) or DTNB (5 mM), and, after oxidase stimulation with PMA (100ng/10⁶ cells), oxygen consumption was polarographically monitored. Linear regression analysis between Tempol concentrations and oxygen consumption inhibition showed ED₅₀: 45 µg/10⁶ neutrophils. Results shown as mean±S.D. at least three independent experiments performed in triplicate. **p*<0.05, ***p*<0.001.

Figure 2. HPLC identification of E-GSH produced by cleavage of Di-E-GSSG by PDI (A) and standard curve for E-GSH quantification (B). A. Identification of E-GSH was performed through incubations of Di-E-GSSG (150 nM) with PDI (20 nM) on D-PBS-G buffer with DTT (5 μ M, 10 min, 37°C). HPLC analysis of reaction media displayed single fluorescent peak (retention time 16.48 minutes) identified as E-GSH. B. Standard plot designed for E-GSH quantification was performed monitoring fluorescence intensity ($\lambda_{exc}=521\text{nm}$, $\lambda_{emi}=542\text{nm}$) of E-GSH resulting from cleavage of Di-E-GSSG (5-300 nM) with PDI (20 nM) on D-PBS-G buffer with DTT (5 μ M).

Figure 3. Tempol (15 μ M) and bacitracin (2mM) action on the fluorescence emission due to PDI activity on neutrophil suspensions (10^6 cells/ml). Cells were maintained on resting state or triggered with PMA (100 ng/ 10^6 cells) after Tempol or bacitracin incubation (10 min, 37°C) and Di-E-GSSG (150 nM) added to verify neutrophil PDI activity. Di-E-GSSG cleavage by neutrophil PDI was monitored spectrofluorimetrically (λ_{exc} 521nm, λ_{emi} 542nm). Experimental samples: 1.Di-E-GSSG; 2.Di-E-GSSG + PMA; 3.Di-E-GSSG + cells; 4.Di-E-GSSG + cells + PMA; 5.Di-E-GSSG + cells + Bacitracin + PMA; 6. Di-E-GSSG + cells + Tempol + PMA. Results shown as mean \pm S.D. at least three independent experiments performed in triplicate. * $p<0.05$ vs Di-E-GSSG; ** $p<0.001$ vs Di-E-GSSG + cells; *** $p<0.001$ vs Di-E-GSSG + cells + PMA.

Figure 4. Fluorescent detection of reductase PDI activity on inflammatory neutrophils. Profile of fluorescence emission of dormant or triggered cells (100 ng PMA/ 10^6 cells)

was determined using λ_{exc} 521nm, λ_{emi} 542nm to detected E-GSH production by PDI founds in phagocytes. Di-E-GSSG (150 nM) was used as a pseudo-substrate. Effect of different added concentrations of Tempol before cellular stimulation on PDI activity are shown. Results shown are representative of at least three separate experiments.

Figure 5. Synchrony on Nox2 and PDI activities inhibition by Tempol. Different amounts of Tempol were added to neutrophils (10^6 cells) and E-GSH production was determined in cellular suspensions (λ_{exc} 521nm, λ_{emi} 542nm). Parallel neutrophil burst inhibition achieved with identical Tempol doses, monitored through oxygen consumption, is shown. Values represent the mean \pm S.D. of three separate experiments conducted in triplicate.

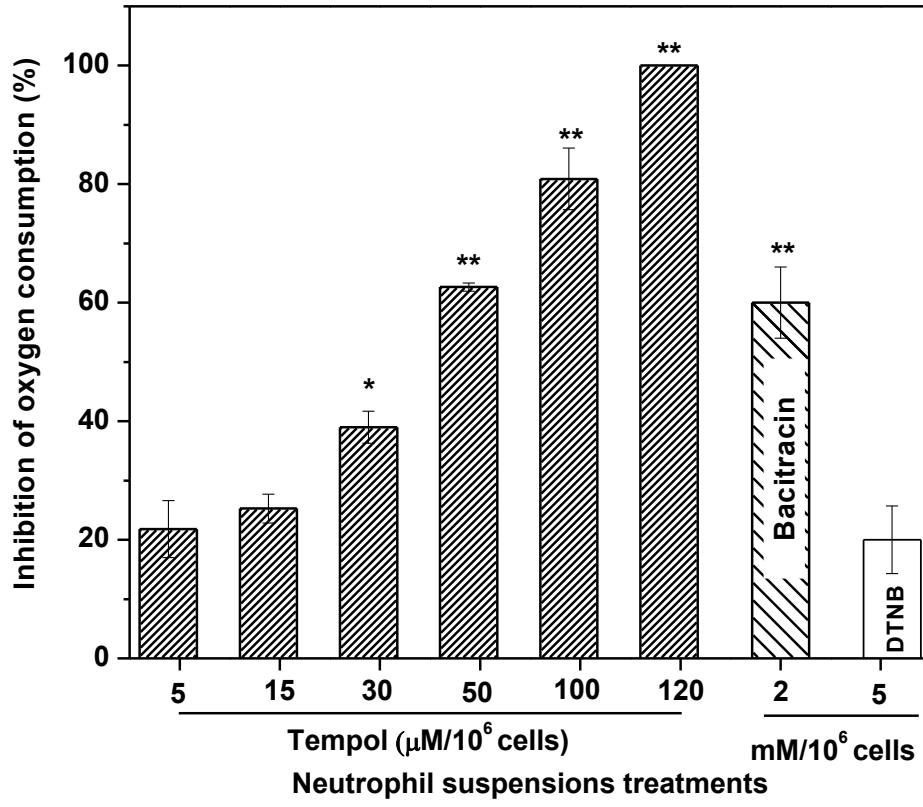


Figure 1.

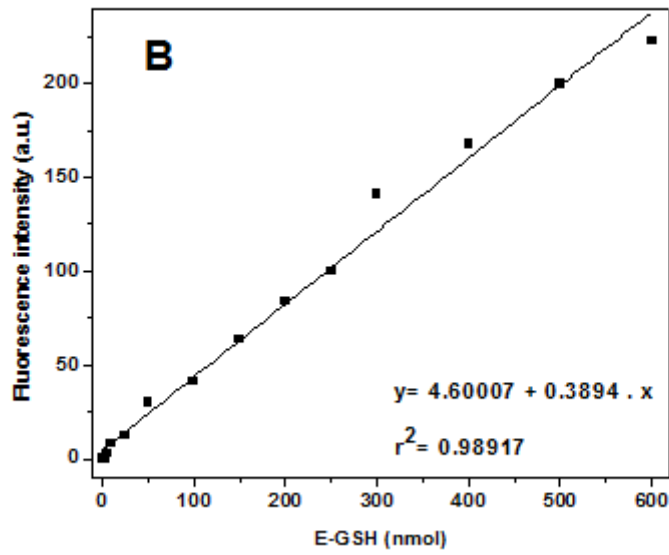
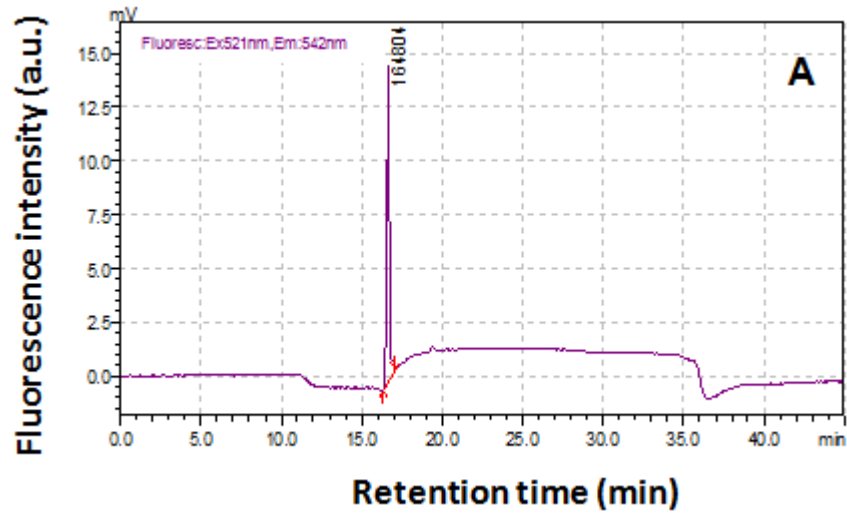


Figure 2.

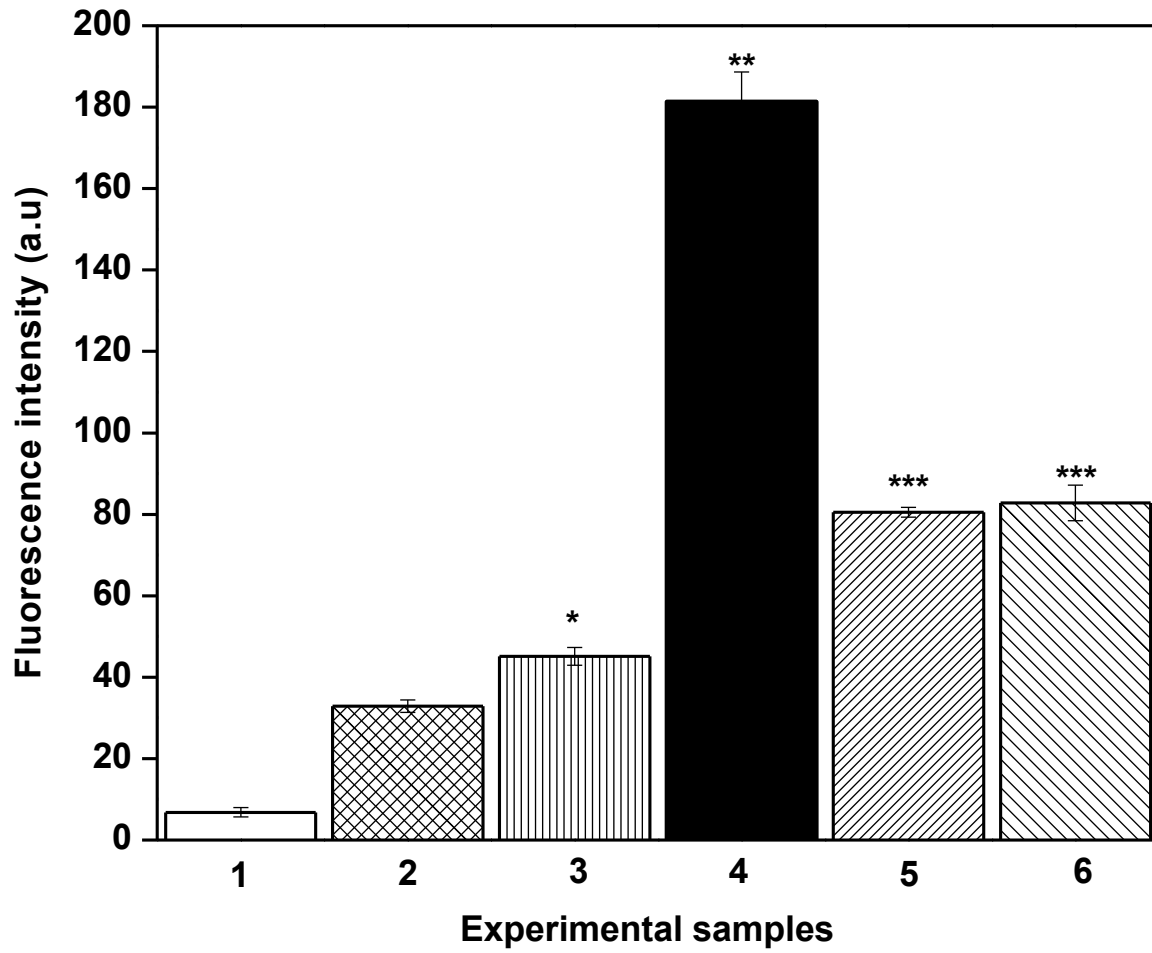


Figure 3.

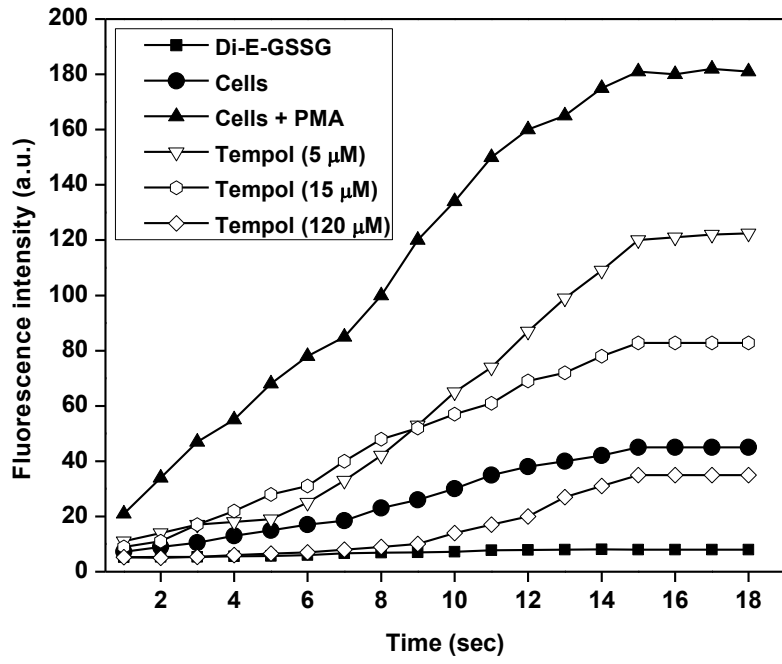


Figure 4.

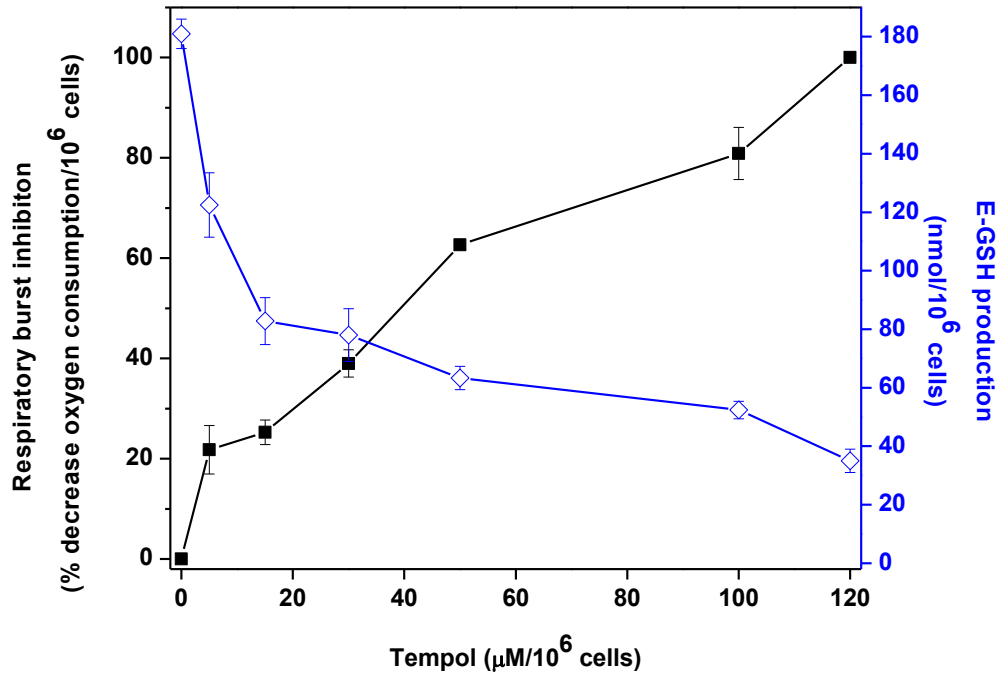


Figure 5.

Table 1. Bacitracin (2 mM) and DTNB (5 mM) effect on the superoxide anion release and luminol-dependent chemiluminescence of inflammatory neutrophils. Phagocytes were incubated (37°C, 10 min) with PDI known inhibitors following Nox2 activation with PMA (100ng/10⁶ cells). Controls were performed with cellular treatment with vehicle alone.

Neutrophil treatment	O ₂ ^{•-} release (nmol/min/10 ⁶ neutrophils)	Chemiluminescence intensity (arbitrary unit)
None	6.6±0.41	181±10.97
Bacitracin	2.6±0.24 ^a	109±5.30 ^a
DTNB	5.1±0.90 ^b	145±13.48 ^b

Results are expressed as mean±S.D. from three experiments each one performed in triplicate.

Statistical test was performed between controls (none addition) and experimental samples.

^a= $p < 0.001$; ^b= $p < 0.05$.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia celular e molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier, 2005.
- AGGARWAL, B. B.; VIJAYALEKSHMI, R. V.; SUNG, B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe. **Clin. Cancer Res.**, v. 15, p.425–430, 2009.
- APPENZELLER-HERZOG, C. et al. A novel disulphide switch mechanism in Ero1alpha balances ER oxidation in human cells. **EMBO J.**, v. 27, p. 2977-2987, 2008.
- ARONOVITCH, Y. et al. Dual activity of nitroxídeos as pro- and antioxidants: Catalysis of copper-mediated DNA breakage and H₂O₂ dismutation. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 42, p. 1317-1325, 2007.
- BABIOR, B.M. The respiratory burst oxidase. **Adv. Enzymol.**, v. 65, p. 49-95, 1992.
- BABIOR, B.M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, v. 93, p. 1464-1476, 1999.
- BABIOR, B.M. Phagocytes and oxidative stress. **Am. J. Med.**, v. 109, p. 33-44, 2000.
- BABIOR, B.M. NADPH oxidase. **Current Opinion in Immunology**, v. 16, p. 42-47, 2004.
- BALDRIDGE, C.W.; GERARD, R.W. The extra respiration of phagocytosis. **Am. J. Physiol.**, v. 103 p.235-236, 2000.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p.113-123, 2006.
- BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista Nutrição**, v. 12, p. 123-130, 1999.
- BLANCK, J. et al. Cytochrome P-450 spin state and leakiness of the monooxygenase pathway. **Xenobiotica**, v. 21, p.121– 135, 1991.
- BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia Geral**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- BRIGAGÃO M.R.P.L., COLEPICOLO P. Oscillations in superoxide anion release by polymorphonuclear leukocytes and its inhibition by human saliva. **Biol. Rhythm. Res.**, v. 27, p. 269-280, 1996.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

HAMPTON, M.B.; KETLE, A.J.; WINTERBOURN, C.C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood**, v. 92, p. 3007-3017, 1998.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SAMUNI, A. M.; BARENHOLZ, Y.; SAMUNI, A. Site-activity relationship of nitroxide radical's antioxidative effect. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 34, p.117-185, 2003.

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

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

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

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

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

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

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

TEAHAN, C. et al. The X-linked chronic granulomatous disease gene codes for the β -chain of cytochrome b_{245} . **Nature**, v. 327, p. 720-721, 1987.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

APÊNDICE A - Carta de submissão do artigo científico

December 09, 2010

A. Urtti, Ph.D.
Centre for Drug Research
University of Helsinki
P.O. Box 56
Viikinkaari 5 E
FIN-00014
Helsinki
Finland

Dear Editor;

I am sending copy of a manuscript that I wish to submit for publication in European Journal of Pharmaceutical Sciences as a research article. This is entitled *Tempol down regulates protein disulfide isomerase activity associated to phagocytic NADPH oxidase*, and is authored by Gésika B. Santos, Altamir F. Oliveira, Samuel N. P. Lima, Ana C. G. Ribeiro and Maísa R. P. L. Brigagão, affiliate to Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, Brazil.

A new regulation of inflammatory leukocyte NADPH oxidase complex is suggested from the piperidine nitroxide Tempol action over that. During cell activation, different amounts of this nitroxide induced, in a dose-response manner, changes in the protein disulfide isomerase reductase activity, inhibiting in parallel the oxidase activity.

This material has not been published and it is not under consideration elsewhere. It has been read and approved by all authors.

I will be looking forward to hearing from you.

Sincerely,

Prof. Dr. Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão
Associate Professor
Instituto de Ciências Exatas
Universidade Federal de Alfenas
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 – Centro
37130-000 Alfenas – MG
Brazil
Phone (+55-35) 3299-1262
Fax (+55-35) 3299-1384
E-mail maisaunifal@gmail.com

APÊNDICE B - Resumo gráfico do artigo submetido

