

**Universidade Federal de Alfenas**  
**Programa de Pós-graduação em Química**

**ALTAMIR FERNANDES DE OLIVEIRA**

**ESTUDO CINÉTICO DA PROTEÍNA DISSULFETO  
ISOMERASE: NITRÓXIDOS COMO REGULADORES  
DA ATIVIDADE CATALÍTICA**

**Alfenas/MG**  
**2010**

**ALTAMIR FERNANDES DE OLIVEIRA**

**ESTUDO CINÉTICO DA PROTEÍNA DISSULFETO  
ISOMERASE: NITRÓXIDOS COMO REGULADORES  
DA ATIVIDADE CATALÍTICA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Físico-Química.  
Orientadora: Profa. Dra. Maísa Ribeiro Lima Pereira Brigagão

**Alfenas/MG  
2010**

**ALTAMIR FERNANDES DE OLIVEIRA**

**ESTUDO CINÉTICO DA PROTEÍNA DISSULFETO  
ISOMERASE: NITRÓXIDOS COMO REGULADORES  
DA ATIVIDADE CATALÍTICA**

A Banca examinadora, abaixo-assinada, aprova a  
Dissertação apresentada como parte dos requisitos  
para a obtenção do título de Mestre em Química  
pela Universidade Federal de Alfenas. Área de  
Concentração: Físico-Química.

Aprovada em: 7/12/2010

Prof. (a): Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

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

Prof. (a): Lázaro Moscardini D'Assunção  
Instituição: Universidade de Lavras

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

Prof. (a): Fábio Herbst Florenzano  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

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

À Infinita Inteligência que tudo criou e tudo rege.  
Aos meus pais (Antônio de Oliveira e Maria Salomé Fernandes) e irmãos (Altair, Mirian, Alcir, Adoir, Ademir e Almir) pela compreensão nas ausências familiares devidas à dedicação ao curso.  
Àqueles da Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG), empresa que trabalho, os quais me deram total apoio sempre que necessitei.  
À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão, referência incomparável, pela responsabilidade, atenção, boa vontade e compreensão em todos os obstáculos por que passei. Enfim, a todos que acreditaram (ou não), no potencial demonstrado e trabalho realizado...

## RESUMO

A Proteína Dissulfeto Isomerase (PDI, E.C. 5.3.4.1), pertencente à superfamília das tiorredoxinas, é uma tiol oxidoredutase que catalisa a oxidação e redução de tióis e a isomerização de dissulfetos intramoleculares. Essa chaperona tem atividade dependente de cisteínas presentes nos sítios ativos, e está presente no retículo endoplasmático (RE) e/ou na membrana plasmática de células eucarióticas. Estudos anteriores da atividade catalítica de PDI foram realizados utilizando-se como pseudo-substratos, entre eles, a di-eosina-glutationa oxidada (Di-E-GSSG), que se mostrou ótima ferramenta para o monitoramento da atividade de dissulfeto redutase da PDI. Nesse trabalho, a síntese e purificação cromatográfica de Di-E-GSSG foram realizadas e a pureza da sonda foi verificada através de cromatografia líquida de alta performance (CLAE). A cinética enzimática da atividade redutase de PDI isolada recombinante sobre Di-E-GSSG foi estudada, caracterizando-se os principais parâmetros físico-químicos da enzima através da formação do monômero fluorescente ( $\lambda_{exc}=521\text{nm}$ ;  $\lambda_{emi}=542\text{ nm}$ ) eosina-glutationa reduzida (E-GSH). O valor da constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) encontrado foi de  $520,5\pm 129,8\text{ nM}$ , a velocidade máxima de catálise ( $V_{m\acute{a}x}$ ) foi determinada como  $1,637\pm 0,1526\text{ nM}\cdot\text{min}^{-1}$  e a constante catalítica ( $K_{cat}$ ) encontrada foi  $1,364 \cdot 10^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$ . São relatados na literatura poucos compostos químicos capazes de inibir a atividade catalítica da PDI. Assim, para verificar se compostos radicalares estáveis desempenham essa atividade, foram testados nitróxidos piperidínicos como possíveis inibidores de PDI. Esses compostos, que possuem propriedades antioxidantes, antiinflamatórias e radioprotetoras, apresentam efeito “*scavenger*” sobre diferentes espécies radicalares, dentre as quais, radicais tiila. O nitróxido 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil (Tempol) mostrou-se um inibidor pouco potente da atividade redutase da enzima. Entretanto, três outros nitróxidos, sintetizados especificamente para este trabalho, demonstraram maior poder de inibição, com uma correlação direta com o aumento de hidrofobicidade das estruturas químicas dos mesmos. Essa capacidade de inibição foi confirmada sobre a atividade de PDI presente em plaquetas humanas, corroborando a hipótese de que os nitróxidos são candidatos a novos fármacos moduladores de funções celulares onde esteja envolvida a atividade de PDI.

Palavras-chave: Proteína dissulfeto isomerase; nitróxidos; sondas fluorescentes.

## ABSTRACT

Protein disulfide isomerase (PDI, EC 5.3.4.1) belonging to the thioredoxin superfamily, is a thiol oxidoreductase that catalyzes the oxidation and reduction of thiols and intramolecular disulfide isomerization. This chaperone, such activity is dependent of cysteine located on the active sites, is present in the endoplasmic reticulum (ER) and / or plasma membrane of eukaryotic cells. Previous studies of the catalytic activity of PDI were performed using different pseudo-substrates, among them, the di-eosin-glutathione disulfide (Di-E-GSSG), described as a usefull tool for monitoring the disulfide reductase activity of PDI . In this work, the synthesis and chromatographic purification of Di-E-GSSG were performed and the purity of the probe was verified by high performance liquid chromatography (HPLC). The enzyme kinetics of the reductase activity of recombinant PDI isolated over Di-E-GSSG was studied, characterizing the main physicochemical parameters of the enzyme through the formation of the fluorescent monomer ( $\lambda_{exc}=521\text{nm}$ ;  $\lambda_{emi}=542\text{nm}$ ) eosin-reduced glutathione (E-GSH). The value of the Michaelis-Menten constant ( $K_m$ ) was found to be  $520.5 \pm 129.8 \text{ nM}$ , the maximum velocity of catalysis ( $V_{max}$ ) was determined as  $1,637 \pm 0.1526 \text{ nM}\cdot\text{min}^{-1}$  and the catalytic constant ( $K_{cat}$ ) found was  $1.364 \cdot 10^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$ . Few chemical compounds able to inhibit catalytic activity of PDI were reported. Thus, to verify if stable free radical compounds display this activity were tested piperidine nitroxides as potential inhibitors of PDI. These compounds, which have antioxidant, anti-inflammatory and radioprotective properties are “scavengers” of different radical species, among them, thyl radicals. The nitroxide 4-hydroxy-2,2,6,6-tetrametilpiperidine-1-oxyl (Tempol) was a weak inhibitor of PDI reductase activity. However, three other nitroxides specifically synthesized for this study showed higher inhibition power, with a direct correlation between increasing the hydrophobicity of the chemical structures and inhibitory action. This ability was confirmed by assays with PDI found in human platelets, confirming the hypothesis that the nitroxides are candidates for new drugs to modulate cellular functions involving the PDI activity.

Keywords: Protein disulfide isomerase; nitroxides; fluorescent probes.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 01- Radiação eletromagnética plano-polarizada de comprimento de onda  $\lambda$  propagando-se ao longo do eixo x. O campo magnético está representado por B e o campo elétrico por E. (Adaptado de: <http://likeaphysicists.blogspot.com/>. Acesso em 2/11/10 às 12h17)..... 18
- Figura 02- Composição do espectro eletromagnético e suas regiões. (Adaptado de: Dan Scientia – [http://dan-scientia.blogspot.com/2010\\_03\\_01\\_archive.html](http://dan-scientia.blogspot.com/2010_03_01_archive.html). Acesso em 2/11/10 às 12h17) ..... 19
- Figura 03- Diagrama de níveis de energia para o átomo de hidrogênio. (Adaptado de Castellan, 1983)..... 20
- Figura 04- Diagrama de Jablonski ilustrando o processo envolvido na criação de um estado excitado eletrônico singlete por absorção ótica e subsequente emissão de fluorescência (Adaptado de [www.probes.com](http://www.probes.com), consultado em 20/5/2009, às 21h). 23
- Figura 05- Excitação de um fluoróforo em três diferentes comprimentos de onda (EX 1, EX 2, EX 3) não muda o perfil de emissão, mas produz variações na intensidade da emissão fluorescente (EM 1, EM 2, EM 3) que corresponde à amplitude do espectro de excitação. (Adaptado de [www.probes.com](http://www.probes.com), consultado em 20/5/2009, às 21h)..... 25
- Figura 06- Equipamento básico de CLAE. a) reservatório da fase móvel; b) bomba de alta pressão; c) válvula de injeção; d) coluna; e) detector e f) registrador. (Adaptado de Degani et al.,1998)..... 27
- Figura 07- Organização molecular dos domínios da PDI em sua forma tridimensional. Domínios da família da tiorredoxina são mostrados nas letras em roxo (domínios catalíticos – a e a') e em verde (domínios não-catalíticos – b e b'). As cisteínas dos sítios ativos estão representadas como esferas roxas. (Adaptado de Appenzeller Herzog et al., 2008). A numeração da sequência de aminoácidos refere-se a uma isoforma enzimática de tecidos de ratos, segundo Darby et al., 1998..... 32
- Figura 08- Esquema ilustrativo da atividade da PDI (em verde) como chaperona molecular,

	onde a cadeia polipeptídica nascente (esquerda, em azul) se enovela, atingindo a conformação correta (direita), através do reposicionamento de pontes dissulfeto intra-moleculares. Adaptado de <a href="http://www.bch.msu.edu/faculty">www.bch.msu.edu/faculty</a> , consultado em 18/abril/2010, 10h50.....	33
Figura 09-	Atividade catalítica na formação ou rompimento (acima) e na isomerização (abaixo) de pontes dissulfeto intra-moleculares catalisadas por PDI (adaptado de Wilkinson & Gilbert, 2004).....	34
Figura 10-	Estrutura da Ero1 de levedura e seu mecanismo catalítico. (Adaptado de Kaiser et al., 2008). Na primeira figura as cadeias laterais com cisteínas são representadas em esferas verde e amarelas. O co-fator FAD está representado como estruturas químicas tipo “varetas” laranjas. O domínio polipeptídico (resíduos 90-175) contendo o par de cisteínas “de troca” está representado pela cadeia de cor vermelha. Nota-se os dois dissulfetos regulatórios que contém uma cisteína na região vermelha (Cys90 e Cys150) e uma cisteína no núcleo helicoidal (Cys295 e Cys349).....	36
Figura 11-	Gráfico de Michaelis-Menten mostrando o $K_m$ e a $V_{máx}$ .....	39
Figura 12-	Gráfico de Lineweaver-Burke.....	40
Figura 13-	Estrutura química básica dos nitróxidos cíclicos. (1) pertence ao grupo dos nitróxidos piperidina, cujo anel possui seis membros. Já (2) integra o grupo de nitróxidos pirrolidina, pirrolina ou oxazolidina, cujo anel é formado por cinco membros. Ressalta-se a existência de diferentes grupos substituintes (R), os quais podem conferir propriedades distintas a esses compostos. Adaptado de Hahn et al., 1994; Soule et al., 2007.....	42
Figura 14-	Reação de redução e oxidação de nitróxidos piperidina. Formação de hidroxilaminas e cátions oxoamônio. Adaptado de Israeli et al., 2005.....	43
Figura 15-	Estruturas químicas dos nitróxidos. A) 4-hidróxi-2,2,6,6-tetrametil-1-piperidine-1-oxil (Tempol); B) 1-Piperidiniloxi, 2,2,6,6-tetrametil-4-[(fenilsulfonil)oxil] (Redoxoma 4); C) 2,2,6,6-tetrametil-4-(4-ciclohexene-1H-1,2,3-triazol-1-il)piperidine-1-oxil (Redoxoma 9) e D) 1-(2,2,6,6-tetrametilpiperidín-4-oxil)-1H-nafto[2,3-d][1,2,3]triazol-4,9-diona (Redoxoma 10).....	52
Figura 16-	Esquema de reação de grupos N-terminais de peptídeos com grupos	

	isotiocinato.....	53
Figura 17-	Estruturas químicas dos compostos utilizados na síntese da sonda Di-E-GSSG. A) Glutationa oxidada ( $C_{20}H_{32}N_6O_{12}S_2$ ; MM: 612,63) e B) Eosina 5-isotiocianato ( $C_{21}H_7Br_4NO_5S$ ; MM: 704,96; $\lambda_{exc}=521$ nm; $\lambda_{emi}=542$ nm em água).....	54
Figura 18-	Degradação de Edman mostrando a sequência de reação que é análoga àquela entre a eosina isotiocianato e a glutaciona oxidada para a síntese da sonda Di-E-GSSG.....	54
Figura 19-	Proposta de reação de síntese e de redução da sonda Di-eosina-5-isotiocianato-GSSG, originando o composto fluorescente eosina-5-isotiocianato-GSH após redução.....	55
Figura 20-	Resultado da cromatografia da sonda Di-E-GSSG em Sephadex G-25, tampão fosfato 0,1M, pH 7,0. Gráfico sobreposto: densidade óptica da sonda Di-E-GSSG após 72h em temperatura ambiente mostrando o mesmo padrão de eluição do composto.....	60
Figura 21-	Leitura feita pelo espectrofluorímetro para construção da reta de calibração.....	61
Figura 22-	Reta de calibração obtida pela determinação de [E-GSH], nM e intensidade de fluorescência (u, 542 nm) feita pelo espectrofluorímetro.....	62
Figura 23-	Formação de E-GSH com a ação do DTT sobre a Di-E-GSSG através da variação de emissão de fluorescência observado no gráfico sobreposto com a emissão de fluorescência a 542 nm em cada tratamento realizado. A) Sonda Di-E-GSSG a 150nM sem adição de DTT, B) Sonda Di-E-GSSG a 150nM com DTT a 150 $\mu$ M (Tempo zero), C) Sonda Di-E-GSSG a 150nM com DTT a 150 $\mu$ M (Tempo 5 minutos), D) Sonda Di-E-GSSG a 150nM com DTT a 150 $\mu$ M (Tempo 15 minutos), E) Sonda Di-E-GSSG a 150nM com DTT a 150 $\mu$ M (Tempo 60 minutos) e F) Sonda Di-E-GSSG a 150nM com DTT a 0,5mM (Tempo 0 minutos).....	63
Figura 24-	Velocidade de formação de E-GSH no intervalo de tempo entre 0 e 10 minutos no tratamento da Di-E-GSSG a 150 nM na presença de DTT a 150 $\mu$ M. O gráfico sobreposto são os resultados da velocidade basal de formação de E-GSH quando	

	a Di-E-GSSG é incubada na ausência de DTT no intervalo de 0 a 10 minutos.....	64
Figura 25-	Velocidade de formação de E-GSH no intervalo de tempo entre 0 e 10 minutos no tratamento da Di-E-GSSG a 150 nM na presença de DTT a 0,5 mM. Os gráficos sobrepostos são os resultados da velocidade basal de formação de E-GSH quando a Di-E-GSSG é incubada na ausência de DTT no intervalo de 0 a 10 minutos e os resultados da velocidade da Di-E-GSSG a 150 nM na presença de DTT a 150µM no intervalo de 0 a 10 minutos.....	65
Figura 26-	Cinética da ação do DTT na redução da sonda Di-E-GSSG. Gráfico obtido diretamente do espectrofluorímetro mostrando a inclinação positiva da reta nos intervalos de tempo analisados.....	66
Figura 27-	Espectro de fluorescência do DTT, GSSG e GSH respectivamente, mostrando ausência de sinal de emissão de fluorescência a 542 nm ( $\lambda_{exc}=521$ nm).....	66
Figura 28-	A) Cromatograma típico obtido por CLAE de E-GSH ( $\lambda_{exc}=521$ nm; $\lambda_{emi}=542$ nm) e B) Espectro obtido em DAD.....	67
Figura 29-	Formação de E-GSH, nM. A) Di-E-GSSG com DTT a 5µM na ausência de PDI (0,23±0,07), B) Di-E-GSSG com DTT a 5µM na presença de PDI a 5nM (3,89±0,60), C) Di-E-GSSG com DTT a 5µM na presença de PDI a 20nM (4,38±1,18), D) Di-E-GSSG com DTT a 5µM na presença de PDI a 40nM (5,73±0,35) e E) Di-E-GSSG com DTT a 5µM na presença de PDI a 160nM (6,06±0,53).....	68
Figura 30-	Relação entre [PDI] (nM) e [E-GSH] (nM/ng de PDI), mostrando a atividade catalítica redutase da PDI sobre o substrato (Di-E-GSSG).....	70
Figura 31-	[PDI], nM x E-GSH, nM.min <sup>-1</sup> , mostrando a saturação da enzima. R <sup>2</sup> =91,66.....	71
Figura 32-	Gráfico de Michaelis-Menten. Estimativa de $K_m$ e $V_{máx}$ : PDI a 20 nM incubada variando-se as concentrações de Di-E-GSSG (50nM – 1200nM) em tampão fosfato de potássio 0,1M (pH 7) e 2mM de EDTA. Taxas iniciais de formação de E-GSH foram monitoradas como uma função de [Di-E-GSSG]. Curva teórica hiperbólica foi plotada com valor de $K_m$ de 520,5±129,8 nM e $V_{máx}$ de 1,637±0,1526 nM.min <sup>-1</sup> . R <sup>2</sup> =96,50.....	72

Figura 33-	Gráfico de Lineweaver-Burke. Estimativa de $K_m$ e $V_{m\acute{a}x}$ pelos valores duplos recíprocos de [Di-E-GSSG] e [E-GSH] . min-1. $R^2=94,80$ . Valor de $p=0,005$ . Significativo.....	73
Figura 34-	Formação de E-GSH, nM pela clivagem de Di-E-GSSG a 150 nM na ausência [■] ou presença [●] de plaquetas ( $4.10^7 \text{ mL}^{-1}$ ) e DTT a $5\mu\text{M}$ .....	77
Figura 35-	Velocidades obtidas a partir dos tratamentos cinéticos da Di-E-GSSG a 150nM na presença de DTT a $5\mu\text{M}$ com plaquetas (psPDI) na concentração final de $4.10^7\text{mL}^{-1}$ e inibidores a 0,34mM.....	78

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01-	Formação de E-GSH com a ação do DTT sobre a E-GSH através da variação de fluorescência obtida em varredura espectrofluorimétrica em diferentes tempos de tratamentos realizados.....	59
Tabela 02-	Parâmetros molares quando do tratamento da sonda Di-E-GSSG a 150nM, com DTT a 5 $\mu$ M e PDI a diferentes concentrações.....	70
Tabela 03-	Valores da [E-GSH], nM e $K_{eq}$ , Di-E-GSSG a diferentes concentrações.....	72
Tabela 04-	Inibição catalítica baseada nas velocidades de reação quando a Di-E-GSSG a 150 nM é tratada com PDI a 20 nM e incubada com diferentes nitróxidos a diferentes concentrações. n=3.....	75
Tabela 05-	Inibição catalítica quando a Di-E-GSSG a 75, 150, 300 e 600 nM é tratada com PDI a 20 nM e incubada com diferentes nitróxidos a 50nM.....	76
Tabela 06-	Formação de E-GSH, nM ex vivo ao tratar a Di-E-GSSG a 150 nM com plaquetas ( $4.10^7\text{mL}^{-1}$ ) e DTT a 5 $\mu$ M.....	77
Tabela 07-	Tratamentos cinéticos da Di-E-GSSG a 150nM na presença de DTT a 5 $\mu$ M e plaquetas na concentração final de $4.10^7\text{mL}^{-1}$ . Inibidores a 0,34mM foram adicionados à solução e um ensaio cinético foi realizado no espectrofluorímetro entre 0 e 30 minutos obtendo-se os valores de velocidade de formação de E-GSH.....	78

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	-	Absorbância
CAT	-	Enzima catalase
CLAE	-	Cromatografia líquida de alta eficiência
DAD	-	Análise em arranjos de diodos
Di-E-GSSG	-	Di-eosina glutationa dissulfeto
DMF	-	Dimetilformamida
DTNB	-	ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico)
DTT	-	Di-tio-treitol
E-GSH	-	Eosina glutationa
EITC	-	Eosina isotiocianato
EPR	-	Ressonância eletrônica paramagnética
ER/RE	-	Retículo endoplasmático
ERAD	-	Degradação associada ao retículo endoplasmático
ERN	-	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	-	Espécies reativas de oxigênio
FSQ	-	Fluorescent Self Quenching
g	-	Gram
GSH	-	Glutationa reduzida
GSSG	-	Glutationa oxidada
$K_{cat}$	-	Constante catalítica
$K_{eq}$	-	Constante de equilíbrio
$K_m$	-	Constante de Michaelis-Menten
L	-	Litro
mL	-	Mililitro
ng	-	Nanograma
nm	-	Nanômetro
PDI	-	Proteína Dissulfeto Isomerase
PKC	-	Proteína quinase C

- Rnase - Ribonuclease A
- SOD - Superóxido dismutase
- Uv/Vis - Ultravioleta visível
- $V_{máx}$  - Velocidade máxima
- $\lambda$  - Comprimento de onda

## SUMÁRIO

	<b>RESUMO</b>	5
	<b>ABSTRACT</b>	6
	<b>LISTA DE FIGURAS</b>	7
	<b>LISTA DE TABELAS</b>	12
	<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b>	13
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	17
<b>2</b>	<b>SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA</b>	17
<b>2.1</b>	<b>A radiação eletromagnética e suas interações</b>	17
2.1.1	<i>Absorção de luz</i>	19
2.1.2	<i>Absorção de Luz: Lei de Lambert-Beer</i>	21
2.1.3	<i>Espalhamento Rayleigh e Raman</i>	22
<b>2.2</b>	<b>Princípios de espectrofluorescência</b>	23
<b>2.3</b>	<b>Princípios de espectrofluorimetria acoplada à cromatografia</b>	26
<b>2.4</b>	<b>Química dos radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio</b>	28
<b>2.5</b>	<b>Proteína Dissulfeto Isomerase</b>	30
2.5.1	<i>Propriedades catalíticas da PDI</i>	35
<b>2.6</b>	<b>Cinética e inibidores enzimáticos</b>	37
<b>2.7</b>	<b>Nitróxidos</b>	42
2.7.1	<i>Possíveis aplicações clínicas, riscos e perspectivas em relação ao uso de nitróxidos</i>	46
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	49
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b>	49
<b>5</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	49
<b>5.1</b>	<b>Instrumentação e acessórios</b>	49
<b>5.2</b>	<b>Reagentes</b>	50
5.2.1	<i>Nitróxidos utilizados nos experimentos</i>	51
<b>5.3</b>	<b>Metodologia</b>	52
5.3.1	<i>Síntese e estudo da sonda Di-E-GSSG</i>	53
5.3.2	<i>Síntese e estudo da sonda E-GSH</i>	56
5.3.3	<i>Verificação da estabilidade química das sondas fluorescentes</i>	56
5.3.4	<i>Testes cinéticos das sondas fluorescentes</i>	57
5.3.5	<i>Efeito de nitróxidos sobre a catálise de PDI</i>	57
5.3.6	<i>Análises estatísticas</i>	58
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	58
<b>6.1</b>	<b>Síntese da sonda E-GSH</b>	58
<b>6.2</b>	<b>Tratamento da sonda E-GSH com DTT em diferentes intervalos de tempo</b>	59
<b>6.3</b>	<b>Síntese da sonda Di-E-GSSG</b>	60
<b>6.4</b>	<b>Quantificação de fluorescência emitida a 542nm pela clivagem da sonda Di-E-GSSG</b>	61
<b>6.5</b>	<b>Tratamento da sonda Di-E-GSSG com DTT em diferentes intervalos de tempo</b>	62

<b>6.6</b>	<b>Análise por CLAE da sonda sintetizada após redução com DTT.....</b>	<b>67</b>
<b>6.7</b>	<b>Efeito da atividade da PDI sobre a sonda Di-E-GSSG.....</b>	<b>68</b>
<b>6.8</b>	<b>Cinética da redução da Di-E-GSSG pela PDI.....</b>	<b>69</b>
<i>6.8.1</i>	<i>Tratamento da Di-E-GSSG a 150nM com DTT a 5µM e PDI a diferentes concentrações.....</i>	<i>69</i>
<i>6.8.2</i>	<i>Variação da concentração da Di-E-GSSG e PDI fixa a 20nM.....</i>	<i>71</i>
<b>6.9</b>	<b>Modulação de nitróxidos sobre a atividade da PDI.....</b>	<b>75</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>81</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>82</b>

## **1 INTRODUÇÃO**

A possibilidade de manter a homeostasia do organismo, especialmente nas alterações envolvidas em processos patológicos, é um desafio, uma vez que estudos nesta área implicam compreensão de respostas celulares ao nível molecular, planejamento de experimentos sob estrito controle, e, sobretudo, esbarra em um volume de informações técnicas crescentes, praticamente impossíveis de serem devidamente acompanhadas na mesma velocidade em que são produzidas e relatadas na literatura técnica.

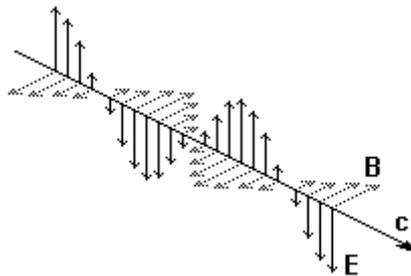
Esse processo envolve, necessariamente, o conhecimento aprofundado de enzimas que exercem regulação sobre diferentes eventos bioquímicos. Para aprimorar o conhecimento da cinética de biomoléculas, torna-se necessária a investigação de parâmetros que são característicos de tais compostos, seja por meio de seu tratamento com reagentes específicos que atuam como inibidores, moduladores e/ou ativadores, seja através de sua caracterização estrutural e/ou funcional através de métodos cromatográficos, espectrofotométricos ou espectrofluorimétricos.

No presente trabalho foi explorada a funcionalidade de uma enzima, a chaperona proteína dissulfeto isomerase (PDI), pertencente à classe das tiol/dissulfeto oxidoredutases envolvidas em diferentes processos fisiológicos e cuja expressão e atividade catalítica encontram-se alteradas em várias ocorrências patológicas. Um dos desafios no estudo dessa enzima é a existência de poucos métodos de ensaio de sua atividade catalítica, os quais sejam padronizados, sensíveis, precisos e reprodutíveis. Para tanto, foi sintetizada a sonda di-eosina-glutationa dissulfeto (Di-E-GSSG) que foi testada como pseudo-substrato para os ensaios de catálise redutase da PDI através da formação do monômero fluorescente eosina-glutationa reduzida (E-GSH). A análise de parâmetros físico-químicos da cinética constitui-se o ponto central para a proposição de novos compostos moduladores da atividade redutase dessa enzima.

## **2 SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 A radiação eletromagnética e suas interações**

Os termos partículas e ondas são utilizados para definir o conceito de luz, pois a mesma possui comportamento dual. As ondas luminosas são campos magnéticos e elétricos que oscilam e são perpendicularmente orientados (Figura 1).

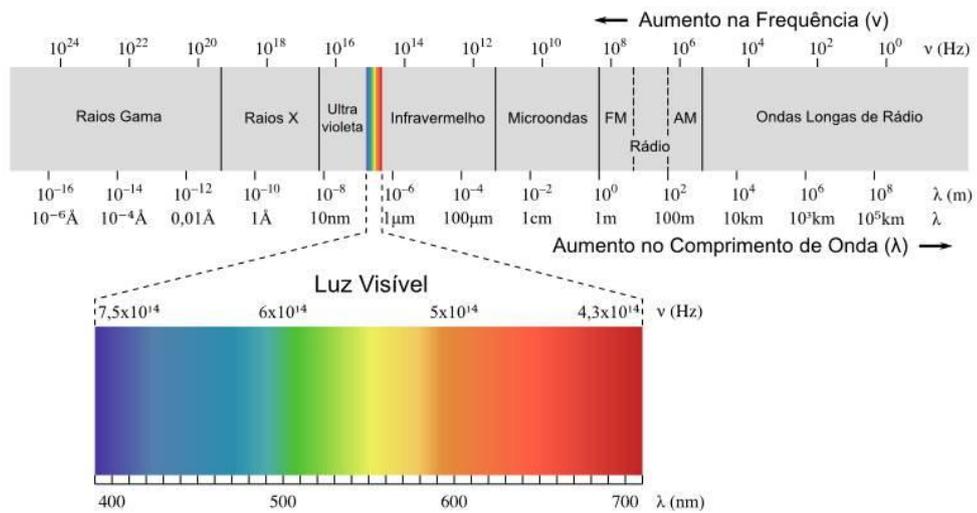


**Figura 1.** Radiação eletromagnética plano-polarizada de comprimento de onda  $\lambda$  propagando-se ao longo do eixo x. O campo magnético está representado por B e o campo elétrico por E. (Adaptado de: <http://likeaphysicists.blogspot.com/>. Acesso em 2/11/10 às 12h17)

O comprimento de onda  $\lambda$  é a distância entre dois pontos em concordância de fase. A frequência,  $\nu$ , é o número de oscilações completas que a onda faz a cada segundo. A unidade de frequência é o segundo recíproco,  $s^{-1}$ . Uma oscilação por segundo também é chamada de um hertz (Hz). Portanto uma frequência de  $10^6 s^{-1}$  corresponde a  $10^6$  Hz, ou um megahertz (MHz). A relação entre frequência e comprimento de onda é  $\nu\lambda = c$  onde  $c$  é a velocidade da luz ( $2,998 \cdot 10^8 m.s^{-1}$  no vácuo).

Quando se quer chegar a uma relação entre energia e luz, é mais conveniente pensar-se que a luz é constituída por partículas, denominadas fótons. Einstein, em suas observações em 1905, elaborou a teoria do efeito fotoelétrico, onde se assume que a luz que incide numa placa de metal consiste de um ‘quantum de luz’ ou fótons com energia  $E = h\nu$ , onde  $h$  é a constante de Planck ( $6,626 \cdot 10^{-34} J.s$ ) (Pauling, 1988).

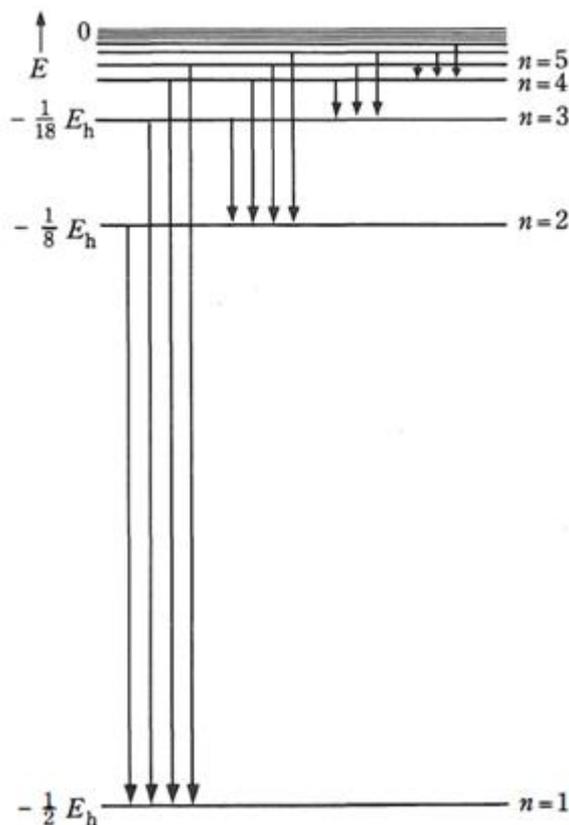
Os nomes das regiões do espectro eletromagnético possuem uma natureza histórica. Não existem mudanças abruptas nas características da radiação eletromagnética quando se passa de uma região para outra, por exemplo, do visível para o infravermelho. A luz visível, em destaque na Figura 2, é o tipo de radiação eletromagnética que podemos enxergar e representa apenas uma parte muito pequena do espectro eletromagnético.



**Figura 2.** Composição do espectro eletromagnético e suas regiões. (Adaptado de: Dan Scientia – [http://dan-scientia.blogspot.com/2010\\_03\\_01\\_archive.html](http://dan-scientia.blogspot.com/2010_03_01_archive.html). Acesso em 2/11/10 às 12h17)

### 2.1.1. Absorção de luz

Analisando-se o modelo atômico de Bohr para o hidrogênio como um exemplo prático, sempre que o átomo passa de um estado estacionário para outro, ele emite ou absorve radiação eletromagnética (ou um fóton) com frequência:  $\nu = \Delta E / h$ , onde  $\Delta E$  representa o módulo da diferença  $E_f - E_i$ .  $E_i$  é a energia do átomo no estado inicial e  $E_f$ , a energia do átomo no estado final. Se  $E_i > E_f$ , um fóton com energia  $h\nu$  é emitido pelo átomo e se  $E_i < E_f$ , um fóton com a mesma energia é absorvido (Figura 3).



**Figura 3.** Diagrama de níveis de energia para o átomo de hidrogênio. (Adaptado de Castellan, 1983).

Como todos os estados estacionários do átomo de hidrogênio têm energias negativas, a linha superior do diagrama acima de níveis de energia representa o estado de energia zero ( $n = \infty$ ), correspondente ao próton e o elétron separados por uma distância infinita, ou seja, correspondente ao átomo ionizado. A linha inferior representa o estado de menor energia, isto é, o estado no qual o elétron ocupa a primeira órbita de Bohr ( $n = 1$ ,  $E_1 = -13,54$  eV). Esse estado é chamado estado fundamental do átomo de hidrogênio (Castellan, 1983).

Os estados estacionários correspondentes às energias  $E_2$ ,  $E_3$ ,  $E_4$  e  $E_5$  também estão representados. Os outros (infinitos) estados estacionários, cujas energias são maiores que  $E_5$  e menores que zero, não são mostrados. Devido à forma desse diagrama, em que os estados estacionários são representados por linhas horizontais desenhadas em diferentes alturas conforme suas energias, isto é, em diferentes níveis horizontais, a expressão nível de energia se tornou sinônimo da expressão energia de estado estacionário e, também, da expressão órbita estacionária. Como níveis com  $n$  maiores têm maior energia, a transição de um estado de  $n$  maior para um estado de  $n$  menor vem acompanhada da emissão de um fóton, enquanto que a transição de um estado de  $n$  menor para um estado de  $n$  maior vem acompanhada da

absorção de um fóton. É uma prática comum indicar as transições atômicas com flechas (verticais) no diagrama de níveis, do nível inicial ao final (Castellan, 1983).

Quando uma molécula absorve um fóton, a energia da molécula aumenta. Diz-se que ela é promovida para um estado excitado. Se uma molécula emite um fóton, a energia da mesma diminui. O estado de menor energia de uma molécula é chamado de estado fundamental. A radiação de micro-ondas estimula o movimento de rotação das moléculas quando é absorvida, já a infravermelha estimula as vibrações das moléculas e a luz visível e a radiação ultravioleta causa a transferência de elétrons para níveis de maior energia. Os raios X e a radiação ultravioleta de comprimento de onda curto provocam o rompimento de ligações químicas e ionizam as moléculas (Rossetti. R.,2007, apud Harris, 2005). Quando a luz é absorvida por uma amostra, a energia radiante do feixe de luz diminui. A energia radiante,  $P$ , é a energia por segundo por unidade de área do feixe de luz (Harris, 2005).

A luz em um espectrofotômetro passa por um monocromador (um prisma, ou uma rede de difração, ou mesmo um filtro) para se selecionar um determinado comprimento de onda. A luz com um único comprimento de onda é denominada monocromática, que significa “de uma só cor”. A luz monocromática, com uma energia radiante  $P_0$ , atinge uma amostra de espessura  $b$ . A energia radiante do feixe que sai do outro lado da amostra é  $P$ . Alguma luz pode ser absorvida pela amostra, portanto,  $P \leq P_0$ . A transmitância,  $T$ , é definida como a fração da luz original que passa pela amostra, onde  $T = P/P_0$ . O valor de  $T$  encontra-se entre 0 e 1. A absorbância é definida como  $A = \log(P_0/P) = -\log T$ . Quando nenhuma luz é absorvida,  $P=P_0$  e  $A=0$ . Se 90% da luz são absorvidos, 10% são transmitidos e  $P=P_0/10$  e esta razão corresponde a 1. A absorbância é diretamente proporcional à concentração da espécie que absorve luz na amostra.

### *2.1.2. Absorção de Luz: Lei de Lambert-Beer*

A absorbância é uma grandeza adimensional, porém, geralmente se usa “unidades de absorbância” depois do valor da absorbância. A concentração da amostra,  $c$ , é geralmente expressa em mol por litro (M) enquanto que o caminho óptico,  $b$ , é geralmente expresso em centímetros. A grandeza  $\epsilon$  (épsilon) é expressa na unidade  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ , o que torna o produto  $\epsilon bc$  adimensional. A grandeza  $\epsilon$  é também conhecida como coeficiente de extinção molar da

substância (Castellan, 1983). A absorptividade molar é a característica de uma substância que indica qual a quantidade de luz que é absorvida em um determinado comprimento de onda por um mol de substância (SKOOG, 2002). A equação  $A = \epsilon bc$  pode ser escrita como  $A\lambda = \epsilon\lambda bc$  pois  $A$  e  $\epsilon$  dependem do comprimento de onda da luz. A grandeza  $\epsilon$  é simplesmente um coeficiente de proporcionalidade entre a absorbância e o produto  $bc$ . Quanto maior a absorptividade molar, maior a absorbância. O espectro de absorção é um gráfico que mostra como  $A$  (ou  $\epsilon$ ) varia com o comprimento de um espectro de absorção.

A parte de uma molécula responsável pela absorção de luz é chamada de cromóforo e qualquer substância que absorva luz visível parece colorida quando a luz branca é incidida através dela ou é refletida a partir dela (a luz branca contém todas as cores presentes no espectro visível.). Uma substância absorve determinados comprimentos da onda da luz branca, e nossos olhos detectam os comprimentos de onda que não são absorvidos. A cor observada é conhecida como sendo a cor complementar da cor absorvida.

### *2.1.3. Espalhamento Rayleigh e Raman*

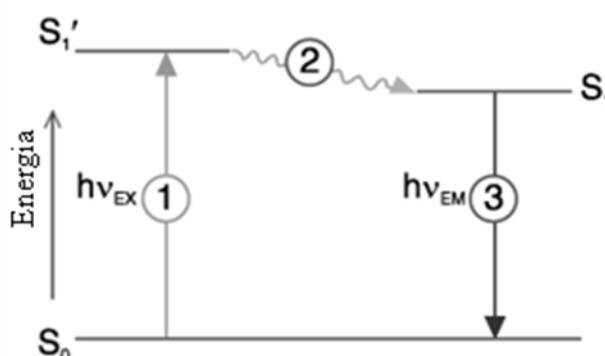
Fenômenos de espalhamento são fenômenos físico-químicos muito estudados na espectroscopia - ciência que estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria para determinação dos níveis de energia de átomos ou moléculas. Quando há a incidência de luz monocromática em uma amostra em que um determinado comprimento de onda não é absorvido, a maior parte dessa luz é o que não passa (Espalhamento Rayleigh) e outra parte pode ser espalhada em menores ou maiores frequências que da radiação original (Espalhamento Raman). No espalhamento Raman há duas formas onde as moléculas sofrem colisão com o fóton e no final o fóton terá maior ou menor energia, dependendo do estado de excitação inicial das moléculas, esses são os efeitos Raman Stokes e Raman Anti-Stokes. Já no espalhamento Rayleigh as moléculas que estão em estado fundamental passam para um estado ligeiramente com nível de maior energia com a luz incidente e voltam ao estado fundamental. O fóton é espalhado sem alteração de energia (Ricci, 2008).

Se um intenso feixe de luz monocromática é transmitido através de uma substância, uma pequena fração da luz é dispersa pelas moléculas do sistema. A nuvem de elétrons em uma molécula pode ser polarizada ou deformada por um campo elétrico. Se for aplicada uma

oscilação no campo elétrico (vetor campo elétrico da onda de luz) para a molécula, a deformação da nuvem eletrônica irá oscilar com a frequência  $\nu_0$ , do feixe de luz incidente. Essa oscilação produz um dipolo oscilante que irradia na mesma frequência da luz incidente. Esse processo é chamado de espalhamento Rayleigh. A radiação de Rayleigh espalhada é emitida em todos os sentidos, o que pode ser observada colocando um detector em uma linha perpendicular à direção da luz incidente. Uma vez que apenas cerca de 0,1% da luz é dispersada, deve-se usar uma fonte de intensa (um laser cumpre esse requisito de forma admirável) (Castellan, 1983). Os espelhos utilizados geralmente nos espectrofluorímetros servem para coletar o máximo de radiação dispersa possível.

## 2.2 Princípios de espectrofluorescência

A fluorescência é o resultado de um processo de três estágios que ocorre em certas moléculas (geralmente hidrocarbonetos poli-aromáticos ou heterociclos) chamadas fluoróforos ou corantes fluorescentes os quais podem ser usados como sondas fluorescentes (Diagrama de Jablonski – Figura 4).



**Figura 4** – Diagrama de Jablonski ilustrando o processo envolvido na criação de um estado excitado eletrônico singlete por absorção ótica e subsequente emissão de fluorescência (Adaptado de [www.probes.com](http://www.probes.com), consultado em 20/5/2009, às 21h).

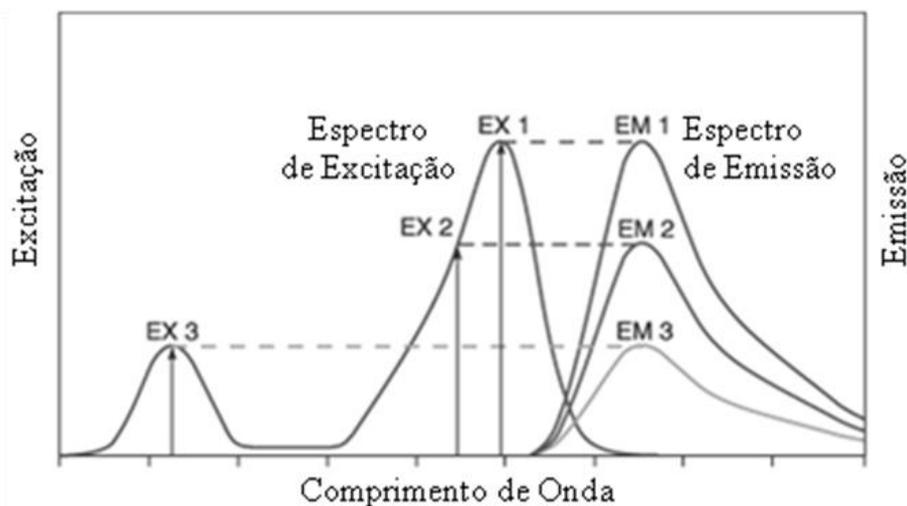
O primeiro estágio compreende a excitação, onde um fóton de energia  $h\nu_{EX}$  é suprido por uma fonte externa como uma lâmpada incandescente ou um laser e absorvido por um fluoróforo, criando um estado eletrônico excitado singlete ( $S_1'$ ). Este processo de fluorescência distingue-se da quimioluminescência, em que o estado excitado é devido à uma

reação química. O segundo estágio é o da duração do estado excitado, que geralmente está compreendido entre 1 a 10 nanossegundos. Durante esse tempo, o fluoróforo sofre uma mudança conformacional e é também submetido a uma infinidade de possíveis interações com seu ambiente molecular. Esses processos têm duas consequências importantes. Primeiro, a energia de  $S_1'$  é parcialmente dissipada, levando a um estado excitado relaxado singlete ( $S_1$ ) onde se origina a emissão de fluorescência. Segundo, nem todas as moléculas inicialmente excitadas por absorção (Estágio 1) voltam ao estado inicial ( $S_0$ ) pela emissão de fluorescência. Outros processos como “*quenching*” colisional, FRET – *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (uma transferência de energia entre dois cromóforos) e *Intersystem Crossing* (processo envolvido uma transição entre dois estados eletrônicos com diferentes *spin*) podem também fazer com que o estado  $S_1$  volte ao estado inicial. O rendimento energético da fluorescência, que é a razão entre o número de fótons de fluorescência emitidos e o número de fótons absorvidos (Estágio 1), é uma medida do grau relativo em que esse processo ocorre. Finalmente, o terceiro estágio é o da emissão de fluorescência propriamente dita, na qual fóton de energia  $h\nu_{EM}$  é emitido, retornando o fluoróforo para seu estado inicial  $S_0$ . Devido à dissipação de energia durante o tempo de vida do estado excitado, a energia deste fóton é baixa. A diferença em energia ou comprimento de onda representado por  $(h\nu_{EX} - h\nu_{EM})$  é chamado de “Desvio de Stokes”. Este desvio é fundamental para a sensibilidade da técnica de fluorescência, pois permite que a emissão de fótons seja detectada contra um plano de baixo fundo, isolado da excitação dos fótons. Em contraste, espectrofotometria de absorção requer medidas de luz transmitidas relativas a níveis altos de incidência de luz no mesmo comprimento de onda (Adaptado de Molecular Probes em [www.probes.com](http://www.probes.com)).

Uma sonda fluorescente é um fluoróforo designado a localizar em uma região específica de um espécime biológico ou a responder a estímulos químicos específicos, e permite detectar componentes particulares de conjuntos complexos biomoleculares com grande sensibilidade e seletividade.

Estudos de fluorescência fornecem uma ampla gama de possibilidades para a investigação de diversos compostos. Sondas fluorescentes podem, por exemplo, ser seletivamente excitadas e detectadas em um meio reacional bastante complexo, onde existem diversas espécies moleculares (Ploem, 1999). Elas são chamadas fluoróforos ou fluorocromos, justamente por emitirem certo quantitativo de fluorescência. Quando um fluoróforo recebe luz, seja por uma fonte interna ou externa ao meio, a energia é absorvida para a excitação de seus elétrons a altos níveis de energia. O processo de absorção é rápido e imediatamente seguido pelo retorno a um baixo nível de energia, que pode ser acompanhado pela emissão de

luz. As características espectrais de um fluorocromo são devidas às configurações especiais eletrônicas de uma molécula. Absorção e emissão de luz são observadas em diferentes regiões do espectro de luz, como mostra a Figura 5.



**Figura 5.** Excitação de um fluoróforo em três diferentes comprimentos de onda (EX 1, EX 2, EX 3) não muda o perfil de emissão, mas produz variações na intensidade da emissão fluorescente (EM 1, EM 2, EM 3) que corresponde à amplitude do espectro de excitação. (Adaptado de [www.probes.com](http://www.probes.com), consultado em 20/5/2009, às 21h).

De acordo com a Lei de Stokes, o comprimento de onda da emissão é quase sempre maior que o comprimento de onda da excitação. Esse “desvio” em comprimento de onda é que faz com que se observe a luz emitida chamada de “Desvio de Stokes”. Deve-se notar que a intensidade de luz emitida é mais fraca que aquela da luz de excitação, assim como a energia emitida é muito menor que a energia necessária para excitação. Para diferentes fluorocromos isso pode variar e é conhecido como eficiência quântica do fluoróforo usado (Ploem, 1999).

Diferentes fluorocromos são caracterizados pelos seus espectros de absorção e emissão, os quais são obtidos levando-se em consideração a intensidade de fluorescência relativa a certo comprimento de onda quando o espécime é excitado a vários comprimentos de onda (varredura espectral). A fluorescência mais intensa ocorre quando o espécime é irradiado com comprimentos de onda próximos a um certo pico de excitação. O decréscimo em fluorescência durante irradiação com luz é chamado decaimento, o que depende da intensidade da excitação luminosa, o decréscimo de absorção pelo fluoróforo de luz excitada e o tempo de exposição (Ploem, 1999).

A redução na intensidade de fluorescência pode também ser devida à modificação nos estados excitados do fluoróforo. Estas mudanças físico-químicas podem ser causadas pela

presença de outros fluoróforos, agentes oxidantes ou sais de metais pesados. Esse fenômeno é chamado *quenching* (Ploem, 1999).

### 2.3 Princípios de espectrofluorimetria acoplada à cromatografia

A espectrometria de fluorescência tem se tornado popular em muitos ramos das ciências químicas e biológicas. Essa técnica é frequentemente utilizada em estudos de estruturas e interações moleculares, na localização de moléculas, especialmente em sistemas biológicos. Uma das aplicações mais importantes da fluorescência refere-se à utilização da mesma como método de detecção acoplado a cromatografia na análise de amostras cujo(s) analito(s) de interesse apresentam significativa fluorescência.

Sobre o tema, cita-se parte de um artigo básico e de boa compreensão:

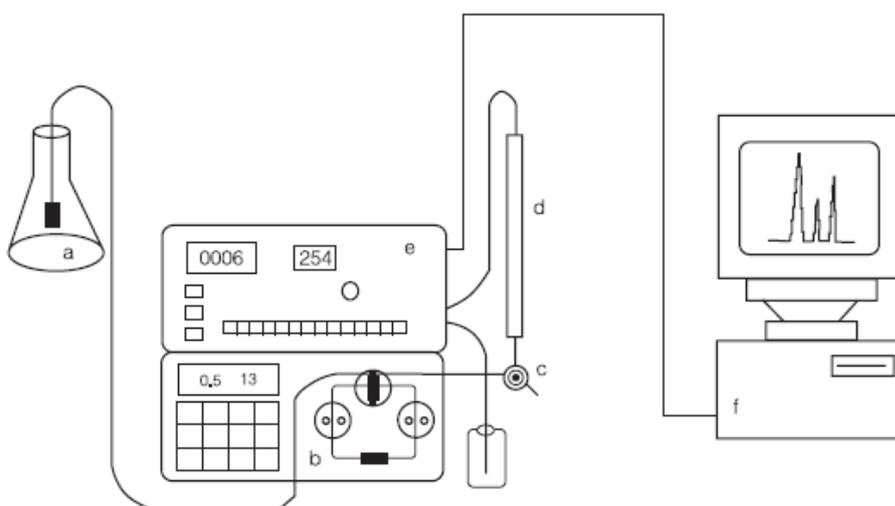
A cromatografia é um método físico-químico de separação. Ela está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação. O termo cromatografia foi primeiramente empregado em 1906 e sua utilização é atribuída a um botânico russo ao descrever suas experiências na separação dos componentes de extratos de folhas. Nesse estudo, a passagem de éter de petróleo (fase móvel) através de uma coluna de vidro preenchida com carbonato de cálcio (fase estacionária), à qual se adicionou o extrato, levou à separação dos componentes em faixas coloridas. Este é provavelmente o motivo pelo qual a técnica é conhecida como cromatografia (*chrom* = cor e *graphie* = escrita), podendo levar à errônea idéia de que o processo seja dependente da cor. Apesar deste estudo e de outros anteriores, que também poderiam ser considerados precursores do uso dessa técnica, a cromatografia foi praticamente ignorada até a década de 30, quando foi redescoberta. A partir daí, diversos trabalhos na área possibilitaram seu aperfeiçoamento e, em conjunto com os avanços tecnológicos, levaram-na a um elevado grau de sofisticação, o qual resultou no seu grande potencial de aplicação em muitas áreas. A cromatografia pode ser utilizada para a identificação de compostos, por comparação com padrões previamente existentes, para a purificação de compostos, separando-se as substâncias indesejáveis e para a separação dos componentes de uma mistura. As diferentes formas de cromatografia podem ser classificadas considerando-se diversos critérios. O grande avanço na cromatografia em coluna foi o desenvolvimento e a utilização de suportes com partículas diminutas responsáveis pela alta eficiência, as quais tornam necessário o uso de bombas de alta pressão para a eluição da fase móvel, devido a sua baixa permeabilidade.

As fases móveis utilizadas devem possuir alto grau de pureza e estar livres de oxigênio ou outros gases dissolvidos, sendo filtradas e degaseificadas antes do uso. A bomba deve proporcionar ao sistema vazão contínua sem pulsos com alta reprodutibilidade, possibilitando a eluição da fase móvel a um fluxo adequado. As válvulas de injeção usadas possuem uma alça de amostragem para a introdução da amostra com uma seringa e duas posições, uma para o preenchimento da alça e outra para sua liberação para a coluna. Existem alças de diversos volumes, sendo utilizadas geralmente alças na faixa de 5-50 mL para injeções analíticas e 0,5-2 mL para preparativas. As colunas utilizadas em CLAE são geralmente de aço inoxidável,

com diâmetro interno de cerca de 0,45 cm para separações analíticas e na faixa de 2,2 cm para preparativas. O comprimento é variável, sendo comuns colunas analíticas de 10-25 cm e preparativas em torno de 25-30 cm. Essas colunas são reaproveitáveis, sendo empacotadas com suportes de alta resolução, não sendo necessária sua regeneração após cada separação.

O detector mais utilizado para separações por CLAE é o detector de ultravioleta, sendo também empregados detectores de fluorescência, de índice de refração, e eletroquímicos, entre outros. Detectores de polarimetria para CLAE, recentemente desenvolvidos, diferenciam compostos quirais, através da rotação de seus estereoisômeros frente à luz plano-polarizada.

O registro de dados pode ser feito através de um registrador, um integrador ou um microcomputador. Tem sido utilizada em várias áreas da ciência, no acompanhamento de sínteses, em análises de pesticidas, feromônios, no isolamento de produtos naturais e sintéticos e na produção e controle de qualidade de medicamentos, dentre tantas outras aplicações. As separações podem se dar por adsorção, partição ou ambos. O suporte mais comumente utilizado é a sílica. O uso de fases estacionárias líquidas adsorvidas a um suporte não tem grande aplicação devido à perda de fase estacionária, mas o uso de suportes modificados, os quais foram desenvolvidos como consequência do problema acima, possibilita a produção de uma imensa variedade de colunas com diferentes propriedades e tipos de seletividade. As fases assim obtidas são chamadas de quimicamente ligadas. Essas fases, dependendo da modificação feita ao suporte, podem atuar no modo normal, reverso ou ambos. Na cromatografia em fase normal, a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, e em fase reversa, a fase móvel é mais polar. Separações analíticas são predominantemente realizadas em fase reversa, sendo a fase C18 (octadecilsílica) a mais usada, ao passo que são preferidas fases que atuem no modo normal para fins preparativos, em vista de que separações no modo reverso utilizam fases móveis aquosas. Entre as fases quimicamente ligadas, merecido destaque deve ser dado às fases estacionárias quirais, as quais possibilitam a separação direta de enantiômeros. Para tanto, é necessária a presença de um seletor quiral como parte integrante da fase estacionária (Degani et al., Química Nova na Escola, n.7, maio, 1998).



**Figura 6.** Equipamento básico de CLAE. a) reservatório da fase móvel; b) bomba de alta pressão; c) válvula de injeção; d) coluna; e) detector e f) registrador. (Adaptado de Degani et al., 1998)

## 2.4. Química dos radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio

O oxigênio molecular ( $O_2$ ) está presente na proporção média de 21% no ar atmosférico, sendo usado nos diversos organismos aeróbicos primordialmente para a re-oxidação de coenzimas (NADH,  $FADH_2$ ) na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, micro-ambiente onde a pressão de  $O_2$  atinge valores da ordem de 0,5 mmHg. Este processo celular permite a constante combustão dos nutrientes absorvidos pelo organismo, garantindo o suprimento de energia química e/ou calor. Adicionalmente,  $O_2$  é utilizado em inúmeros outros processos bioquímicos incluindo a oxidação enzimática de metabólitos como a xantina (Muraoka & Miura, 2004), o ácido araquidônico (Sumiya et al., 1993) e xenobióticos (Symons & King, 2003). Estima-se que em condições normais, cerca de 1 a 3% do  $O_2$  absorvido pela mitocôndria seja parcialmente reduzido a radicais superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o principal precursor de outras espécies reativas de oxigênio/espécies reativas de nitrogênio (ERO/ERN) mais oxidantes. No meio intracelular, a membrana interna da mitocôndria e a membrana tilacóide de cloroplastos representam os principais *loci* de formação de ERO/ERN, embora os peroxissomos contribuam com cerca de 30% dos oxirradicais formados em condições normais, o Retículo Endoplasmático (RE), o citosol (através de reações de auto-oxidação) e a membrana plasmática (em células fagocitárias) também colaboram significativamente com a geração de espécies radicalares (Brigagão & Colepicolo, 1996; Brigagão & Colepicolo, 1998; Halliwell & Gutteridge, 1998; Brigagão et al., 2000; Watanabe et al., 2003; Brigagão et al., 2004, Barros et al., 2006).

O radical  $O_2^{\cdot-}$  pode ser espontaneamente decomposto a  $O_2$  e  $H_2O_2$  ou, preferencialmente no meio celular, através de catálise enzimática pelas superóxido dismutases (SOD). O  $H_2O_2$ , embora não seja um radical livre por definição, é um intermediário responsável pela formação de uma das mais reativas e instáveis ERO no meio biológico: o radical hidroxil ( $\cdot OH$ ). O  $H_2O_2$  é uma molécula termodinamicamente estável, pequena, sem carga e, portanto, plenamente difusível através da maioria das membranas biológicas. Devido a estas características físico-químicas e à decorrente grande difusibilidade em meio fisiológico, o  $H_2O_2$  foi identificado como um dos principais sinalizadores celulares em processos mediados por ERO/ERN, sendo sua concentração intracelular regulada cataliticamente pelas enzimas catalase (CAT) e peroxidases (Branco et al., 2004).

O radical  $\cdot OH$  reage prontamente (velocidade de difusão em meio aquoso equivalente a  $10^9 M^{-1}s^{-1}$ ) com várias biomoléculas essenciais à sobrevivência celular, em particular o DNA,

além de proteínas, cadeias polissacarídicas e lipídios (Sutton & Winterbourn, 1989; Begusova et al., 2003). A alta reatividade do radical  $\cdot\text{OH}$  impede que esta espécie radicalar se difunda no meio intracelular o que, conseqüentemente, restringe sua ação oxidativa ao próprio sítio de complexação de íons  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Cu}^+$  (Goswai et al., 2002). Grupos fosfato presentes na porção polar das bicamadas lipídicas de membranas e nas ligações fosfodiéster de ácidos nucléicos representam sítios estáveis para a quelação destes íons metálicos e candidatam, portanto, estas biomoléculas como importantes alvos da ação lesiva das ERO/ERN. Do mesmo modo, heteroátomos (principalmente nitrogênio e enxofre) constituintes das estruturas de alguns aminoácidos como triptofano, histidina, arginina e metionina são especialmente susceptíveis à ação oxidativa/nitrosativa de ERO/ERN o que resulta na inclusão das proteínas como potenciais alvos das lesões oxidativas em sistemas biológicos. Outro importante papel desempenhado por íons  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^+$  na bioquímica dos radicais livres é a redução de hidroperóxidos lipídicos normalmente presentes em baixas concentrações em membranas biológicas. Este processo produz o radical alcoxil ( $\text{RO}\cdot$ ), um dos principais promotores do processo de lipoperoxidação em membranas biológicas (Marnett & Wilcox, 1995). Em função de sua atividade catalítica, estes íons metálicos não estão praticamente livres no meio celular e, preferencialmente, aparecem complexados a diversas moléculas (incluindo proteínas específicas para o estoque desses metais).

O oxigênio singlete,  $^1\text{O}_2$ , é outra ERO não-radicalar com relevante ação oxidativa em sistemas biológicos. Esta forma excitada do  $\text{O}_2$  é gerada a partir da promoção de um elétron localizado em um orbital anti-ligante da molécula do  $\text{O}_2$  (com inversão de spin) e subsequente compartilhamento deste no outro orbital anti-ligante  $\pi^*$ . Desta forma, o  $^1\text{O}_2$  é, na verdade, uma molécula diamagnética altamente reativa com compostos orgânicos insaturados, já que a barreira termodinâmica de  $93,6 \text{ KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  para a reação com as ligações  $\pi$ - $\pi$  de insaturações (imposta pela inversão por spin) foi sobreposta pelo pareamento de elétrons no orbital  $\pi^*$  (Kanofsky et al., 1993). A energia necessária para a promoção do  $\text{O}_2$  ao estado excitado  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  pode ser fornecida por moléculas fotossensibilizadas. Em animais, compostos como as flavinas FMN e FAD, bilirrubina, retinal e porfirinas podem igualmente sensibilizar o oxigênio molecular a  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  (Halliwell & Gutteridge, 1998).

O óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ) é também, por definição, uma molécula radicalar e apresenta uma configuração eletrônica anômala em relação à clássica *Teoria de Estabilidade Eletrônica do Octeto* com um elétron desemparelhado em um orbital  $\pi 2p^*$ . O  $\cdot\text{NO}$  apresenta destacada ação vasodilatadora sendo endogenamente produzido pela enzima óxido nítrico sintetase ( $\text{Ca}^{2+}$ :

calmodulina-dependente) das células epiteliais a partir de arginina,  $O_2$  e NADPH. As características lipofílicas do  $\cdot NO$  propiciam a grande difusibilidade da molécula através do epitélio e da membrana plasmática das células do tecido muscular liso dos vasos (Godfrey & Schwarte, 2003). Neste tecido, o  $\cdot NO$  se associa a enzima guanilato ciclase ativando a síntese do mensageiro secundário cGMP, direto intermediador do processo de relaxamento vascular (Miller et al., 2004).

## 2.5. Proteína Dissulfeto Isomerase

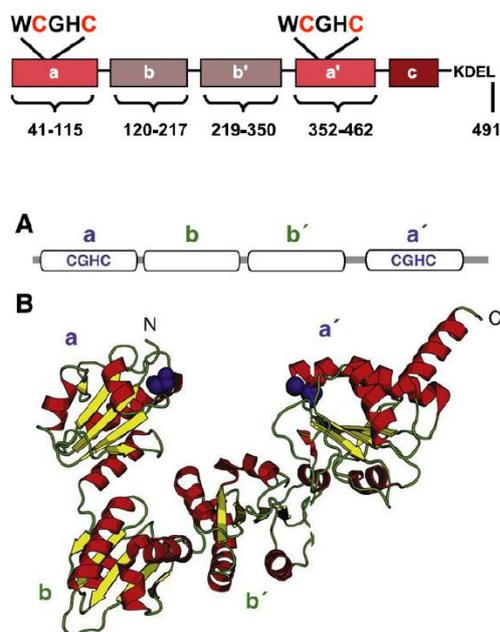
Uma classe de compostos radicalares que recentemente tornou-se grande alvo de pesquisa são os radicais enxofre-centrados, principalmente o radical tiila ( $RS\cdot$ ) (van Gastel et al., 2004). Os compostos tiólicos são extensivamente estudados como agentes preventivos da ação lesiva de ERO/ERN em acréscimo ao efeito anti-oxidante de compostos de baixa massa molecular como tocoferóis, ascorbato, flavonóides e carotenóides. Entretanto, os tióis podem, por si só, produzir espécies radicalares de relevância biológica. Algumas toxinas como a gliotoxina e difenildissulfito, exercem sua ação em animais mediante a formação de radicais tiila,  $RS\cdot$  (Karoui et al., 1996). Radicais carbono-centrados,  $\cdot OH$  e peroxil ( $ROO\cdot$ ) podem reagir com compostos tiólicos gerando o radical  $RS\cdot$ . O tripeptídeo glutationa ( $\gamma$ Glu-Cys-Gli, GSH), considerado um dos principais reguladores do equilíbrio redox intracelular, pode igualmente participar destas reações gerando a forma oxidada GSSG (Sies, 1999).

Desde o primeiro relato reconhecendo um “material orgânico” relacionado ao metabolismo do enxofre, diversas constatações da participação essencial de GSH na vida celular emergiram na literatura. Esse tripeptídeo encontra-se entre os mais eficientes compostos que a célula utiliza para detoxificar xenobióticos, funcionando como um potente agente nucleófilo e como um redutor, podendo reagir com compostos eletrofílicos ou, ainda, reduzir substâncias antes que estas atinjam estruturas vitais nas células como proteínas e ácidos nucléicos. A síntese de GSH celular ocorre no ciclo do  $\gamma$ -glutamato, em reações sequenciais catalisadas pela  $\gamma$ -glutamilcisteinil sintetase e glutationa sintetase (Pompella et al., 2003).

Tiol proteínas constituem uma grande classe de proteínas que contém pelo menos uma cisteína reativa. A reatividade do grupamento sulfidrila é relacionado ao seu pKa, que, uma

vez desprotonado, pode estabilizar-se na forma de íon tiolato ( $RS^-$ ) ou assumir a forma radicalar  $RS^\bullet$ , o radical tiila. Em tiol proteínas, pelo menos um resíduo de cisteína é estabilizado na forma tiolato, devido à ocorrência próxima de um resíduo de aminoácido básico, normalmente arginina (Jacob et al., 2003). Muitas tiol proteínas estão envolvidas no controle de reação de troca tiol/dissulfeto, onde ocorre substituição nucleofílica de grupamentos tiol ou íon tiolato por uma ligação dissulfeto ( $RS-SR$ ). Estas reações são utilizadas para formar ou desfazer pontes dissulfetos em proteínas, regular atividade de enzimas e manter o estado redox celular, entre outras funções.

A proteína dissulfeto isomerase (PDI, E.C. 5.3.4.1) é membro da grande classe protéica das tiol/dissulfeto oxidoredutases (tioredoxinas) encontradas no lúmen do RE em células eucarióticas e no espaço periplasmático de células procarióticas. Foi descrita pela primeira vez há mais de 40 anos como uma proteína de 58 kDa (PDI58) (Goldberger et al., 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 estrutura molecular da PDI é organizada em cinco domínios (a, b, b', a' e c), como esquematizado na Figura 7, onde os domínios a e a' são homólogos àqueles de outras tioredoxinas e cada um deles contém um sítio ativo independente com duas cisteínas críticas para a atividade catalítica na sequência WCGHCK, e o domínio c é rico em resíduos de aminoácidos ácidos. Além disso, PDI apresenta a sequência KDEL, sinalizadora para a retenção de proteínas no RE (Darby et al., 1998).



**Figura 7.** Organização molecular dos domínios da PDI em sua forma tridimensional. Domínios da família da tioredoxina são mostrados nas letras em roxo (domínios catalíticos – a e a') e em verde (domínios não-catalíticos – b e b'). As cisteínas dos sítios ativos estão representadas como esferas roxas. (Adaptado de Appenzeller Herzog et al., 2008). A numeração da sequência de aminoácidos refere-se a uma isoforma enzimática de tecidos de ratos, segundo Darby et al., 1998.

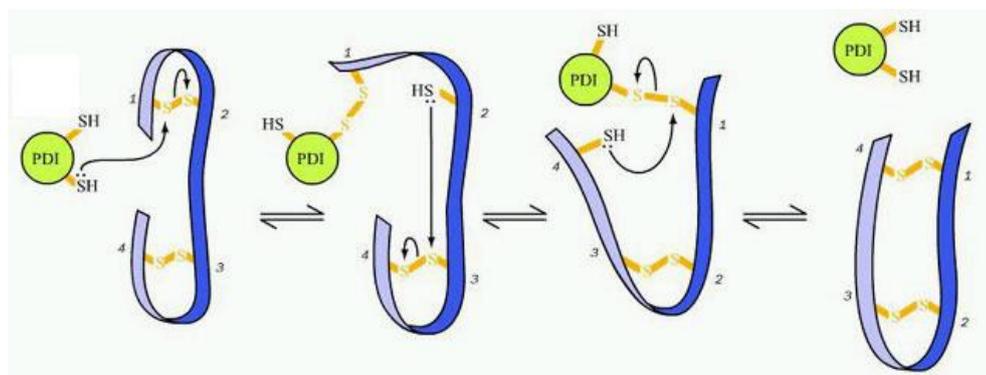
A primeira estrutura resolvida na definição atômica para uma PDI humana foi aquela do domínio a (PDIa). Esta estrutura mostra um número de características consideráveis para domínios redox-ativos da família inteira, sendo que os elementos secundários da estrutura são arranjados em uma forma  $\beta 1-\alpha 1-\beta 2-\alpha 2-\beta 3-\alpha 3-\beta 4-\beta 5-\alpha 4$ . Os resíduos de aminoácidos do sítio ativo são posicionados na extremidade N-terminal da segunda hélice, com uma cisteína parcialmente exposta à superfície da estrutura. A ocorrência de uma conexão hidrofóbica encontrada na vizinhança dessa cisteína, assim como uma volta contendo uma prolina na conformação *cis* posicionada próxima ao sítio ativo, são traços implicados na ligação do substrato.

As proteínas que contêm os domínios CXXC comportam-se similarmente em relação à cinética da reação, à dependência de pH e à natureza da taxa limite em relação à oxidação ou redução de um peptídeo *in vitro*. Estas estruturas são úteis para finalidades de modelagem molecular, havendo como prever estruturas apropriadas para atuarem como substratos ou inibidores de PDI, determinando as suas conformações tridimensionais do domínio redox ativo da enzima isolada.

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

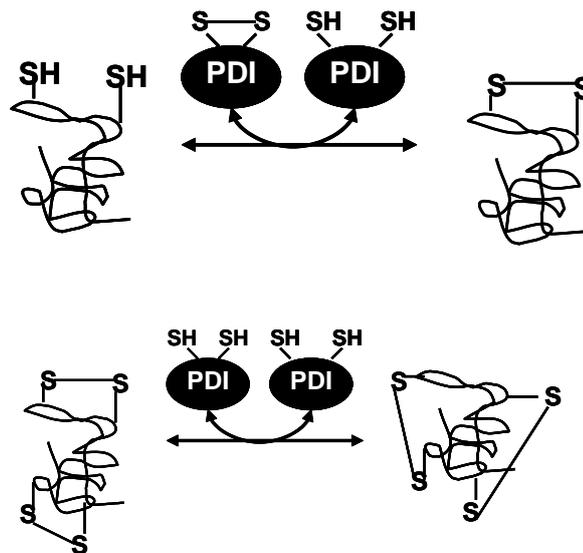
interrelacionadas: (i) atividade de chaperona molecular, que assiste ao enovelamento de cadeias polipeptídicas nascentes e (ii) atividade de oxidorreductase, quando exerce catálise na formação, redução ou isomerização de pontes dissulfeto intra-moleculares.

O primeiro tipo de atividade catalítica, ilustrado na Figura 8, é essencial para evitar o enovelamento protéico incorreto, sendo que danos no correto enovelamento protéico estão relacionados com patologias como doença de Alzheimer, enfisema pulmonar e infecções por príons (Dobson, 2001). Foram descritas alterações no enovelamento protéico assistido por PDI no retículo endoplasmático 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 oxidorredução de grupamentos tióis protéicos microsossomais (Kersteen & Raines, 2003).



**Figura 8.** Esquema ilustrativo da atividade da PDI (em verde) como chaperona molecular, onde a cadeia polipeptídica nascente (esquerda, em azul) se enovela, atingindo a conformação correta (direita), através do reposicionamento de pontes dissulfeto intra-moleculares. Adaptado de [www.bch.msu.edu/faculty](http://www.bch.msu.edu/faculty), consultado em 18/abril/2010, 10h50.

A atividade catalítica como oxidorreductase da PDI é atribuída ao domínio CXXC, característico das enzimas da família das di-tiol/dissulfeto oxidorreductases. 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 (di-tiol) e oxidada (dissulfeto), onde a cisteína nucleofílica próxima à extremidade N-terminal da proteína inicia o ciclo catalítico da enzima (Walker et al., 1996). A atividade catalítica ocorre tanto na formação ou quebra quanto na isomerização de pontes dissulfeto em diferentes substratos, como mostrado na Figura 9. No primeiro caso, a PDI sofre uma mudança em seu estado de oxidorredução, 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 9.** Atividade catalítica na formação ou rompimento (acima) e na isomerização (abaixo) de pontes dissulfeto intra-moleculares catalisadas por PDI (adaptado de Wilkinson & Gilbert, 2004).

A ocorrência de PDI no RE é crítica para o enovelamento correto de proteínas que sofrem exocitose, uma vez que nesse subcompartimento celular, a razão glutatona reduzida:glutatona oxidada (GSH:GSSG) varia de 1:1 a 1:3, contrastando com a razão citosólica e mitocondrial de 30:1 até 100:1. Assim, o estado mais oxidado do RE favorece a formação de pontes dissulfeto. Embora o “*pool*” de tióis celulares esteja implicado na manutenção da estabilidade da PDI, o estado redox dos sítios ativos dessa família de enzimas é mantido principalmente pelo principal tampão celular redox, o par GSH/GSSG, implicando que alterações nesse tampão terão implicações na atividade catalítica da enzima (Gilbert et al., 2004).

A sequência CXXC do sítio ativo, onde duas cisteínas catalisam a troca de uma ligação dissulfeto com os substratos ou no interior da estrutura deles, é essencial para a função preliminar das PDI em promover o dobramento oxidativo da proteína no ER. Esse evento foi elucidado em anos recentes, explicitando funções da PDI em processos metabólicos tais como a degradação associada ao ER (ERAD), intercâmbio de metabólitos, homeostase do cálcio, apresentação de antígeno e entrada de vírus em células do hospedeiro.

Dissulfetos são ligações covalentes produzidas por uma oxidação de dois tióis livres; nas proteínas, eles são formados entre dois resíduos de cisteína. São muito importantes durante a dobradura da proteína e na estabilização das estruturas protéicas, funcionando como interruptores regulatórios na sinalização da redução/oxidação. As células de mamíferos produzem uma grande coleção de complexas estruturas dissulfeto, incluindo quase 1/3 de todas as proteínas humanas. As dobraduras dessas proteínas ocorrem no ER, onde o ambiente

leva à formação da ligação dissulfeto (o lúmen do ER é relativamente mais oxidado que o citosol), e um número de enzimas catalisam a formação de novos dissulfetos.

### 2.5.1. Propriedades catalíticas da PDI

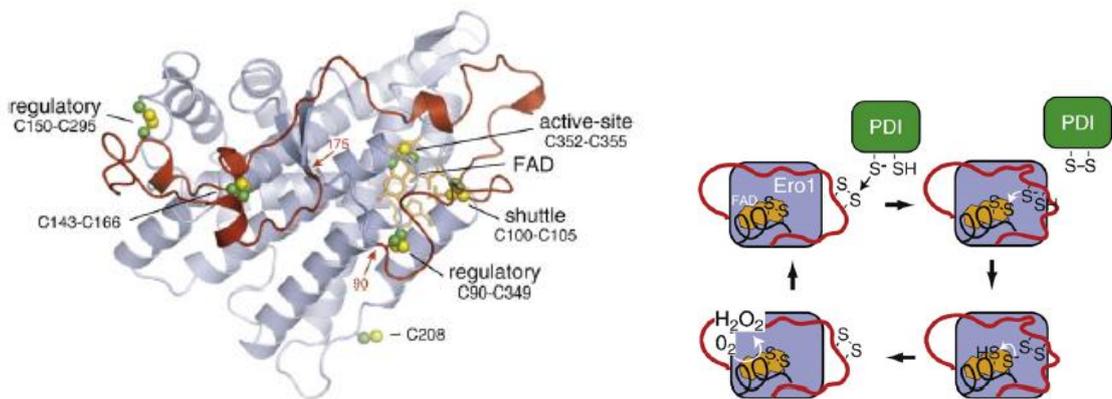
Como a atividade redox das enzimas PDI é comandada pelo sítio ativo CXXC, quando no estado oxidado, o dissulfeto pode ser transferido para o substrato para catalisar sua oxidação por meio do sítio ativo dele próprio que se torna reduzido. Quando no estado reduzido, os substratos dos dissulfetos podem ser reduzidos e o sítio ativo finaliza o ciclo em seu estado oxidado. Estas reações de troca do tiol-dissulfeto prosseguem com a formação de um dissulfeto transiente entre a enzima e o substrato, quando há formação de  $RS^*$  no estado intermediário da catálise da enzima. Desde que a redução requeira uma segunda cisteína para resolver o problema da mistura do dissulfeto com seu substrato, a mutação deste resíduo conduz à acumulação de complexos covalentes através de um dissulfeto inter-molecular.

A espécie reativa em reações da troca do tiol-dissulfeto é o ânion tiolato. Em oxidoredutases do tiol-dissulfeto, a porção *N*-terminal da cisteína do CXXC tem geralmente um baixo valor de pKa que permite sua desprotonação no pH fisiológico. A estabilidade termodinâmica do sítio ativo do dissulfeto, isto é, o potencial redox, é obviamente um fator determinante para a atividade redox executada pela enzima. O potencial redox é influenciado por uma série de características, e as propriedades catalíticas de domínios únicos são moduladas por estes traços. Ainda, todas PDI testadas contendo CXXC podem catalisar *in vitro* a troca do tiol-dissulfeto.

Um único domínio da tioredoxina pode catalisar uma oxidação ou uma redução. Para a reação mais complexa da isomerização, os únicos domínios (ou as misturas destes) de PDI e ERp57 são catalisadores pobres e as moléculas inteiras são requeridas para toda a atividade. Além disso, a PDI é uma isomerase significativamente melhor do que a ERp57 e a P5. Além dos locais obrigatórios da baixa afinidade nos domínios a e a', um local obrigatório no domínio de b' da PDI é requerido, mas não suficiente. A preferência destes três locais obrigatórios para sequências hidrofóbicas explica o largo substrato específico para as proteínas não-nativas observadas para PDI, e resulta na eficiente e dinâmica associação com substratos. Pela afinidade com cadeias polipeptídicas parcialmente empacotadas do polipeptídeo, a PDI pode também ganhar acesso aos tióis ou dissulfetos presentes no substrato das

proteínas e catalisar sua oxidação, redução ou isomerização. A relação entre a ligação ao substrato e a atividade catalítica é significativamente menos bem caracterizada em outras PDI, à exceção da ERp57.

Outra importante oxidorreductase que faz parte da via bioquímica da PDI é a Ero1 (oxidorreductina do retículo endoplasmático). Junto com a PDI, elas formam as maiores vias para a formação de pontes dissulfeto em retículo endoplasmático de eucariontes. A Ero1 influencia a oxidação protéica acoplando-se ao seu poder oxidante do oxigênio molecular e seu cofator flavina para gerar as pontes dissulfeto. Esses dissulfetos são transferidos da Ero1 para a PDI (um carreador solúvel dissulfeto), que por sua vez transfere diretamente esse dissulfeto para a proteína que está sendo enovelada. A transferência de elétrons pelas proteínas substrato à PDI e da PDI à Ero1, se processa como uma série de reações diretas de troca tiol-dissulfeto. Reconstituição *in vitro* do sistema de oxidação Ero1-PDI-substrato com componentes purificados mostraram a capacidade e suficiência dessa rota para a geração de dissulfetos em proteínas. A Ero1 utiliza dois pares catalíticos de cisteína (quatro cisteínas) para oxidar a PDI: o “sítio ativo” e as cisteínas “de troca” (Kaiser, 2008).



**Figura 10.** Estrutura da Ero1 de levedura e seu mecanismo catalítico. (Adaptado de Kaiser et al., 2008). Na primeira figura as cadeias laterais com cisteínas são representadas em esferas verde e amarelas. O co-fator FAD está representado como estruturas químicas tipo “varetas” laranjas. O domínio polipeptídico (resíduos 90-175) contendo o par de cisteínas “de troca” está representado pela cadeia de cor vermelha. Nota-se os dois dissulfetos regulatórios que contêm uma cisteína na região vermelha (Cys90 e Cys150) e uma cisteína no núcleo helicoidal (Cys295 e Cys349).

Um dos desafios no estudo da catálise de PDI é a falta de ensaios sensíveis que possam detectar baixos níveis de enzima em preparações de amostras purificadas e/ou extratos celulares/tissulares brutos. A atividade chaperona da PDI pode ser estudada em detalhes *in vitro* com uma variedade de polipeptídeos como substratos, como inibidor de tripsina, insulina, lisozima e ribonuclease A (RNase).

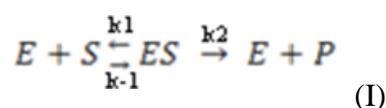
A re-naturação de RNase desnoveada é o ensaio clássico para a determinação da atividade catalítica dessa enzima. Nesse ensaio, a RNase desnaturada por ureia, e, portanto, sem os pares corretos de cisteína formando cistinas, serve como substrato para PDI. A catálise da conversão ao estado nativo da RNase, por reposicionamento dos grupos sulfidrilas protéicos na presença de um reagente tiol (normalmente GSH e/ou GSSG) é monitorado espectrofotometricamente (T.E. Creighton, 1979).

Esse método possui vários pontos negativos, como a sua sensibilidade muito baixa, longa fase de inatividade catalítica, dificuldade de se trabalhar com precisão em preparações de amostras brutas, dentre outros. Recentemente, foi introduzido um ensaio fluorescente para estudar a atividade de redução do dissulfeto da PDI baseado no uso de sondas fluorescentes, segundo o princípio da extinção da própria fluorescência (FSQ – *Fluorescent Self Quenching*). Foi explorado o princípio de ligação de composto fluorescente, a eosina isotiocianato à estrutura de GSSG, com a formação do dímero Di-eosina-glutathiona dissulfeto (Di-E-GSSG), o qual foi relatado com um pseudo-substrato eficiente para quantificar a catálise redutase de PDI (Raturi, A. et al., 2007).

## 2.6. Cinética e inibidores enzimáticos

O tipo mais comum de experimentos de cinética enzimática é a variação da concentração do substrato para mensurar a velocidade enzimática, com o objetivo de mensurar o  $K_m$  da enzima e  $V_{máx}$ , descritos na equação de Michaelis e Menten.

Michaelis e Menten propuseram um modelo simples, que explica a maioria das características das reações catalisadas por enzimas. Nesse modelo, a enzima combina-se reversivelmente com o substrato, formando um complexo ES que, subsequentemente, transforma-se em produto, regenerando a enzima livre. O modelo, envolvendo uma molécula de substrato é representado a seguir:



onde S é o substrato, E é a enzima, ES é o complexo enzima-substrato,  $k_1$ ,  $k_{-1}$  e  $k_2$  são as constantes de velocidade (Champe, 2006).

A equação de Michaelis-Menten descreve como a velocidade da reação varia com a concentração do substrato:

$$V_0 = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{II})$$

onde:

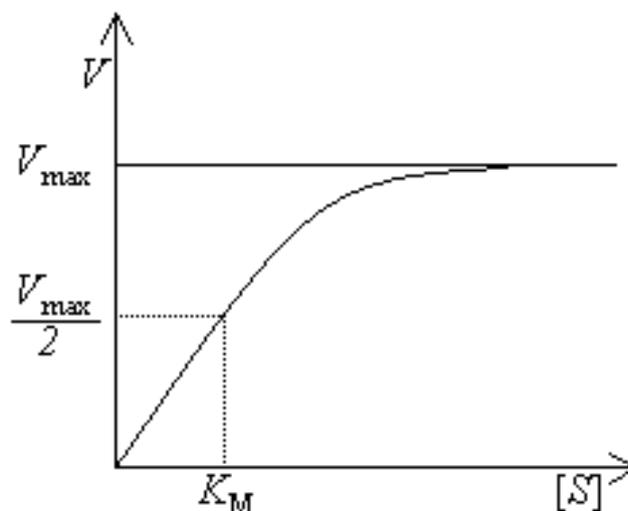
$v_0$  é a velocidade inicial da reação

$V_{m\acute{a}x}$  é a velocidade máxima enzimática nas mesmas unidades que a velocidade. Esta é a velocidade da enzima extrapolada às concentrações muito altas de substrato, logo, este valor é quase sempre maior que qualquer velocidade mensurada no experimento. A  $V_{m\acute{a}x}$  é determinada por quantos sítios da enzima estão presentes e a taxa em que a enzima pode ser convertida de substrato em produto. Se se conhece a concentração dos sítios da enzima, é possível fixar a constante catalítica ( $K_{cat}$ ), ou seja, a taxa de cada sítio da enzima que pode converter o substrato em produto.

$K_m$  é a constante de Michaelis-Menten, na mesma unidade da concentração do substrato, definida como a concentração do substrato necessária para alcançar a metade da velocidade máxima enzimática (Wilson, Walker, 2001).

Ao derivar-se a equação de velocidade de Michaelis-Menten, ilustrada na Figura 11, são feitas as considerações a seguir.

- 1) Concentrações relativas de E e S: A concentração de substrato ( $[S]$ ) é muito maior do que a concentração da enzima ( $[E]$ ), de modo que a porcentagem de substrato ligado à enzima em qualquer tempo é pequena em relação ao total de substrato presente no meio.
- 2) Hipótese do estado de equilíbrio: A  $[ES]$  não varia com o tempo, isto é, a velocidade de formação de  $ES$  é igual àquela da degradação de  $ES$  (para  $E + S$  e para  $E + P$ ). Em geral, um intermediário em uma série de reações é dito estar em equilíbrio quando sua velocidade de síntese é igual a sua velocidade de degradação.
- 3) Velocidade inicial: Somente as velocidades iniciais da reação ( $v_0$ ) são utilizadas na análise das reações enzimáticas. Isso significa que a velocidade de reação é medida assim que a enzima e o substrato são misturados. Nesse momento, a concentração de produto é muito pequena e, assim sendo, a velocidade da reação inversa de  $P$  para  $S$  pode ser ignorada.



**Figura 11.** Gráfico de Michaelis-Menten mostrando o  $K_m$  e a  $V_{máx}$ .

Analisando a Figura 11, emergem fatores importantes sobre a cinética de Michaelis-Menten:

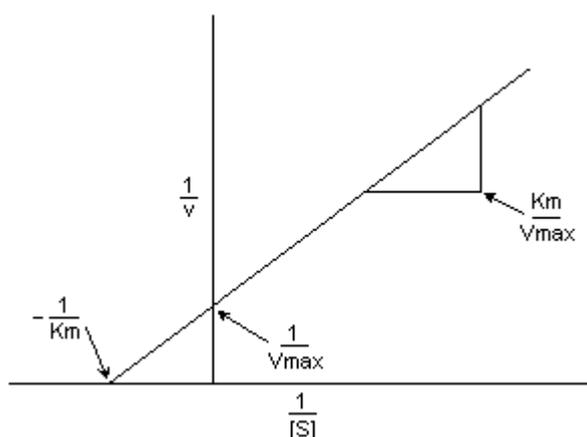
- 1) Características do  $K_m$ .  $K_m$  – a constante de Michaelis-Menten – é característica de uma enzima e de determinado substrato, e reflete a afinidade da enzima exclusivamente para aquele substrato.  $K_m$  é numericamente igual à concentração do substrato na qual a velocidade da reação é igual a  $\frac{1}{2} V_{máx}$ . O  $K_m$  não varia com a concentração da enzima.
  - a)  $K_m$  numericamente baixo reflete uma alta afinidade da enzima pelo substrato, pois uma baixa concentração de substrato é necessária para atingir a metade da saturação da enzima, isto é, atingir a velocidade que é  $\frac{1}{2} V_{máx}$ .
  - b)  $K_m$  numericamente alto reflete uma baixa afinidade da enzima pelo substrato, pois é necessária uma alta concentração de substrato para atingir a metade da saturação da enzima.
- 2) Relação entre a velocidade e a concentração da enzima. A velocidade da reação é diretamente proporcional à concentração da enzima em qualquer concentração de substrato. Por exemplo, se a concentração da enzima é reduzida pela metade, a velocidade inicial da reação ( $v_0$ ), assim como a  $V_{máx}$ , são reduzidas à metade da velocidade original.
- 3) Ordem de reação. Quando  $[S]$  é muito menor que o  $K_m$ , a velocidade da reação é aproximadamente proporcional à concentração do substrato. A velocidade da reação é então dita de primeira ordem com relação ao substrato. Quando a  $[S]$  é muito maior do que o  $K_m$ , a velocidade é constante e igual à  $V_{máx}$ . A velocidade da reação, nesse caso, é independente da concentração de substrato e é dita de ordem zero em relação à concentração de substrato.

Gráfico de Lineweaver-Burke (Figura 12): Quando  $v_0$  é colocada em um gráfico contra  $[S]$ , nem sempre é possível determinar quando a  $V_{máx}$  é alcançada, devido à ascensão

gradual da curva hiperbólica em altas concentrações de substrato. Entretanto, se colocarmos  $1/v_0$  versus  $1/[S]$ , obtém-se uma linha reta. Esse gráfico, o gráfico de Lineweaver-Burke (também chamado de gráfico dos duplos-recíprocos) pode ser utilizado para calcular  $K_m$  e  $V_{máx}$ , assim como para determinar o mecanismo de ação de inibidores enzimáticos (Champe, 2006).

A equação que descreve o gráfico de Lineweaver-Burke é:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{máx} \cdot [S]} + \frac{1}{V_{máx}} \quad (\text{III})$$



**Figura 12.** Gráfico de Lineweaver-Burke.

Inibidores enzimáticos são agentes moleculares que interferem na catálise, provocando um decréscimo da atividade de uma enzima (Lozano et al, 2000). O estudo dos inibidores enzimáticos fornece informação valiosa sobre os mecanismos enzimáticos e tem ajudado a definir alguns caminhos metabólicos.

Assim, dentre os inibidores enzimáticos podemos distinguir dois grupos principais: os inibidores enzimáticos reversíveis, cuja ligação à enzima pode ser revertida, e os inibidores enzimáticos irreversíveis, cuja ligação à enzima é definitiva.

Um tipo comum de inibição reversível é chamado de competitiva. A inibição competitiva dá-se quando as duas moléculas (inibidor e substrato) competem pelo mesmo lugar ativo da enzima. Muitos inibidores competitivos são compostos análogos de substrato, combinando-se com a enzima para formar um complexo, mas sem levar à catálise. Mesmo combinações transitórias desse tipo reduzirão a eficiência da enzima. Levando em

consideração a geometria molecular dos inibidores que se assemelham ao substrato, pode se chegar a conclusões sobre que partes do substrato normal se ligam à enzima (Lehninger, Nelson & Cox, 2006). Os inibidores competitivos reversíveis combinam no mesmo sítio do substrato e devem ser estruturalmente relacionados ao mesmo (Wilson, Walker, 2001).

Este tipo de reação varia de acordo com as concentrações de substrato e de inibidor, onde a velocidade máxima da reação não é alterada, mas são necessárias concentrações maiores do substrato para atingir uma determinada velocidade, aumentando o  $K_m$ .

Dois outros tipos de inibição reversível, incompetitiva e mista, são observados apenas em enzimas com dois ou mais substratos. Os inibidores incompetitivos apenas se ligam ao complexo enzima-substrato, e não a enzimas livres. Um inibidor misto também se liga a um local distinto do sítio ativo, mas liga-se tanto na enzima livre quanto na enzima complexada com o substrato.

A inibição enzimática não-competitiva caracteriza-se pela possibilidade de ligação simultânea do inibidor e do substrato a enzima. Inibidores não-competitivos reversíveis se ligam a sítios distintos daqueles do substrato, mas de um modo em que produzem um complexo final com a enzima, que não pode converter substrato a produto (Wilson, Walker, 2001). Essa ligação é unicamente dependente da concentração do inibidor que se liga a um local que não ao centro ativo. Nestes casos o inibidor não tem semelhança estrutural com o substrato, eliminando a competição.

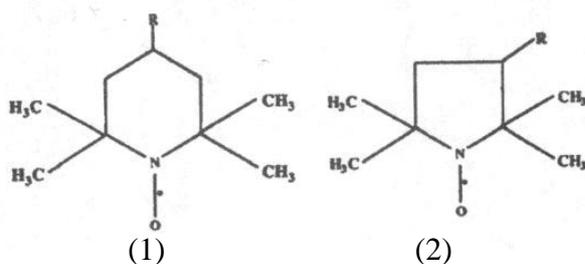
Os inibidores irreversíveis são aqueles que se ligam covalentemente com um grupo funcional de uma enzima, que é essencial para sua atividade, ou o destroem, ou aqueles que formam uma associação não-covalente particularmente estável. Uma classe de inibidores irreversíveis é a dos inativadores suicidas. Esses compostos são relativamente não-reativos até se ligarem ao sítio ativo de uma enzima específica. Um inativador suicida sofre a primeira de algumas etapas químicas da reação normal, mas, em vez de serem transformados em produto final, o inativador é convertido em um composto muito reativo que se combina irreversivelmente com a enzima (Lehninger, Nelson & Cox, 2006).

Os inibidores irreversíveis, como os compostos organofosforados e organomercúricos, cianetos, monóxido de carbono e sulfito de hidrogênio, usam de forças covalentes e o grau de sua inibição é dependente de sua constante de reação do conteúdo presente de inibidor. O efeito de inibidores irreversíveis, que não podem ser removidos por simples técnicas físicas como diálise, é reduzir a quantidade de enzima disponível para reação. Os inibidores envolvem reações com um grupo funcional como hidroxila ou sulfidril ou com um átomo de metal no sítio ativo ou um sítio alostérico distinto (Wilson, Walker, 2001).

## 2.7. Nitróxidos

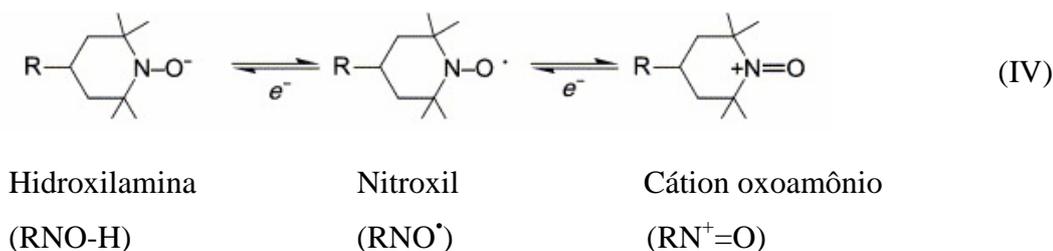
Quimicamente são também conhecidos como aminoxils ou nitroxils, podendo ser definidos como radicais sintéticos e estáveis. Os representantes desse grupo possuem em sua estrutura um anel com cinco ou seis átomos, sendo que um desses é de nitrogênio e os demais de carbono. Ao nitrogênio liga-se um átomo de oxigênio o qual possui um elétron livre, fornecendo natureza radicalar a tais compostos. Ligados ao anel existem grupamentos metil, os quais conferem estabilidade ao prevenir a dismutação radical-radical e limitar o acesso de substâncias reativas. O tamanho, as cargas e a lipofilicidade variam de acordo com os demais grupos substituintes que podem estar presentes no anel. (Samuni & Barenholz, 2003; Goldstein et al., 2003; Israeli et al., 2005; Soule et al., 2007).

Os nitróxidos cíclicos têm sido usados nas últimas décadas em estudos de oximetria, como provas biofísicas no monitoramento da dinâmica da membrana celular, pH, do metabolismo, dos níveis de ânions superóxido, e mais recentemente, como agentes de contraste para se realizar a Ressonância Magnética Nuclear de Imagem, MRI (Nuclear Magnetic Resonance Imaging). Contudo, a descoberta de que os nitróxidos possuem propriedades anti-oxidantes e anti-inflamatórias fez com que os estudos sobre essas, e as demais propriedades, tomassem novas dimensões (Soule et al., 2007).



**Figura 13.** Estrutura química básica dos nitróxidos cíclicos. (1) pertence ao grupo dos nitróxidos piperidina, cujo anel possui seis membros. Já (2) integra o grupo de nitróxidos pirrolidina, pirrolina ou oxazolidina, cujo anel é formado por cinco membros. Ressalta-se a existência de diferentes grupos substituintes (R), os quais podem conferir propriedades distintas a esses compostos. Adaptado de Hahn et al., 1994; Soule et al., 2007.

Através de reações envolvendo a transferência de um elétron, os nitróxidos podem ser reduzidos a hidroxilaminas (RNO-H) ou oxidados a cátions oxoamônio ( $\text{RN}^+=\text{O}$ ), possuindo uma capacidade de reagir direta ou indiretamente com ERO/ERN e seus derivados.



**Figura 14.** Reação de redução e oxidação de nitroxídeos piperidina. Formação de hidroxilaminas e cátions oxoamônio. Adaptado de Israeli et al., 2005.

A dinâmica dessas reações permite que os nitroxídeos, uma vez oxidados ou reduzidos, possam ser restaurados em sua forma original, o que os torna, dentro dos devidos limites, recicláveis. Entretanto, é conveniente indicar que a reação entre o cátion oxoamônio e uma hidroxilamina, a qual restauraria o nitroxídeo de origem, ocorre de forma muito lenta, não sendo, portanto, significativa (Zhang et al., 1999).

Kroll e colaboradores (1998) estudaram o metabolismo de nitroxídeos piperidina em queratinócitos humanos de linhagem HaCaT. Os resultados sugerem que *in vivo*, os nitroxídeos são reduzidos à forma de hidroxilamina e posteriormente convertidos em aminas secundárias, as quais não podem ser re-oxidadas à forma de hidroxilaminas e nitroxídeos, o que faz com que sejam eliminadas como os principais produtos de biotransformação da classe. Também indicam que a biorredução desses compostos pode ser catalisada pela flavoenzima tiorredoxina redutase, uma vez que inibidores dessa também inibem a redução dos nitroxídeos. Outros pesquisadores apontam que as taxas de redução se processam de maneira dependente da lipofilicidade do composto. Realizado no meio intracelular, o processo envolveria como agentes redutores o ácido ascórbico e a GSH, ocorrendo também em hepatócitos, eritrócitos e células renais (Bobko et al., 2007). Alguns apontam que esse fato poderia levar a depleção da glutatona em sua forma reduzida, o que a princípio, seria considerado um efeito pró-oxidante dos nitroxídeos. (Glebska et al., 2003; Balcerczyk et al., 2004). Entretanto, o consumo de glutatona na redução de nitroxídeos é secundário, sendo que o ascorbato ocupa o papel central nessa função, através de uma reação reversível que desvia para uma cinética de pseudo-primeira ordem na presença de oxigênio (Bobko et al., 2007). Nitroxídeos piperidínicos reduzem a concentração de glutatona e o ascorbato em queratinócitos e fibroblastos humanos e ainda altera o estado redox dessas células (Fuchs et al., 1997).

O destaque que esses compostos adquiriram em estudos de oximetria e “*spin trapping*” deve-se à sua natureza radicalar e paramagnética, a qual confere a eles, mas não às hidroxilaminas, um sinal característico de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR), o

qual varia de acordo com as reações de oxidorredução em que eles se envolvem (Soule et al., 2007).

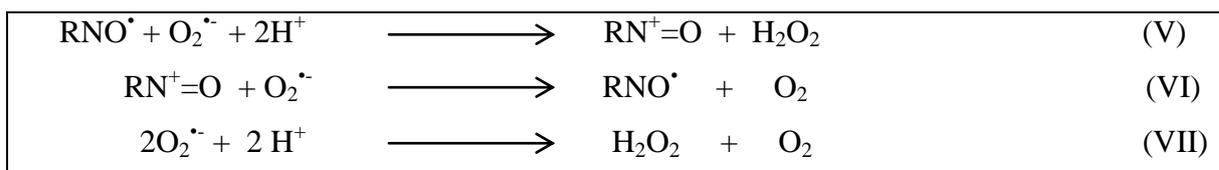
Durante os últimos anos, e com base nas propriedades descritas anteriormente, os nitróxidos têm sido amplamente investigados por sua capacidade anti-oxidante, que vem se mostrando capaz de defender células, tecidos, órgãos e animais de laboratório de danos induzidos por radicais. Logo, como apontam diversos estudos, despontam 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 et al., 1997; Israeli et al., 2005; Soule et al., 2007)

Aronovitch e colaboradores (2007) estudaram a natureza dual dos nitróxidos como pró e anti-oxidantes, 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, polissacarídeos e outras biomoléculas, sendo então considerados os responsáveis pelos potenciais efeitos adversos da classe (Dragutan & Mehlhorn, 2007). Contudo, os resultados de Aronovitch 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 anti-oxidantes 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 anti-oxidantes realmente efetivos; pois podem atuar tanto em compartimentos hidrofílicos como lipofílicos; detoxificam uma ampla gama de espécies reativas impedindo o início e a propagação da cadeia oxidativa; e atuam de um modo que o nitróxido utilizado nessa função possa ser, ao menos parcialmente, restituído. Os meios pelos quais essa classe atua incluem a dismutação de radicais superóxido, através de uma atividade mimética à da superóxido dismutase (SOD), aumento da atividade semelhante à da catalase de algumas heme-proteínas, a detoxificação de espécies reativas formadas por xenobióticos, a capacidade de interagir com radicais inativando-os e a modulação da sinalização redox da célula. (Krishna et al, 1994; Zhang et al., 1999; Samuni & Barenholz., 2002;

Uma das primeiras propriedades de interesse foi a capacidade de mimetizar a enzima 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, os quais formam 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, como mostra a equações V, VI e VII (Krishna et al., 1992; Samuni et al., 2002; Soule et al., 2007).



Embora as constantes dessas reações sejam influenciadas pelo pH, e que fisiologicamente ocorram com grandeza de ordem duas ou três vezes menor do que a da SOD, o baixo peso molecular dos compostos em questão garante que eles atinjam concentrações intracelulares capazes de diminuir as taxas de ânion superóxido com um desempenho semelhante ao da SOD. Quanto à cinética do processo, observa-se que o fator determinante das taxas de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  dismutado é a velocidade de conversão do nitróxido à forma de hidroxilamina, cujo par redox formado com o nitróxido de origem não possui atividade mimética à da SOD. Estudos apontam que esse fato se dá uma vez que a reação de redução de cátions oxoamônio predomina sobre a de oxidação de hidroxilaminas, e que em virtude desse acontecimento pouco  $\text{O}_2^{\bullet-}$  é disponibilizado para que a oxidação citada aconteça. Já redução do cátion oxoamônio por ação do ânion superóxido ocorre em um passo rápido, tornando o nitróxido disponível novamente. (Zhang et al., 1999; 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  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Samuni et al., 2001). Krishna e colaboradores demonstraram no ano de 1996 que eles, os nitróxidos, aumentam o comportamento semelhante ao da catalase apresentado por algumas heme-proteínas. Por exemplo, quando a metamioglobina ( $\text{MbFeIII}$ ) reage com peróxido de hidrogênio, ocorre a depleção do último, um aumento da produção de oxigênio e de uma heme-proteína como o grupamento prostético no estado hipervalente e oxidante, a ferrilmioglobina ( $\text{MbFeIV}$ ). Por ação do par nitróxido/cátion oxoamônio ocorre a detoxificação da  $\text{MbFeIV}$ , disponibilizando  $\text{MbFeIII}$ , para reagir com outra molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e impedir oxidações causadas pelo estado hipervalente. Já Aronovitch e colaboradores (2007) demonstraram que existe a possibilidade de que alguns nitróxidos, ao realizar a redução de metais, no caso  $\text{Cu}^{2+}$  a

$\text{Cu}^+$ , além de realizar a dismutação de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , podem catalisar quebras no DNA, em um efeito indesejado e pró-oxidante.

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

Fernandes e colaboradores demonstraram em 2004, que a inibição da nitração de proteínas, a qual ocorre por mecanismos radicalares, pode ser responsável pela proteção que o 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil (Tempol) fornece a tecidos e células em modelos de inflamação. Logo, o fato de a reação de nitróxidos com radicais tiila ser extremamente rápida, leva à hipótese de que esse efeito “*scavenger*” possa ser utilizado como modulador de enzimas específicas.

Formação de radicais tiila e posterior S-glutationação de proteínas:



### 2.7.1. Possíveis aplicações clínicas, riscos e perspectivas em relação ao uso de nitróxidos

Uma vasta bibliografia relata os efeitos resultantes das interações entre os nitróxidos e os sistemas orgânicos. Por consequência, uma série de benefícios, riscos e aplicações terapêuticas podem ser levantadas em relação ao uso sistêmico ou local desses compostos.

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 anti-oxidantes, anti-inflamatórias e radioprotetoras apresentadas por esses (Hahn et al., 1999).

A capacidade anti-oxidante 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 óxido nítrico, o qual pode atuar sem que os efeitos deletérios do peroxinitrito e derivados estivessem presentes (Hoffman et al., 2003).

Como já foi mencionada, a atividade anti-inflamatória 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, Tempol e tempamina, também foram capazes de proteger o cérebro, em modelos experimentais de danos causados por trauma, sendo esse efeito anti-inflamatório atribuído à atividade mimética à da SOD, a inibição da reação de Fenton e a capacidade de atuar neutralizando radicais (Zhang et al., 1998).

A radioproteção atribuída aos nitróxidos pode encontrar várias aplicações, as quais incluem desde seu possível uso na radioterapia, até a utilização em novos cosméticos. Um estudo de 1991, apresentado por Mitchell e colaboradores, demonstrava a capacidade que o Tempol apresenta em proteger células de hamsters chineses dos efeitos da radiação, enquanto, esse efeito não era detectado na adição da hidroxilamina correspondente e em células com baixa oxigenação. Ou seja, embora os mecanismos sejam desconhecidos, os nitróxidos são capazes de radiosensibilizar células submetidas à hipóxia (as quais predominam em tumores), bem como proteger tecidos normais das reações adversas presentes na radioterapia (Hahn et al., 1992; Hahn et al., 1994; Soule et al., 2007). Já seu uso em cosméticos, como em protetores solares, pode ser especulado uma vez que eles se mostraram capazes de proteger fibroblastos retirados da derme humana dos efeitos da radiação ultravioleta-A1 (UVA1, 340-400nm), entre eles o envelhecimento causado pela exposição a esta radiação (Yan et al., 2005).

A maioria dos textos encontrados não descreve ou cita evidências de que a classe dos nitróxidos possua ação mutagênica, carcinogênica ou teratogênica (Soule et al., 2007).

Contudo Wang e colaboradores (1996) apontam para o fato de que danos ao DNA ocorrem em células de *Escherichia coli*, deficientes no reparo do mesmo, e que tanto efeitos citotóxicos como mutagênicos já foram observados em células de *S. typhimurium* sensíveis a danos oxidativos. Esses resultados, no entanto, sugerem que a atividade observada resulta não da ação dos nitróxidos, mas sim da deficiência das células em questão.

A diferença de grupo substituinte pode conferir aos nitróxidos peculiaridades as quais são facilmente perceptíveis quando se analisa suas características físico-químicas, mas podem, no entanto, influenciar a concentração dos mesmos em compartimentos biológicos, e até mesmo determinar a existência, ou não, de efeitos colaterais como a hipotensão. Um exemplo de como a escolha da estrutura química pode afetar positivamente a atuação dos nitróxidos está presente no fato de que aqueles carregados positivamente e em concentrações apropriadas são capazes de se aproximar da membrana mitocondrial através de efeitos eletroforéticos, conferindo proteção contra o vazamento de radicais e exercendo efeitos anti-apoptóticos (Kagan et al., 2007). Já Samuni & Barenholz (2003), definiram que, embora os nitróxidos possuam características de hidrofiliabilidade e lipofiliabilidade, a proteção que esses fornecem aos lipídios possivelmente se dá de maneira similar pelos dois tipos de nitróxidos. Contudo, em preparações lipossomais, os nitróxidos lipofílicos demonstram uma vantagem sobre os hidrofílicos. Logo, como as possibilidades de modificações dos nitróxidos se mostram de certo modo sem limites, acredita-se que a criação de novos tipos de estruturas deve acompanhar o avanço na descoberta e desenvolvimento das aplicações desses compostos (Volodarsky, 1990).

Também é conveniente lembrar de que existe a possibilidade de o metabolismo de nitróxidos ocorrer 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 tornam prioridades a partir do momento em que auxiliam grandemente na compreensão da sinalização redox da célula e despontam como protótipos viáveis para o desenvolvimento de novos fármacos.

### **3 JUSTIFICATIVA**

Nos últimos anos, há uma grande busca a agentes moduladores de atividades de enzimas chaperonas, uma vez que essas foram reconhecidas como agentes bioquímicos diretamente envolvidos em processos patológicos como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, processos inflamatórios crônicos e diabetes, entre outros. Para tanto, o entendimento do ciclo catalítico e a validação de testes cinéticos com substratos específicos é essencial. Os ensaios disponíveis para PDI, até o momento, são trabalhosos, dispendiosos e pouco sensíveis, o que torna o estudo dessa chaperona restrito a poucos grupos de pesquisa. A validação de uma sonda fluorescente (Di-E-GSSG) que atua como pseudo-substrato para PDI e seu uso para verificar novos moduladores da atividade redutase dessa enzima pode vir a proporcionar um melhor conhecimento do papel de PDI na transdução de sinais bioquímicos durante a resposta celular, além da perspectiva de apontar novas estruturas como protótipos de fármacos.

### **4 OBJETIVOS**

Neste trabalho o objetivo central foi avaliar a capacidade de nitróxidos atuarem como moduladores da atividade catalítica da PDI.

Especificamente, pretendeu-se:

- ✓ sintetizar sondas fluorescentes para monitorar a atividade catalítica de redutase da PDI;
- ✓ validar o uso laboratorial dessas sondas fluorescentes frente à PDI isolada;
- ✓ testar nitróxidos com diferentes grupos químicos hidrofílicos e/ou lipofílicos como moduladores da atividade catalítica da PDI.

### **5 PARTE EXPERIMENTAL**

#### **5.1 Instrumentação e acessórios**

Os materiais que foram utilizados para a realização da pesquisa encontram-se disponíveis no Laboratório de Bioquímica (Sala E-205), no Departamento de Ciências Exatas da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL/MG, o qual possui infra-estrutura, equipamentos e reagentes necessários para a realização dos experimentos.

Para a leitura da emissão de fluorescência das amostras, foi usado o espectrofluorímetro – VARIAN / Cary Eclipse / Fluorescence Spectrophotometer / Pollution Degree 2 / Safety Class I (EN61010-1). Nos experimentos de cinética química, o aparelho foi devidamente programado para as leituras de excitação e emissão característicos da substância padrão estudada. A cubeta padrão de quartzo de 1mL foi utilizada em todos experimentos de leitura de fluorescência descritos anteriormente preenchendo-a e tomando os devidos cuidados para sua correta disposição no aparelho. As leituras de absorbâncias foram feitas pelo espectrofotômetro – LIBRA S22 / Biochrom.

Foi utilizada a balança analítica digital KERN 412 para pesar os reagentes necessários às soluções e a centrífuga microprocessada – QUIMIS foi utilizada para o empacotamento da coluna cromatográfica, centrifugando e tratando o Sephadex G-25 conforme protocolo específico.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizada para o experimento da pureza das sondas, foi feita no equipamento Shim-pack VP-ODS, 4,6mm x 25cm, 5µm, conectada em série com pré-coluna C18 modelo Shim-pack GVP-ODS, 4,6mm x 10mm.

## 5.2 Reagentes

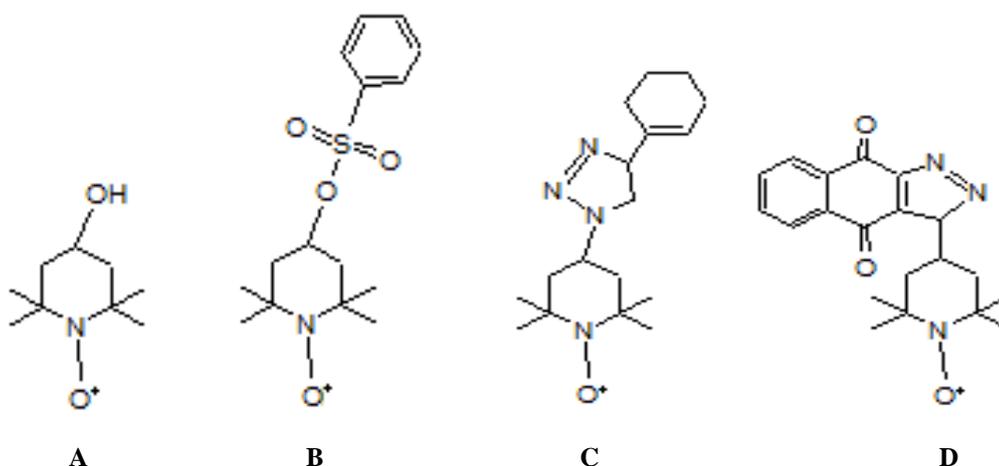
Todos os reagentes utilizados na execução deste trabalho foram de grau analítico e todas as soluções preparadas em água deionizada em sistema de purificação Milli-Q (Millipore<sup>®</sup>, Brasil). Os reagentes utilizados e suas devidas marcas constam na listagem abaixo:

- ✓ Glutationa Reduzida – Sigma Ultra / Sigma-Aldrich
- ✓ Glutationa Oxidada – Sigma Ultra / Sigma-Aldrich
- ✓ Sephadex G-25 – Sigma Ultra / Sigma-Aldrich
- ✓ DTT – Amersham Biosciences / Merck
- ✓ 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil (Tempol) – Sigma-Aldrich

- ✓ PDI de fígado bovino (E.C. 5.3.4.1 CAS<sup>#</sup> 37318-49-3) – Sigma-Aldrich
- ✓ Eosina-5-isotiocianato – Invitrogen / Molecular Probes
- ✓ EDTA P.A. (Sal dissódico) – Vetec Química fina LTDA
- ✓ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – PROQUIMIOS
- ✓ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – Vetec Química fina LTDA
- ✓ DMF – Vetec Química fina LTDA
- ✓ Acetato de sódio – Vetec Química fina LTDA
- ✓ TRIS – USB Corporation / Cleveland – Ohio USA

### *5.2.1. Nitróxidos utilizados nos experimentos*

Com a colaboração do aluno de doutorado em Química Orgânica da UFF (Universidade Federal Fluminense), Alessandro Kappel Jordão, orientado pelo Professor Doutor Vitor Francisco Ferreira e Professora Doutora Anna Cláudia Cunha, ambos do Instituto de Química daquela Instituição, vários nitróxidos foram sintetizados a partir do protótipo Tempol, de acordo com as estruturas da Figura 15. Foram denominados com a utilização do código Redoxoma (Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia, CNPq/Processo 573530/2008-4, <http://www2.iq.usp.br/redoxoma/>), seguido do seu número, os quais foram cedidos à pesquisa com fins de padronização dos resultados e comparação do efeito do mesmo em relação ao do Tempol, possibilitando a análise da estrutura química e suas especificidades na modulação da atividade catalítica da PDI.



**Figura 15.** Estruturas químicas dos nitroxídeos. A) 4-hidróxi-2,2,6,6-tetrametil-1-piperidina-1-oxil (Tempol); B) 1-Piperidiniloxi, 2,2,6,6-tetrametil-4-[(fenilsulfonil)oxi] (Redoxoma 4); C) 2,2,6,6-tetrametil-4-(4-ciclohexene-1H-1,2,3-triazol-1-il)piperidina-1-oxil (Redoxoma 9) e D) 1-(2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-oxil)-1H-nafto[2,3-d][1,2,3]triazol-4,9-diona (Redoxoma 10).

### 5.3 Metodologia

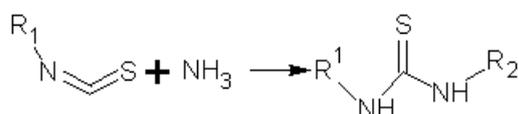
Raturi e colaboradores (2007) sintetizaram a sonda Di-E-GSSG a partir da GSSG a 100 $\mu$ M com eosina isotiocianato com excesso molar de 10 vezes e utilizaram de um coletor de fração para a retirada de alíquotas da cromatografia feita através de 100 $\mu$ L da sonda em coluna cromatográfica em Sephadex G-25® (Sigma Aldrich). O trabalho foi desenvolvido com a finalidade de monitorar a atividade da PDI, a qual foi expressa usando *Escherichia coli* BL21 (DE3) e o vetor de expressão pET-28a. O estudo se estendeu com vistas a utilizar a sonda para investigar o efeito das taxas variáveis redox nas PDIs localizadas em superfícies de plaquetas. Resultados de cinética enzimática foram extraídos de estudos com uso de PDI a 40nM, incubada com concentrações variáveis de Di-E-GSSG (50nM a 5 $\mu$ M), o resultado do valor de  $K_m$  foi de 650 nM e a  $V_{máx}$  de 125 nM de E-GSH por minuto, conforme relatado por aqueles autores.

Para comparar a afinidade da PDI pela sonda Di-E-GSSG e seu análogo não fluorescente GSSG, a redução da Di-E-GSSG pela PDI foi monitorada na presença de concentrações variáveis de GSSG. A constante de inibição de redução de Di-E-GSSG pela GSSG foi de 200 $\pm$ 30 $\mu$ M, sugerindo que a PDI tem muito mais afinidade pela Di-E-GSSG quando se comparou com a GSSG e não haveria efeito significativo na redução da sonda pela PDI reduzida mesmo na presença de mais de 20 $\mu$ M de GSSG na mistura da reação.

De acordo com os autores, a alta afinidade da Di-E-GSSG pode ser atribuída em partes aos anéis aromáticos da eosina que facilitaria a interação hidrofóbica com a PDI próximo ao seu sítio ativo. Esta interação resultaria na alta afinidade de PDI pelo substrato. Esta hipótese é baseada no fato de que os ditióis do sítio ativo na tioredoxina são circundados por regiões hidrofóbicas. Outro fator que pode possivelmente contribuir para a alta afinidade do substrato é a mudança no ângulo diédrico dissulfeto da GSSG na incorporação de dois volumosos grupos de eosina. A adição de eosinas à molécula de GSSG pode resultar na distorção do ângulo diédrico que, por sua vez, poderia levar a ponte dissulfeto da Di-E-GSSG ser mais suscetível à ataques nucleofílicos pelos tióis do sítio ativo da PDI (Raturi, A. et al., 2007).

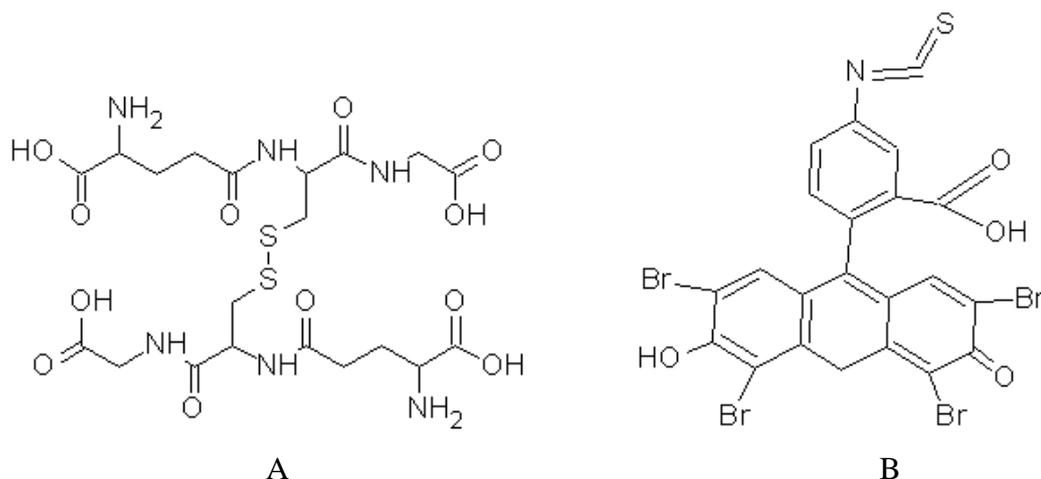
### 5.3.1. Síntese e estudo da sonda Di-E-GSSG

Foram realizadas sínteses da sonda fluorescente, para testar a atividade de PDI, utilizando-se o princípio de reação de grupos isotiocianato com grupamentos *N*-terminais de peptídeos (Figura 16):

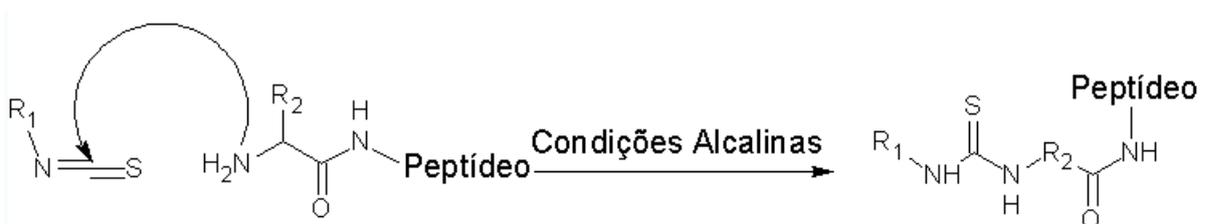


**Figura 16.** Esquema de reação de grupos *N*-terminais de peptídeos com grupos isotiocianato.

O composto fluorescente utilizado foi a 4'-5'-dibromo-2',7'-dinitrofluoresceína isotiocianato (eosina 5-isotiocianato) (Figura 17B):



**Figura 17.** Estruturas químicas dos compostos utilizados na síntese da sonda Di-E-GSSG. A) Glutathiona oxidada ( $C_{20}H_{32}N_6O_{12}S_2$ ; MM: 612,63) e B) Eosina 5-isotiocianato ( $C_{21}H_7Br_4NO_5S$ ; MM: 704,96;  $\lambda_{exc}=521$  nm;  $\lambda_{emi}=542$  nm em água).



**Figura 18:** Degradação de Edman mostrando a sequência de reação que é análoga àquela entre a eosina isotiocianato e a glutathiona oxidada para a síntese da sonda Di-E-GSSG.

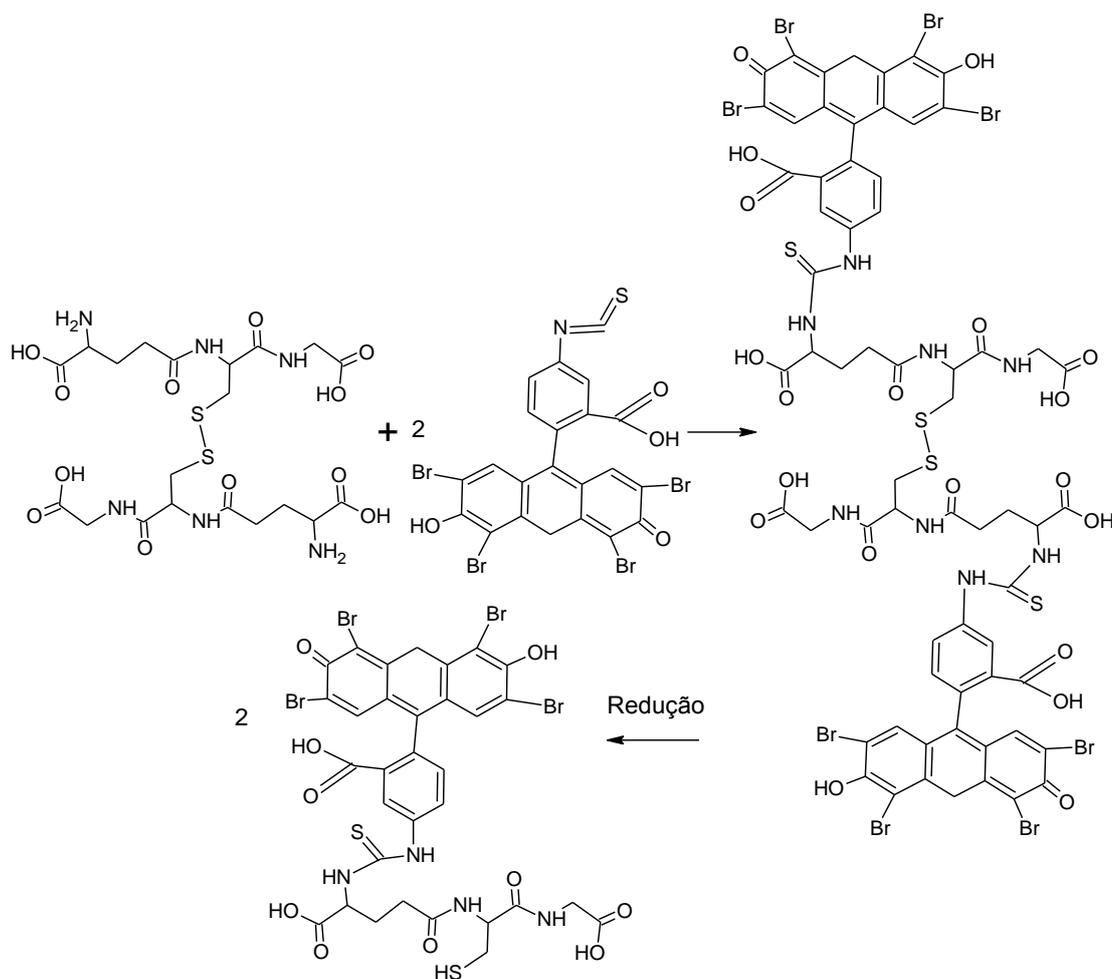
GSSG (Figura 17A) foi incubada com excesso molar (10 vezes) da eosina 5-isotiocianato (Figura 17B) em tampão (100 mM de fosfato de potássio, 2mM de EDTA, pH ajustado para 8,8) por 8 horas em temperatura ambiente e sob proteção de incidência de luz para não ocorrer perda de propriedades químicas por foto-indução. A formação da Di-E-GSSG é feita através da ligação de duas moléculas de eosina aos dois grupos amino livres da glutathiona dissulfeto. A proximidade das duas moléculas de eosina leva ao FSQ (Fluorescent Self Quenching) da sonda e deixa a molécula com emissão de fluorescência muito baixa (Raturi, A. et al., 2007). Embora a sonda seja estável por 72 horas a temperatura ambiente, sua utilização, em todos os experimentos, não ultrapassou 24 horas após a síntese.

Após empacotamento de coluna cromatográfica (100 mm x 10 mm) com resina Sephadex G-25 (Sigma Aldrich), e ajuste de velocidade de fluxo para  $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , foi realizada limpeza da coluna (3 vezes) com tampão de eluição (tampão fosfato de potássio 0,1M e 2mM de EDTA pH 7,00). Foram aplicados 100  $\mu\text{L}$  da sonda à coluna cromatográfica de exclusão molecular, para separação de possíveis reagentes interferentes. Alíquotas de 1mL foram coletadas para análises. Faz-se importante destacar que as eosinas que não se ligaram à glutathiona não se eluem e ficam retidas no topo da coluna.

Dessas alíquotas, as frações que apresentaram densidade óptica significativa (valores acima de 0,1) em 521nm (comprimento de onda característico de maior absorvidade da eosina 5-isotiocianato) foram reunidas em “pool”, homogeneizadas e sua concentração calculada ( $\epsilon_{\text{eosina}}=88.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) aplicando-se a lei de Lambert-Beer.

Paralelamente, a eluição de GSSG isolada foi monitorada separadamente em 220 nm, observando-se sua eluição após 6 minutos, ou seja, a partir da 6ª alíquota.

O estado de oxidação dos grupos tióis de GSSG foi testado pela variação do sinal de emissão de fluorescência ( $\lambda_{\text{exc}}=521 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{emi}}=542 \text{ nm}$ ) antes e depois da adição de di-tiotreitol (DTT). Como controle para os testes de redução da sonda Di-E-GSSG, os monômeros eosina-glutationa reduzida (E-GSH) foram obtidos tratando-se os dímeros anteriormente purificados com o redutor DTT, seguindo-se separação cromatográfica nas mesmas condições anteriores. A eficiência da redução foi monitorada pelos respectivos coeficientes de extinção molar dos compostos, obtidos após varredura espectral.



**Figura 19.** Proposta de reação de síntese e de redução da sonda Di-eosina-5-isotiocianato-GSSG, originando o composto fluorescente eosina-5-isotiocianato-GSH após redução.

### 5.3.2. Síntese e estudo da sonda E-GSH

Para validação dos testes de redução, o composto fluorescente E-GSH foi sintetizado. GSH foi incubada com excesso molar (10 vezes) de eosina 5-isotiocianato em tampão fosfato (100 mM de fosfato de potássio, 2mM de EDTA, pH 8,8). Alíquotas foram tomadas em diferentes intervalos de tempo e aplicadas em uma coluna com resina Sephadex G-25, seguindo-se eluição com tampão fosfato (100 mM de fosfato de potássio, 2mM de EDTA, pH 7,0). A eluição da sonda E-GSH foi monitorada através de varredura espectral, confirmando seu espectro de absorção característico.

As condições de eluição cromatográfica com resina Sephadex G-25 (Sigma Aldrich) foram idênticas às descritas anteriormente e, de forma semelhante, as alíquotas que apresentaram valores de absorbância ( $\lambda=521$  nm) acima de 0,1, sendo homogeneizadas para formar um “*pool*”, constituindo essa amostra o monômero fluorescente.

O estado de oxidação do grupo tiol de GSH foi testado pela variação do sinal de fluorescência antes e depois da adição de di-tiotreitol (DTT), análogo ao feito com a sonda dimérica, a Di-E-GSSG.

### 5.3.3. Verificação da estabilidade química das sondas fluorescentes

Os compostos sintetizados, Di-E-GSSG e E-GSH, foram submetidos a testes de estabilidade em temperatura ambiente, a 8°C e a -20°C. Para tanto, foram realizadas varreduras espectrais de alíquotas dos compostos em diferentes intervalos de tempo.

Para verificar a pureza das sondas sintetizadas, foi adaptada a metodologia descrita anteriormente por Anderson et al. (1999) para detecção e quantificação cromatográfica de GSH. No método originalmente descrito, GSH reage com monobromobimano (mBBr) formando um aduto fluorescente, que pode ser analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a um detector de fluorescência. Nesse trabalho, foi utilizada a fluorescência de eosina 5-isotiocianato para quantificar os adutos E-GSH e Di-E-GSSG. Os adutos formados entre o fluoróforo e GSH ou GSSG foram separados por CLAE.

Após a síntese das sondas e purificação em coluna Sephadex G-25, alíquotas foram filtradas em membrana Millipore® (0,45  $\mu$ m) e 20  $\mu$ L injetados. A eluição foi feita com

Tampão A (87% de tampão acetato e 14% de metanol) e tampão B (10% de tampão acetato e 90% de metanol). A coluna (C-18 Shim-pack VP-ODS, 4,6mm x 25cm, 5 $\mu$ m, conectada em série com pré-coluna C18 modelo Shim-pack GVP-ODS, 4,6mm x 10mm) foi pré-equilibrada com 100% do Tampão A e 0% do Tampão B, em fluxo de 1mLmin<sup>-1</sup> durante 5 minutos. Após injeção da amostra, a eluição ocorreu em duas etapas: 75% de A e 25% de B durante os 10 minutos iniciais e 25% de A e 100% de B nos próximos 20 minutos (Anderson, et al.,1999).

A identificação de E-GSH foi realizada pela comparação com o tempo de retenção de padrões autênticos de GSH (0,01-0,3  $\mu$ M) através de detector de fluorescência (modelo RF-10AXL) utilizando-se  $\lambda_{exc}$ =521 nm;  $\lambda_{emi}$ =542 nm) e detector de UV/VIS (do tipo arranjo de diodos, DAD) com monitoramento em Abs521nm e obtenção dos espectros correspondentes.

#### *5.3.4. Testes cinéticos das sondas fluorescentes*

A atividade de redução da PDI foi monitorada em um ensaio com tampão para atividade ótima da enzima, o tampão fosfato de potássio 0,1M e 2mM de EDTA pH 7,00 (Raturi, A. et al., 2007), com diferentes concentrações de PDI de fígado bovino (E.C. 5.3.4.1 CAS<sup>#</sup> 37318-49-3). Foram acrescentadas várias concentrações das sondas Di-E-GSSG, na ausência ou presença de DTT e o aumento da fluorescência decorrente da redução de Di-E-GSSG a E-GSH pela atividade de PDI foi monitorado pela fluorescência da eosina 5-isotiocianato. Alternativamente, a cinética da redução foi também monitorada por espectrofotometria visível, uma vez que os compostos fluorescentes apresentam coloração característica, como uma função de tempo na presença de DTT e/ou de PDI.

#### *5.3.5. Efeito de nitróxidos sobre a catálise de PDI*

Nitróxidos de diferentes polaridades foram testados como moduladores da atividade catalítica da PDI, usando-se como pseudo-substrato da enzima a sonda Di-E-GSSG previamente sintetizada, em condições padrões de ensaios. Os parâmetros de velocidade de reação da enzima, nessas condições, foram calculados para cada nitróxido testado,

comparando-se com as reações também realizadas com inibidores conhecidos de PDI: bacitracina e ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) – DTNB.

Foram usados os nitróxidos Tempol e três novos compostos análogos estruturais do Tempol, o REDOXOMA 4, o REDOXOMA 9 e o REDOXOMA 10 cujas estruturas estão mostradas na Figura 15.

Para o teste *ex vivo*, amostras de sangue humano foram coletadas e devidamente tratadas para o experimento realizado, em tampão Hepes contendo 2 mM de EDTA (pH 7,4). Plaquetas foram contadas usando hemocitômetro e foram utilizadas em todos experimentos  $4.10^7$  plaquetas por mL (Raturi, A. et al., 2007). Os testes foram realizados após aprovação de protocolo pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Unifal-MG (protocolo 23087.005885/2010-14) e os doadores voluntários foram pacientes do Laboratório Central de Análises Clínicas da mesma Universidade, com idade entre 18 e 35 anos, não fumantes e que não fizeram uso de medicamentos que, potencialmente, poderiam afetar propriedades plaquetárias, como warfarina, estrógenos e ácido acetil salicílico.

### 5.3.6 Análises estatísticas

Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  o desvio padrão de, no mínimo, três experimentos realizados em triplicata.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. Síntese da sonda E-GSH

Foi feita a cromatografia em resina Sephadex G-25 e eluição da sonda E-GSH e tomaram-se alíquotas para leituras de suas absorvâncias no espectrofotômetro. Com esses dados, foi feito um gráfico para análise dos melhores resultados de absorvância a 521nm, comprimento de onda característico de maior absorvidade da eosina 5-isotiocianato.

As alíquotas com maiores valores de absorbâncias (8 a 17) foram homogeneizadas para formar um “*pool*”, cujo resultado da absorbância final, após homogeneização, foi de  $Abs_{521nm}=0,347$ , o que corresponde, portanto, à concentração 3,943  $\mu M$  e rendimento de 3,94%. Salienta-se que foram feitas várias cromatografias obtendo-se resultados de até 6,25  $\mu M$  e que a escolha dos resultados aqui discutidos, baseou-se no melhor arraste da sonda.

## 6.2. Tratamento da sonda E-GSH com DTT em diferentes intervalos de tempo

Alíquotas de E-GSH foram tratadas com DTT de forma análoga ao experimento com sonda Di-E-GSSG, incubadas nos intervalos de tempo de 0, 5, 15 e 60 minutos. Esperou-se a hipótese de baixo de sinal no comprimento de onda de 542 nm devido à ausência de Di-E-GSSG e consequente quebra das pontes dissulfeto liberando os monômeros fluorescentes. Assim, foi usado o DTT em concentração final 1000 vezes a concentração da E-GSH, 150 nM, a mesma padronizada para a Di-E-GSSG e feita uma varredura espectrofluorimétrica.

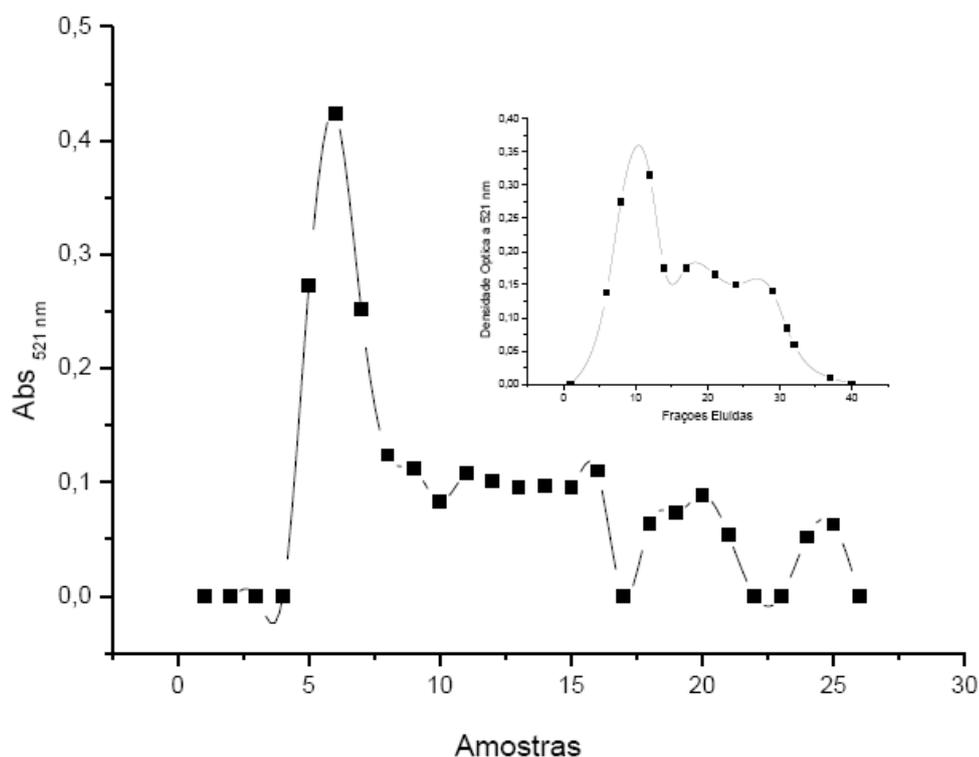
**Tabela 1:** Formação de E-GSH com a ação do DTT sobre a E-GSH através da variação de fluorescência obtida em varredura espectrofluorimétrica em diferentes tempos de tratamentos realizados.

Tempo de incubação (minutos)	$\Delta F_{542nm}$	Formação de E-GSH, nM	Velocidade de formação de E-GSH, $nM.min^{-1}$
0	0,61	1,41	0,06
5	0,68	1,58	0,07
15	0,75	1,74	0,07
60	0,58	1,35	0,06

Pela análise da Tabela 1 referente à formação de E-GSH a partir da variação de fluorescência por varredura no espectrofluorímetro percebe-se a formação basal de monômeros de E-GSH da ordem de 1 nanomolar, o que não é considerável. Como foi obtido menos que 1 u.a. no sinal de emissão de fluorescência (542nm), extraído do gráfico sobreposto (média de 0,65 u.a.) fica claro que a sonda monomérica não é reduzida pelo DTT por estar em sua forma simples, sem pontes dissulfeto. Com isso, pretendeu-se mostrar a ausência desse sinal de emissão comprovando a pureza da sonda E-GSH.

### 6.3. Síntese da sonda Di-E-GSSG

Seguindo os princípios descritos pelo trabalho realizado por Raturi, A. et al., 2007, adaptando-se à pesquisa realizada, após cromatografia em resina Sephadex G-25 ® (Sigma Aldrich) e eluição da sonda Di-E-GSSG, tomaram-se alíquotas de todas as frações eluídas e, com varredura espectral foi detectado que o comprimento de onda de maior absorbância foi  $\lambda=521$  nm, resultado semelhante àquele descrito por Raturi, A. et al., 2007. Foram feitas então, as leituras dos valores de densidade óptica em espectrofotômetro nesse comprimento de onda de todas as frações eluídas.



**Figura 20.** Resultado da cromatografia da sonda Di-E-GSSG em Sephadex G-25, tampão fosfato 0,1M, pH 7,0. Gráfico sobreposto: densidade óptica da sonda Di-E-GSSG após 72h em temperatura ambiente mostrando o mesmo padrão de eluição do composto.

As frações eluídas com maiores valores de absorbâncias (5 a 16) foram reunidas em “pool” e o resultado da absorbância do mesmo foi  $Abs_{521nm}=0,152$ , a partir do qual, através da equação da Lei de Beer, foi calculada sua concentração molar,  $1,727 \mu\text{M}$ , utilizando o coeficiente de extinção molar da eosina ( $\epsilon_{eosina}=88.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Obtivemos, assim, um rendimento de 1,72%. Nas várias vezes que foram feitas as cromatografias, a concentração

máxima obtida do “pool” foi de 5,25  $\mu\text{M}$ , e, como a concentração limitante de GSSG utilizada foi de 100  $\mu\text{M}$ , obteve-se o rendimento máximo de 5,25%.

A sonda mostrou-se igualmente estável a diferentes temperaturas, apresentando densidade óptica inalterada durante 72 horas, conforme ilustra uma varredura de todas as alíquotas obtidas da cromatografia em Sephadex G-25 sobreposta na Figura 20.

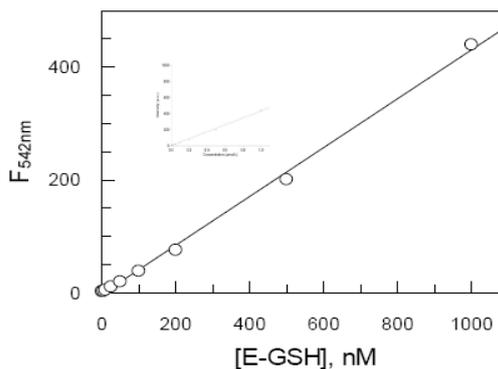
#### 6.4. Quantificação de fluorescência emitida a 542nm pela clivagem da sonda Di-E-GSSG

A Di-E-GSSG, quando reduzida, emite fluorescência a 542 nm. Essa emissão de fluorescência é devida a quebra de ponte dissulfeto presente na estrutura química e que causa a liberação de sua forma monomérica, a E-GSH. Logo, para a quantificação da concentração do produto formado, foi realizada a padronização da reta de calibração que quantifica a emissão de fluorescência a 542 nm em valores nanomolares de E-GSH. Para tanto, foram preparadas diferentes concentrações de E-GSH: 5, 10, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000, 5000 e 10000 nM as quais foram lidas em triplicata pelo aparelho (Figura 21):

<u>Calibration</u>		
Collection time	7/2/2010 5:39:04 PM	
Standard	Concentration $\mu\text{mol/L}$	F Readings
Std 1	0.0005	2.992
Std 2	0.0010	2.634
Std 3	0.0050	3.500
Std 4	0.0100	5.379
Std 5	0.0250	10.924
Std 6	0.0500	19.882
Std 7	0.1000	38.743
Std 8	0.2000	75.972
Std 9	0.5000	201.010
Std 10	1.0000	439.599
Calibration eqn	Int = 430.08984*Conc	
Correlation coefficient	0.99761	
Calibration time	7/2/2010 5:52:08 PM	

**Figura 21.** Leitura feita pelo espectrofluorímetro para construção da reta de calibração.

A partir desse resultado, foi extrapolada a reta de calibração:



$$F_{542\text{ nm}} = [E - GSH], \text{nM} \cdot 0,4301$$

$$[E - GSH], \text{nM} = \frac{F_{542\text{ nm}}}{0,4301}$$

$$R^2 = 0,9976$$

**Figura 22.** Retas de calibração obtida pela determinação de [E-GSH], nM e intensidade de fluorescência (u, 542 nm) feita pelo espectrofluorímetro.

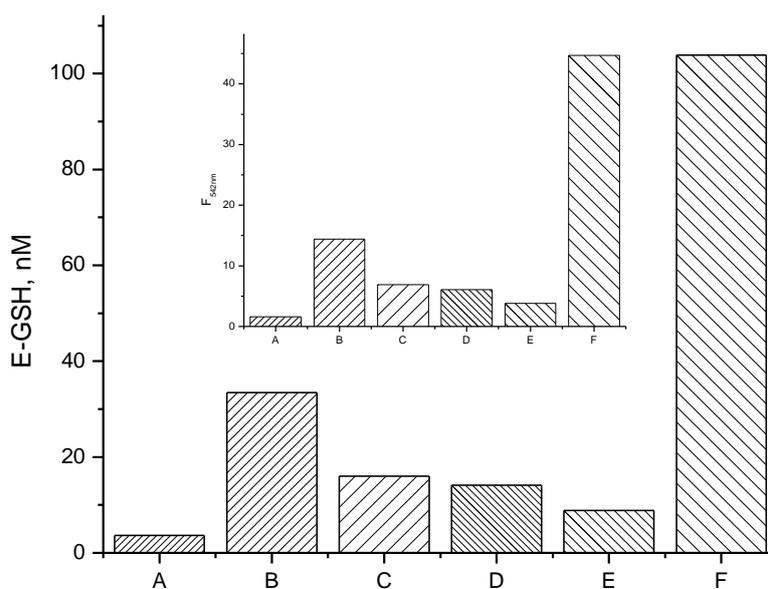
Dos resultados de intensidade de fluorescência obtidos nos experimentos, foram calculadas as concentrações finais do produto (E-GSH) em nanomoles através de divisão do resultado obtido por 0,4301. O coeficiente de correlação encontrado foi o de 99,761% (Figura 22). Todos os experimentos em que se necessitou da quantificação de E-GSH foram baseados nessa curva de calibração.

### 6.5. Tratamento da sonda Di-E-GSSG com DTT em diferentes intervalos de tempo

Para que a redução seja efetiva e na estequiometria adequada, o DTT deve ser preparado em uma proporção que seja compatível com a redução de um número tal de moléculas da sonda que, conseqüentemente, seja fácil e visualmente detectado no espectrofluorímetro. Isto se deve pelo fato de haver um limite de detecção máximo do aparelho. Percebeu-se, através de repetidos testes o ponto ótimo na concentração final de 150 nM da sonda para análise, o que foi de encontro com aquele utilizado por Raturi, A. et al., 2007. Assim, foi feita a preparação de DTT no valor de concentração final de 150 μM, 1.000 vezes a da sonda, incubados em banho maria (37°C) em diferentes intervalos de tempo: 0, 5, 15 e 60 minutos. A leitura no espectrofluorímetro foi feita no intervalo de tempo de 10 minutos. Além disso, realizou-se a cinética da ação do DTT sobre a Di-E-GSSG até 60

minutos, também determinada através de emissão de fluorescência e um outro teste de redução da sonda com o DTT na concentração final de 0,5 mM. No preparo das amostras, foi utilizada a quantidade de 100  $\mu$ L da sonda, 100  $\mu$ L de DTT e o restante completado com tampão pH 7,00 em cubeta de 1mL. As amostras foram tomadas em triplicata e foi feita a varredura no espectrofluorímetro ( $\lambda_{exc}=521\text{nm}$ ), analisando-se a emissão de fluorescência a 542 nm.

Pelos resultados obtidos, a sonda Di-E-GSSG foi reduzida pelo DTT em todos os tempos de incubação causando um aumento de fluorescência devido à quebra da ligação dissulfeto e consequente liberação dos monômeros E-GSH fluorescentes, resultado já mostrado anteriormente por Raturi, A. et al., 2007.



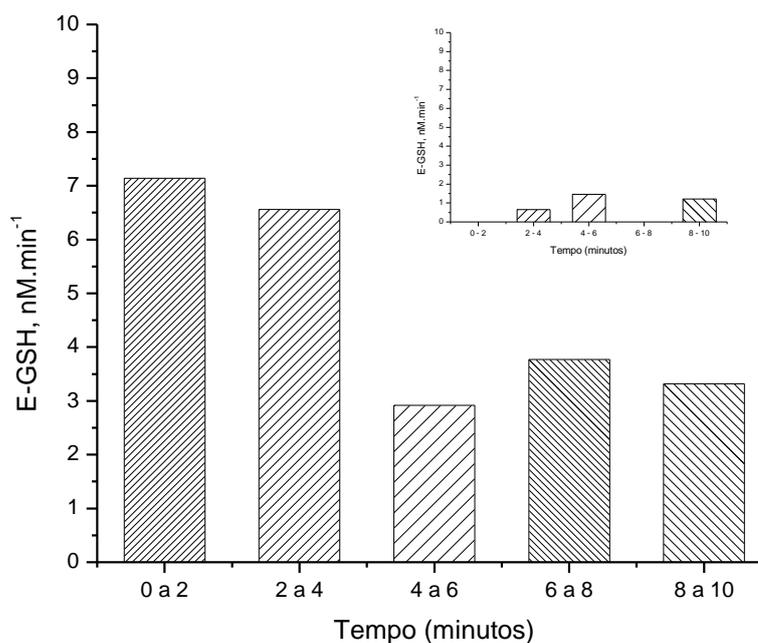
**Figura 23.** Formação de E-GSH com a ação do DTT sobre a Di-E-GSSG através da variação de emissão de fluorescência observado no gráfico sobreposto com a emissão de fluorescência a 542 nm em cada tratamento realizado. A) Sonda Di-E-GSSG a 150nM sem adição de DTT, B) Sonda Di-E-GSSG a 150nM com DTT a 150  $\mu$ M (Tempo zero), C) Sonda Di-E-GSSG a 150nM com DTT a 150  $\mu$ M (Tempo 5 minutos), D) Sonda Di-E-GSSG a 150nM com DTT a 150  $\mu$ M (Tempo 15 minutos), E) Sonda Di-E-GSSG a 150nM com DTT a 150  $\mu$ M (Tempo 60 minutos) e F) Sonda Di-E-GSSG a 150nM com DTT a 0,5mM (Tempo 0 minutos).

Percebe-se que essa redução da sonda é praticamente estabilizada entre 5 e 60 minutos em uma formação de produto decrescente (Figura 23, valores em B, C, D e E). Observa-se que há uma estimativa basal de emissão de fluorescência quando a sonda não é tratada com agente redutor (Figura 23, valor A), ou seja, a sonda pura que nesse caso gerou apenas 1,58

unidades de fluorescência (3,67 nanomoles de E-GSH) no intervalo de leitura de 10 minutos, o que é insignificante e mostra sua estabilidade.

Visando assegurar todos os dados até então obtidos, um foi realizado teste com o DTT na concentração final de 0,5 mM, 3333 vezes mais concentrado que a sonda, e os resultados foram diferenciados (Figura 23, valor F). Do valor basal (Di-E-GSSG na ausência de DTT) ao maior valor emitido de fluorescência (Di-E-GSSG na presença de DTT a 150  $\mu$ M no tempo zero de incubação), houve um aumento de 29,78 vezes, quantificado pela formação de 33,46 nanomoles de E-GSH. A ação do DTT foi instantânea, uma vez que reduziu a sonda imediatamente em sua totalidade (Figura 23, valor B).

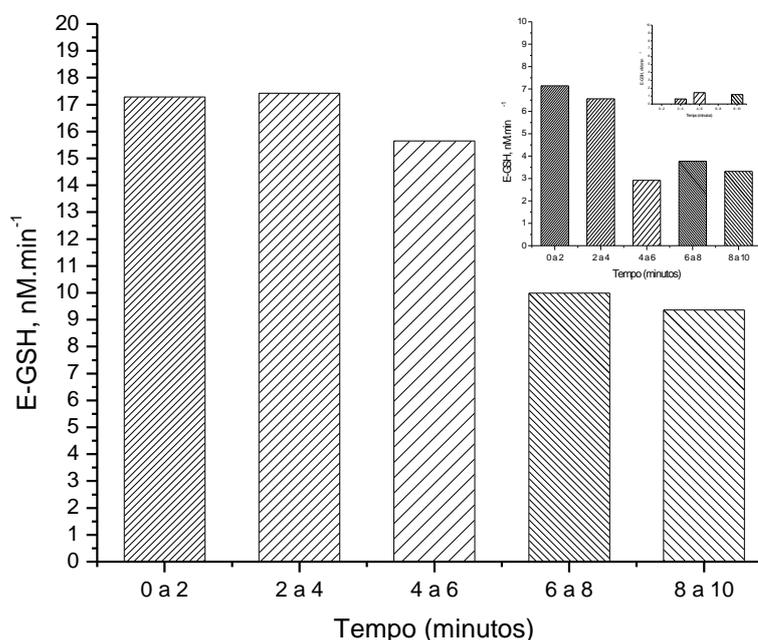
Para confirmar esse dado, extrapolou-se nesse valor, o intervalo de tempo entre 0 e 10 minutos, através da velocidade de formação de E-GSH (E-GSH,nM.min<sup>-1</sup>) conforme mostra a Figura 24.



**Figura 24.** Velocidade de formação de E-GSH no intervalo de tempo entre 0 e 10 minutos no tratamento da Di-E-GSSG a 150 nM na presença de DTT a 150 $\mu$ M. O gráfico sobreposto são os resultados da velocidade basal de formação de E-GSH quando a Di-E-GSSG é incubada na ausência de DTT no intervalo de 0 a 10 minutos.

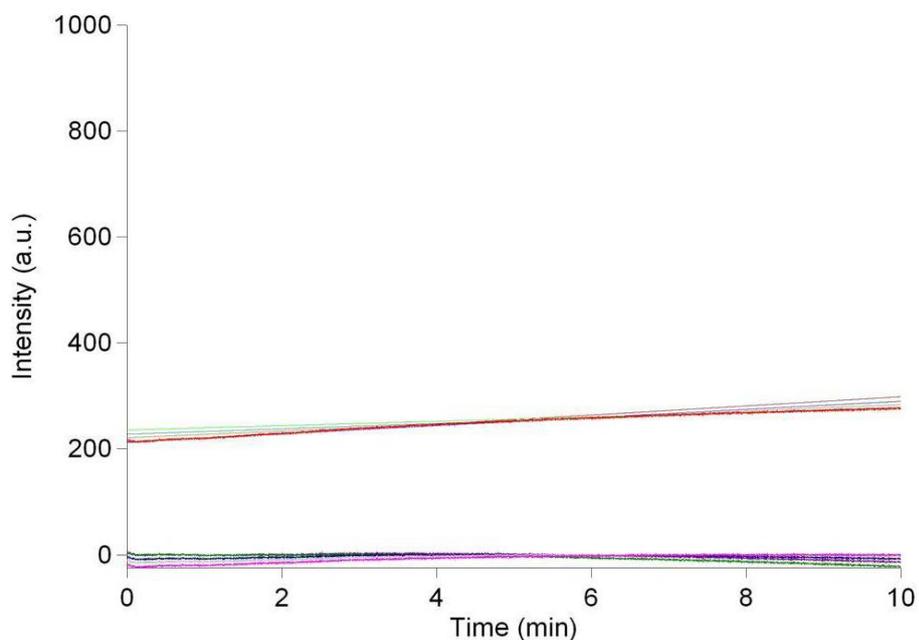
Comparando-se com a velocidade de formação da sonda na ausência de redutor, o qual foi na média de 0,24 E-GSH,nM.min<sup>-1</sup>, valores significativos de velocidade da ordem de 2,92 a 7,14 E-GSH,nM.min<sup>-1</sup> foram encontrados.

Já no tratamento da sonda com o DTT a 0,5 mM (Figura 25), houve a formação de aproximadamente 104 nanomoles de E-GSH. Nesse caso, o rendimento de 100% em se falando da redução completa de 150 nanomoles de Di-E-GSSG seria a quantidade de 300 nanomoles de E-GSH. Logo, calculando-se o rendimento da redução da Di-E-GSSG pelo DTT a 0,5 mM, o resultado foi considerável, 34,63%. Isso mostra que a Di-E-GSSG foi reduzida na proporção de 3:1 (formou-se um terço do total teórico de 100% de redução da sonda).



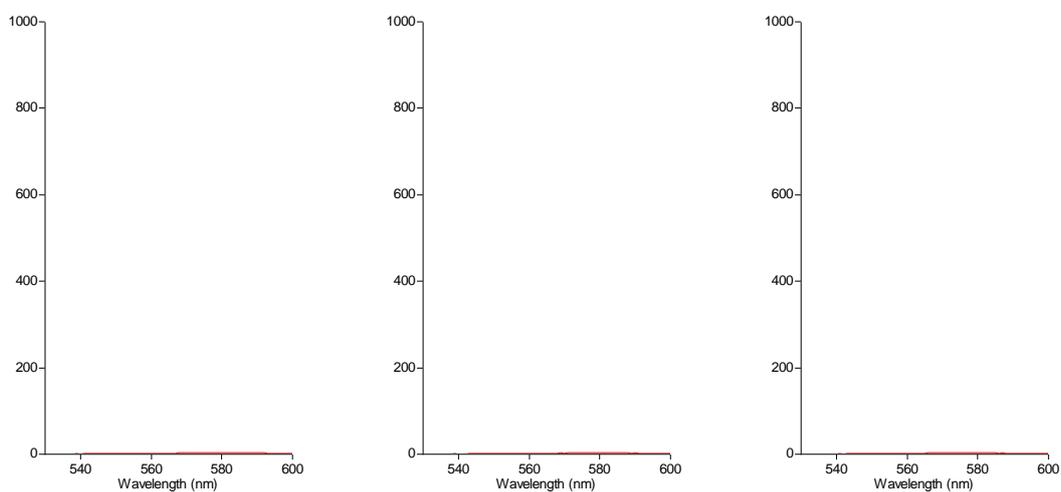
**Figura 25.** Velocidade de formação de E-GSH no intervalo de tempo entre 0 e 10 minutos no tratamento da Di-E-GSSG a 150 nM na presença de DTT a 0,5 mM. Os gráficos sobrepostos são os resultados da velocidade basal de formação de E-GSH quando a Di-E-GSSG é incubada na ausência de DTT no intervalo de 0 a 10 minutos e os resultados da velocidade da Di-E-GSSG a 150 nM na presença de DTT a 150µM no intervalo de 0 a 10 minutos.

A ação do DTT nessa concentração foi bem visualizada no espectrofluorímetro, o que fez com que o resultado de varredura tivesse uma reta crescente bem definida (Figura 26).



**Figura 26.** Cinética da ação do DTT na redução da sonda Di-E-GSSG. Gráfico obtido diretamente do espectrofluorímetro mostrando a inclinação positiva da reta nos intervalos de tempo analisados.

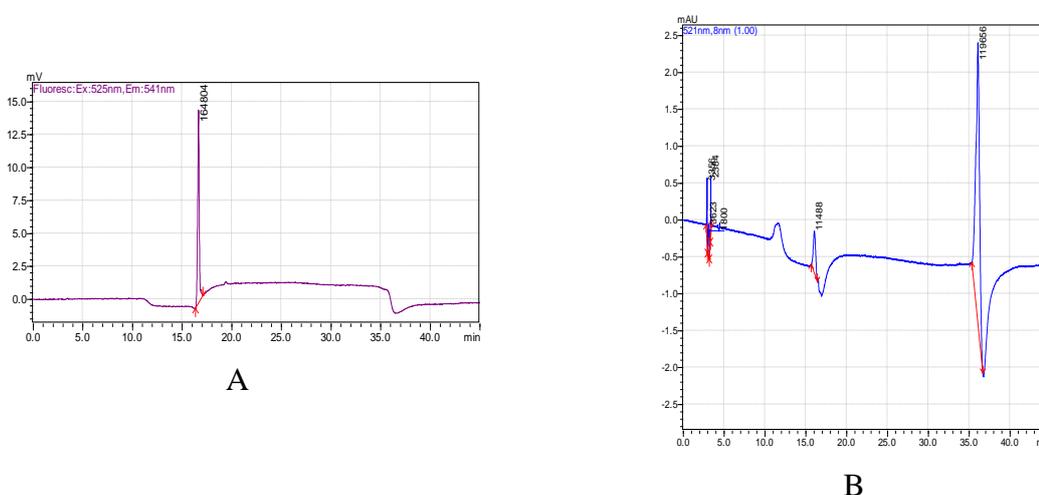
Foi feita uma varredura fluorimétrica para elucidar se DTT, GSSG ou GSH poderiam interferir nos espectros dos experimentos e os resultados mostraram que os mesmos não interferem na detecção de fluorescência (Figura 27).



**Figura 27.** Espectro de fluorescência do DTT, GSSG e GSH respectivamente, mostrando ausência de sinal de emissão de fluorescência a 542 nm ( $\lambda_{exc}=521$  nm).

## 6.6. Análise por CLAE da sonda sintetizada após redução com DTT

Amostras da sonda Di-E-GSSG após redução foram separadas e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a um detector de fluorescência. A fluorescência da eosina 5-isotiocinato foi utilizada para identificar os adutos E-GSH e Di-E-GSSG, esse último após redução com DTT, para validação do ensaio. A análise cromatográfica de E-GSH por CLAE mostrou um pico predominante, identificado por emissão de fluorescência, com tempo de retenção igual a 16,4 min (Figura 28 A). O espectro obtido em DAD (faixa 190-700 nm) está mostrado na Figura 28 B.



**Figura 28.** A) Cromatograma típico obtido por CLAE de E-GSH ( $\lambda_{exc}=521$  nm;  $\lambda_{emi}=542$ nm) e B) Espectro obtido em DAD.

A análise cromatográfica do composto Di-E-GSSG, após redução com DTT, mostrou também um único pico predominante detectado por emissão de fluorescência, nas mesmas condições.

O tempo de retenção de E-GSH (16,4 minutos) foi levemente alterado em relação ao tempo de retenção de GSH padrão (12,5 minutos; Chavasco et al., 2009). Esse deslocamento foi devido à presença de eosina 5-isotiocinato que alterou a polaridade do analito, causando, conseqüentemente, aumento de afinidade desse com a resina utilizada.

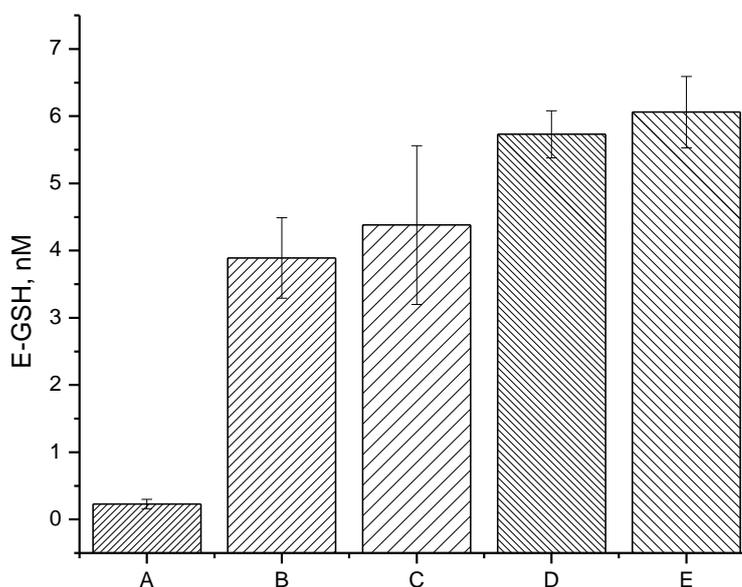
A análise dos resultados cromatográficos mostraram que a redução da Di-E-GSSG por DTT formou, primordialmente, E-GSH, fato confirmado pelos espectros obtidos em 521nm.

### 6.7. Efeito da atividade da PDI sobre a sonda Di-E-GSSG

Incubou-se a sonda Di-E-GSSG a 150nM com concentrações variáveis de PDI (entre 5 e 160nM) na presença de DTT a 5 $\mu$ M, e foram feitas as leituras de emissão de fluorescência no espectrofluorímetro. Complementar a isso, foi feita a cinética de cada tratamento por intervalos de 2 minutos em um tempo total de varredura de 10 minutos, obtendo-se valores iniciais e finais de unidade de fluorescência. Assim, de acordo com todos intervalos de tempo programados no aparelho, foram tomadas diferentes velocidades para cada experimento, compondo desse modo os resultados em triplicata mais significativos, os quais foram transformados através da reta de calibração bem como tabulados e expressos como média $\pm$ d.p. das triplicatas (Tabela 2).

A atividade da PDI sobre a Di-E-GSSG foi calculada retirando a diferença de emissão de fluorescência basal da sonda na ausência de PDI, ou seja, a variação de fluorescência.

Deste modo, o cálculo da quantidade de E-GSH formado foi devidamente realizado e expresso conforme Figura 29.



**Figura 29.** Formação de E-GSH, nM. A) Di-E-GSSG com DTT a 5 $\mu$ M na ausência de PDI (0,23 $\pm$ 0,07), B) Di-E-GSSG com DTT a 5 $\mu$ M na presença de PDI a 5nM (3,89 $\pm$ 0,60), C) Di-E-GSSG com DTT a 5 $\mu$ M na presença de PDI a 20nM (4,38 $\pm$ 1,18), D) Di-E-GSSG com DTT a 5 $\mu$ M na presença de PDI a 40nM (5,73 $\pm$ 0,35) e E) Di-E-GSSG com DTT a 5 $\mu$ M na presença de PDI a 160nM (6,06 $\pm$ 0,53).

Pela análise destes dados, à medida que se aumentou a concentração de PDI, houve um aumento na liberação do produto, a sonda monomérica E-GSH, liberada através da quebra da ponte dissulfeto da Di-E-GSSG quantificado através da emissão de fluorescência. Esse aumento foi crescente até na concentração de 160 nM, permanecendo constante após essa concentração, demonstrando a saturação da enzima após adição de quantidades superiores a 40 nM de PDI, o que demonstra a sensibilidade do ensaio para a atividade de redutase da enzima. Para a padronização dos experimentos onde se quis manter a concentração da PDI fixa, foi escolhido o valor de 20nM.

Este ensaio pode ser facilmente otimizado para monitorar a atividade de redutase de outras enzimas da família da PDI, mesmo que em concentrações nanomolares.

Um dos grandes diferenciais do estudo da sonda da sonda Di-E-GSSG é que seu padrão de fluorescência somente sofreu alteração linear nos picos correspondentes a 542nm. Como a emissão característica da quebra da ponte dissulfeto na estrutura do dímero Di-E-GSSG leva a um aumento de fluorescência detectado nesse comprimento de onda, relativo à presença do monômero E-GSH, pode-se concluir que a redução enzimática com PDI produziu esse composto fluorescente de forma uniforme, permitindo ensaios enzimáticos em concentrações definidas de PDI e do pseudo-substrato aqui testado.

## **6.8. Cinética da redução da Di-E-GSSG pela PDI**

### *6.8.1. Tratamento da Di-E-GSSG a 150nM com DTT a 5 $\mu$ M e PDI a diferentes concentrações*

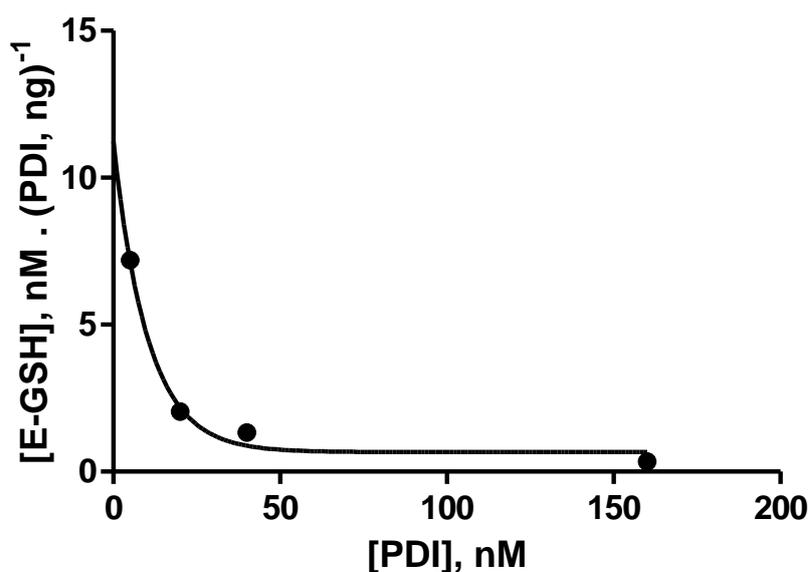
A sonda a 150 nM foi tratada com o DTT em uma concentração mínima de 5 $\mu$ M, na presença de PDI a diferentes concentrações, variando desde 5 nM até 160 nM. Os resultados das varreduras no espectrofluorímetro para a quantificação da formação do produto e outros parâmetros seguem conforme Tabela 2:

**Tabela 2:** Parâmetros molares quando do tratamento da sonda Di-E-GSSG a 150nM, com DTT a 5 $\mu$ M e PDI a diferentes concentrações.

[DTT], $\mu$ M	[Di-E- GSSG], nM	[PDI], nM	Quantidade de PDI em ng	[E-GSH], nM TOTAL	[E-GSH], nM/ng de PDI	Velocidade de formação de E-GSH, nM.min <sup>-1</sup>
-	150	-	-	-	-	-
5	150	-	-	0,23 $\pm$ 0,07	-	0,02 $\pm$ 0,01
5	150	5	0,54	3,89 $\pm$ 0,60	7,20	0,39 $\pm$ 0,06
5	150	20	2,15	4,38 $\pm$ 1,18	2,04	0,44 $\pm$ 0,12
5	150	40	4,30	5,73 $\pm$ 0,35	1,33	0,57 $\pm$ 0,04
5	150	160	17,2	6,06 $\pm$ 0,53	0,35	0,61 $\pm$ 0,05

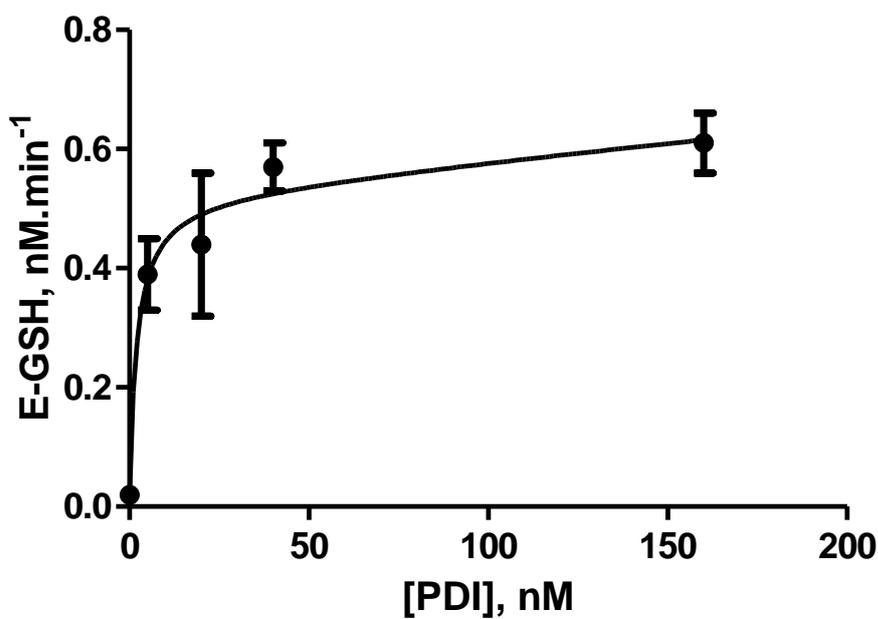
No experimento com a sonda pura a 150 nM, ou seja, ausente de agentes redutores, não se verificou a presença de E-GSH. Já quando incubada na concentração mínima de DTT a 5 $\mu$ M, houve um acréscimo na formação de E-GSH em 0,23 $\pm$ 0,07nM. No caso, esse mínimo de agente redutor na solução foi necessário para deixar a PDI em sua forma reduzida, facilitando sua ação, e, como demonstrado, a presença dessa quantidade mínima de DTT não afeta a redução da sonda, tornando-se um quantitativo basal.

Com a adição da PDI nas concentrações de 5, 20, 40 e 160 nM, verificou-se sua atividade através do aumento da concentração de E-GSH. Visando o aprofundamento na questão da catálise da enzima, foram calculadas as quantidades de E-GSH por PDI, dividindo-se o primeiro valor em nanomoles pelo segundo valor contido em nanogramas de PDI (Figura 30):



**Figura 30.** Relação entre [PDI] (nM) e [E-GSH] (nM/ng de PDI), mostrando a atividade catalítica redutase da PDI sobre o substrato (Di-E-GSSG).

Como a saturação da enzima ocorre com valores superiores a 40nM, como demonstrado no gráfico da Figura 30, a fim de se confirmar os valores e extrapolar a análise, foi realizada a cinética da enzima quantificando a formação de E-GSH por minuto. Os resultados da Figura 31 abaixo confirmam o esperado.



**Figura 31.** [PDI], nM x E-GSH, nM.min<sup>-1</sup>, mostrando a saturação da enzima. R<sup>2</sup>=91,66.

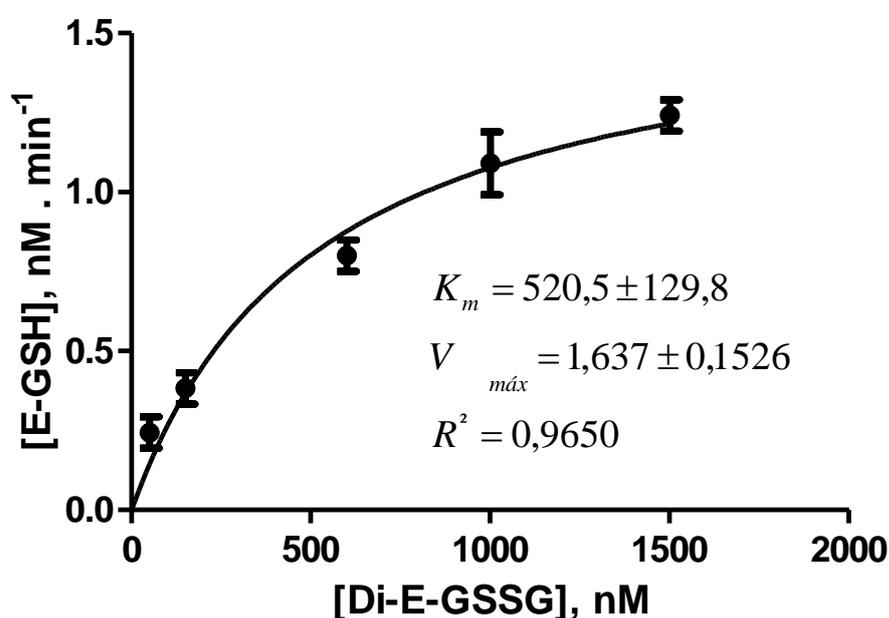
#### 6.8.2. Variação da concentração da Di-E-GSSG e PDI fixa a 20nM

A sonda foi incubada a diferentes concentrações, variando entre 50 e 1200 nM na presença de PDI a 20 nM, concentração esta, padronizada de acordo com os testes feitos anteriormente. Feita a varredura espectrofluorimétrica e a contabilização dos dados na forma de concentração do produto, a sonda monomérica, a qual teve seu aumento de fluorescência a 542 nm. Para a análise da cinética química e a confecção dos gráficos de Michaelis-Menten e Lineweaver Burke, em seus valores da velocidade e concentração do substrato, foram calculados também, seus valores inversos (Tabela 3):

**Tabela 3:** Valores da [E-GSH], nM e  $K_{eq}$ , Di-E-GSSG a diferentes concentrações.

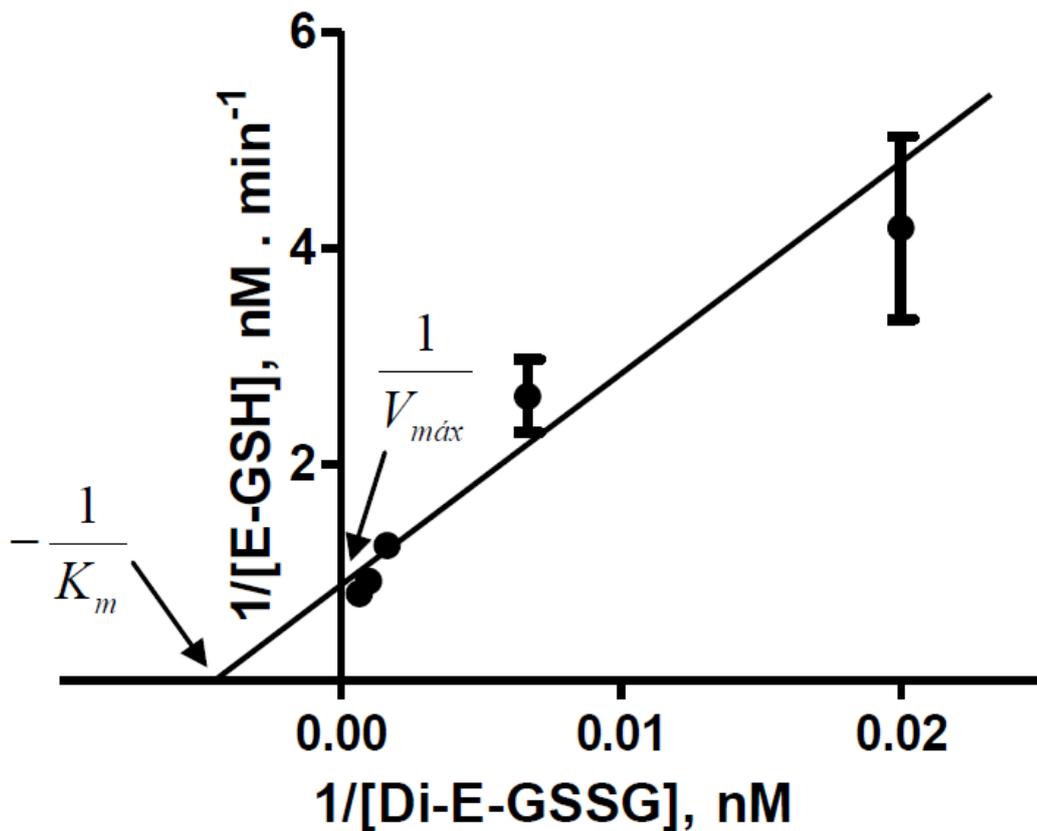
[Di-E-GSSG], nM	1/[Di-E-GSSG], nM	[E-GSH], nM . min <sup>-1</sup>	1/[E-GSH] nM, min <sup>-1</sup>
50	0,02000	0,24±0,05	4,19±0,84
150	0,00667	0,38±0,05	2,63±0,33
600	0,00167	0,80±0,05	1,25±0,07
1000	0,00100	1,09±0,10	0,92±0,08
1200	0,00067	1,24±0,05	0,80±0,03

A partir dos dados da concentração da sonda e da concentração do produto, plotou-se o gráfico de Michaelis-Menten (Figura 32).



**Figura 32.** Gráfico de Michaelis-Menten. Estimativa de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$ : PDI a 20 nM incubada variando-se as concentrações de Di-E-GSSG (50nM – 1200nM) em tampão fosfato de potássio 0,1M (pH 7) e 2mM de EDTA. Taxas iniciais de formação de E-GSH foram monitoradas como uma função de [Di-E-GSSG]. Curva teórica hiperbólica foi plotada com valor de  $K_m$  de  $520,5 \pm 129,8$  nM e  $V_{m\acute{a}x}$  de  $1,637 \pm 0,1526$  nM.min<sup>-1</sup>.  $R^2=96,50$ .

Os cálculos das constantes enzimáticas ( $K_m$ ,  $V_{m\acute{a}x}$  e  $K_{cat}$ ) foram obtidos a partir dos gráficos de Michaelis-Menten (Figura 32) e Lineweaver-Burke (Figura 33), esse construído com os dados dos duplos recíprocos da Tabela 3.



**Figura 33.** Gráfico de Lineweaver-Burke. Estimativa de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  pelos valores duplos recíprocos de [Di-E-GSSG] e [E-GSH] .  $\text{min}^{-1}$ .  $R^2=94,80$ . Valor de  $p=0,005$ . Significativo.

A equação que o descreve é:

$$y = (171,6 \pm 23,20) x + (0,9312 \pm 0,2197) \quad (\text{XI})$$

De posse dos dados da concentração total da enzima (20 nM), usada no experimento e  $V_{m\acute{a}x}$  de  $1,637 \text{ nM} \cdot \text{min}^{-1}$  calculamos a constante catalítica ( $K_{cat}$ ) através da equação:

$$K_{cat} = \frac{V_{m\acute{a}x}}{E_{Total}} \quad (\text{XII})$$

$$K_{cat} = \frac{1,637}{20} = 0,0818 \quad (\text{XIII})$$

$$K_{cat} = 0,0818 \text{ min}^{-1} \quad (\text{XIV})$$

$\therefore$  Transformando para  $\text{s}^{-1}$ :

$$K_{cat} = \frac{0,0818}{60} s^{-1} \quad (XV)$$

$$K_{cat} = 0,001364. s^{-1} \quad (XVI)$$

A eficiência catalítica ou constante de especificidade, que é a razão entre a  $K_{cat}$  e  $K_m$  é calculada, transformando-se a  $K_{cat}$  em segundos e o  $K_m$  em mol:

$$\frac{K_{cat}}{K_m} = \frac{0,001364. s^{-1}}{520,5.10^{-9}M} = 2,62.10^3 M^{-1}s^{-1} \quad (XVII)$$

A atividade de redutase da PDI aumentou como uma função da concentração da sonda, com o  $K_m$  de  $520,5 \pm 129,8$  nM, o que está dentro dos valores estatísticos daquele obtido por Raturi, A. et al., 2007 ( $K_m$  aparente de  $650 \pm 40$  nM). O valor da  $V_{máx}$  foi estimado em  $1,637 \pm 0,1526$  nM de E-GSH.min<sup>-1</sup>, que não correlaciona àquele encontrado pelos autores (125 nM de E-GSH.min<sup>-1</sup>) pois como explicado anteriormente a isoforma da PDI utilizada para o experimento foi diferente daquela que os autores utilizaram. O que explica isso é a eficiência catalítica da enzima, o que por definição é a medida de quão eficientemente uma enzima converte o substrato ao produto em baixas concentrações de substrato. Suas unidades são calculadas em M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> e o valor encontrado nesse ensaio foi o de  $2,62.10^3$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>. Para que o substrato se converta ao produto, as moléculas de substrato e da enzima devem primeiro colidir por difusões randômicas ou aleatórias e então combinarem-se em uma correta orientação. A difusão e colisão têm um limite teórico no valor de aproximadamente  $10^9$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>. O valor encontrado em relação àquele descrito por Raturi, A. et al., 2007 ( $8,9.10^4 \pm 0,18$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>) foi 34 vezes menor, o que confirma a diferente eficiência catalítica relacionada às diferentes isoformas de PDI.

A constante catalítica encontrada foi da ordem de  $1,364.10^{-3}.s^{-1}$ , o que é, por definição, o número de moles de substrato que podem ser convertidos em produto por mol de enzima em unidade de tempo, nesse caso, seria a quantidade molar de Di-E-GSSG que pode ser convertida em E-GSH por mol de PDI em segundos.

## 6.9. Modulação de nitróxidos sobre a atividade da PDI

Incubou-se a sonda Di-E-GSSG a 150nM e a PDI a 20nM tratada com 5 $\mu$ M de DTT. Concentrações variáveis (10 a 160nM) do Tempol e de nitróxidos especificamente sintetizados para esse estudo, nomeados pelos códigos: Redoxoma 4 (NR4), Redoxoma 9 (NR9) e Redoxoma 10 (NR10) foram adicionadas à solução e foram feitas as leituras no espectrofluorímetro, de emissão de fluorescência padrão e suas respectivas cinéticas no intervalo de tempo de 15 minutos, sendo analisados 5 intervalos de 3 minutos cada. Destes, os 3 resultados mais significativos foram contabilizados como média $\pm$ d.p. A Tabela 4 abaixo mostra a porcentagem obtida pelos tratamentos descritos:

**Tabela 4.** Inibição catalítica baseada nas velocidades de reação quando a Di-E-GSSG a 150 nM é tratada com PDI a 20 nM e incubada com diferentes nitróxidos a diferentes concentrações. n=3.

Nitróxido	% de inibição da atividade catalítica da PDI					
	10nM	20nM	40nM	80nM	160nM	Média
NR4	36,25	43,00	11,50	25,25	20,00	<b>27,20</b>
NR9	38,25	18,50	13,75	23,25	25,50	<b>23,85</b>
NR10	11,75	19,75	21,75	13,50	20,00	<b>17,35</b>
Tempol	25,50	28,00	10,25	26,50	10,00	<b>20,05</b>

Percebe-se que o nitróxido Redoxoma 4 (NR 4) nesse caso foi o que obteve, em uma média geral, a melhor porcentagem de inibição da PDI, até mesmo melhor que o protótipo utilizado para sua síntese, o Tempol.

Como forma de melhor avaliar a atividade desses nitróxidos, variou-se a concentração da Di-E-GSSG entre 75 e 600 nM, na presença da PDI a 20 nM (tratada com 5 $\mu$ M de DTT), adicionando-os a 50nM no meio reacional e realizando prontamente a cinética no espectrofluorímetro. Dessa vez, foram usados também os inibidores padrão Bacitracina e DTNB e utilizada a metodologia de 5 minutos de leitura e retirados 5 valores intermediários para análise, que foi feita com os 3 melhores resultados.

De acordo com a Tabela 5, demonstrou-se a inibição da formação de E-GSH em nanomoles:

**Tabela 5.** Inibição catalítica quando a Di-E-GSSG a 75, 150, 300 e 600 nM é tratada com PDI a 20 nM e incubada com diferentes nitróxidos a 50nM.

\* Inibidores padrão de PDI.

\*\* Inibidor da PDI que foi o protótipo para a síntese dos nitróxidos Redoxoma 4, 9 e 10.

TESTE DE INIBIÇÃO	[Di-E-GSSG], nM				Média de formação de E-GSH, nM
	75	150	300	600	
Identificação do inibidor	Formação de E-GSH, nM				
Bacitracina*	52,71	2,12	0	0	13,71
DTNB*	0	0	0	0	0
Tempol**	0	14,43	7,81	21,44	10,92
Nitróxido Redoxoma 4	2,86	2,20	2,03	2,55	2,41
Nitróxido Redoxoma 9	0	5,54	4,61	21,13	7,82
Nitróxido Redoxoma 10	23,62	1,50	0	0	6,28

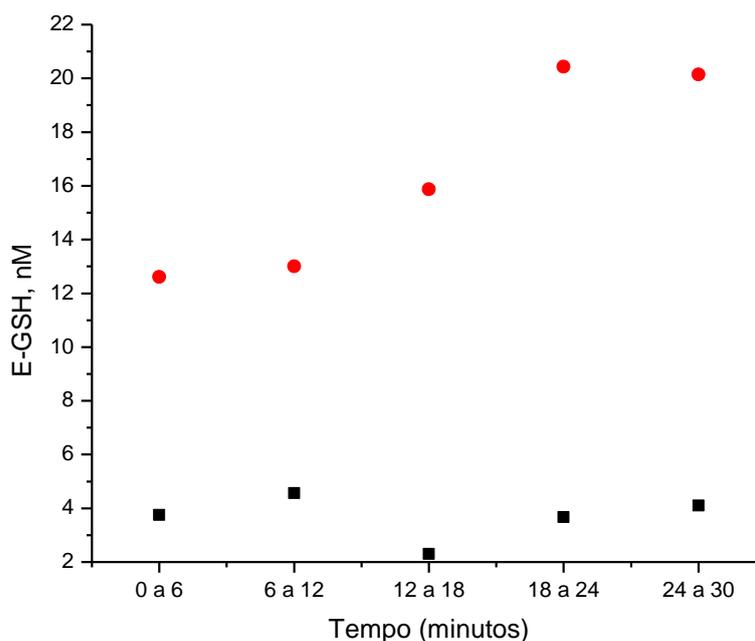
Baseado nos valores médios, percebe-se que os nitróxidos sintetizados foram mais efetivos que o Tempol e a Bacitracina, sendo o NR4 o melhor deles confirmando o teste anterior (Tabela 4). Por outro lado, foi demonstrado que o DTNB inibe a atividade catalítica da PDI em todas concentrações de Di-E-GSSG, não havendo formação de E-GSH.

Por fim, para se comparar e chegar às conclusões finais, um modelo de teste *ex vivo* foi realizado, nos mesmos moldes daquele descrito por Raturi, A. et al., 2007, no qual utilizou plaquetas humanas (possuem PDI em sua superfície celular [psPDI]) em diferentes concentrações de plaquetas por meio reacional. Este método foi adaptado para o estudo com inibição enzimática por nitróxidos e a concentração final no experimento foi ajustada para  $4.10^7$  plaquetas por mL. A fim de se discutir a atividade da psPDI, foram feitos tratamentos com todos os nitróxidos sempre na presença de DTT a  $5\mu\text{M}$  e da Di-E-GSSG a 150 nM. A concentração final de todos inibidores foi ajustada para 0,34 mM.

Observa-se através dos resultados de Raturi, A. et al., 2007, que à medida que se aumenta a concentração das plaquetas, aumenta a atividade da PDI, a qual é monitorada através da liberação dos monômeros E-GSH. A velocidade observada pelos autores da concentração de  $4.10^7$  foi de aproximadamente 0,35 a 0,40 [EGSH],  $\text{nM}\cdot\text{min}^{-1}$ . Os dados dos experimentos realizados com os inibidores seguiram o mesmo padrão, pois foi obtida a mesma atividade da PDI quando as plaquetas foram adicionadas ao meio reacional (Tabela 6, Figura 34).

**Tabela 6.** Formação de E-GSH, nM *ex vivo* ao tratar a Di-E-GSSG a 150 nM com plaquetas ( $4.10^7 \text{ mL}^{-1}$ ) e DTT a  $5\mu\text{M}$ .

Formação de E-GSH, nM <i>EX VIVO</i>	Tempo (minutos)				
	0-6	6-12	12-18	18-24	24-30
Formação média de E-GSH, nM					
Sonda 150 nM + DTT $5\mu\text{M}$	3,75	4,56	2,30	3,67	4,11
Sonda 150 nM + DTT $5\mu\text{M}$ + Plaquetas ( $4.10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$ )	12,60	13,00	15,87	20,43	20,14



**Figura 34.** Formação de E-GSH, nM pela clivagem de Di-E-GSSG a 150 nM na ausência [■] ou presença [●] de plaquetas ( $4.10^7 \text{ mL}^{-1}$ ) e DTT a  $5\mu\text{M}$ .

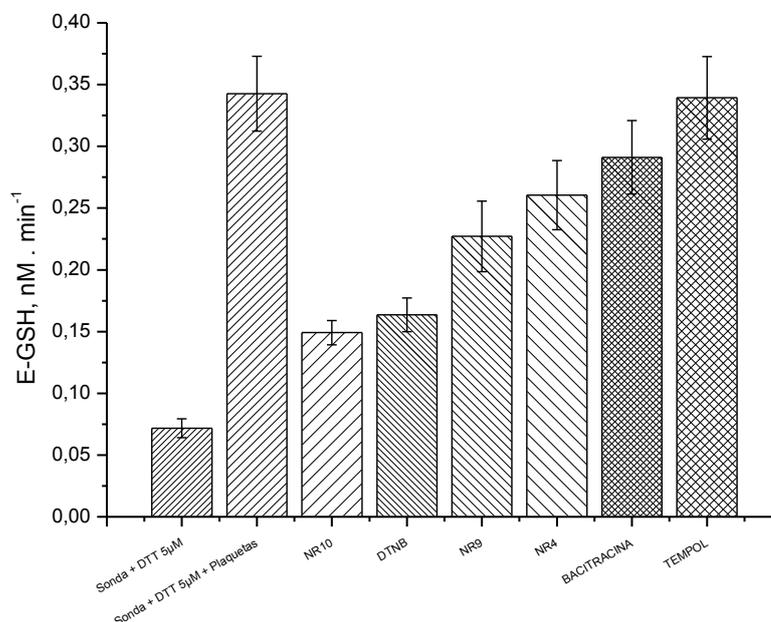
A formação de E-GSH foi da ordem de  $3,68 \pm 0,85 \text{ nM}$  quando tratou-se a Di-E-GSSG somente com DTT a  $5\mu\text{M}$ , o que é um valor basal. Após a incubação com plaquetas na concentração de  $4.10^7 \text{ mL}^{-1}$ , esse valor aumentou para  $16,41 \pm 3,76 \text{ nM}$ , o que revela uma diferença de  $12,73 \pm 2,91 \text{ nM}$  de E-GSH formados, ou seja, cerca de 3,5 vezes o valor basal.

Para testar a atividade dos nitróxidos e inibidores padrão sobre a atividade da PDI, foram incubados na concentração final de  $0,34 \text{ mM}$  à solução, realizando a mesma cinética de 30 minutos, com análise de 5 pontos, retirando-se os 3 melhores resultados (Tabela 7, Figura 35).

**Tabela 7.** Tratamentos cinéticos da Di-E-GSSG a 150nM na presença de DTT a 5 $\mu$ M e plaquetas na concentração final de 4.10<sup>7</sup>mL<sup>-1</sup>. Inibidores a 0,34mM foram adicionados à solução e um ensaio cinético foi realizado no espectrofluorímetro entre 0 e 30 minutos obtendo-se os valores de velocidade de formação de E-GSH.

Tratamentos Cinéticos	Velocidade de formação de E-GSH
	E-GSH, nM . min <sup>-1</sup>
Di-E-GSSG + DTT	0,072±0,008
Di-E-GSSG + DTT + Plaquetas*	0,343±0,030
Bacitracina	0,291±0,030
DTNB	0,164±0,014
Tempol	0,339±0,033
Nitróxido Redoxoma 4	0,261±0,028
Nitróxido Redoxoma 9	0,227±0,029
Nitróxido Redoxoma 10	0,149±0,010

\*Padrão para se comparar a inibição pelos nitróxidos.



**Figura 35.** Velocidades obtidas a partir dos tratamentos cinéticos da Di-E-GSSG a 150nM na presença de DTT a 5 $\mu$ M com plaquetas (psPDI) na concentração final de 4.10<sup>7</sup>mL<sup>-1</sup> e inibidores a 0,34mM.

Os resultados confirmam a atividade catalítica da PDI em membrana plasmática (psPDI) de plaquetas humanas, capaz de catalisar a produção de 0,343±0,030 nM de formação de E-GSH.min<sup>-1</sup>, resultados condizentes com aqueles anteriormente relatados por Raturi, A. et al., 2007. Esta atividade da psPDI foi inibida por DTNB e Bacitracina na porcentagem de 53% e 15%, respectivamente. Mantendo-se concentração idênticas àquelas dos inibidores padrões (0,34 mM), os nitróxidos Redoxoma 4, 9 e 10 inibiram a atividade da psPDI em 24, 34 e 57%, respectivamente. Destaca-se aqui uma tendência de que, conforme aumenta a hidrofobicidade dos grupamentos químicos ligados ao esqueleto piperidínico dos nitróxidos, aumenta-se a eficácia de inibição dos mesmos. O nitróxido Redoxoma 4, que contém o átomo

de enxofre como parte principal da cadeia de ligantes ao anel aromático, é o que apresenta maior massa molecular. Inicialmente, poderia ser levantada a hipótese de que o radical tiólico desse nitróxido seria capaz de bloquear as cisteínas do sítio catalítico CXXC da PDI através de reação covalente com formação de pontes dissulfeto. Os resultados, entretanto, não embasam tal inferência, pois os Redoxoma 9 e 10, que não contêm grupos tiólicos, apresentaram maior eficácia de inibição.

Na estrutura da PDI há um resíduo de cisteína do sítio ativo parcialmente exposto na superfície interna, e, lateralmente, os sítios a, a' e b' na estrutura protéica apresentam sequência de peptídeos hidrofóbicos e uma área hidrofóbica localizada próximo à porção N-terminal da segunda hélice da PDI como descrito na literatura por Appenzeller-Herzog, 2008. Assim, podemos teorizar que Redoxoma 9 e 10, ambos com anéis ligados à estrutura piperidínica do nitróxido apresentaram maior capacidade de inibição de psPDI. No Redoxoma 9, a presença de três átomos de nitrogênio provoca efeito de carga negativa pontual, o que pode favorecer a aproximação ao sítio ativo da PDI, uma vez que uma das cisteínas da sequência CXXC encontra-se na forma de íon tiolato (Jacob et al., 2003). Redoxoma 10, que apresenta um anel aromático fortemente hidrofóbico mostrou-se como o melhor inibidor de psPDI, provavelmente devido ao fato de a estrutura apresentar a melhor conformação, entre os compostos testados, para a ligação à enzima em posição capaz de bloquear a catálise no sítio ativo. Estes dados são condizentes com aqueles descritos por Raturi, A. et al., 2007, nos quais o anel aromático da eosina da sonda Di-E-GSSG foi responsável pela alta afinidade ao sítio ativo hidrofóbico da PDI. Assim, analisando os mesmos parâmetros, os anéis dos nitróxidos Redoxoma poderiam ter maior afinidade ao referido sítio ativo que a sonda fluorescente, inibindo a ação redutase da proteína. Ainda, pelo fato de seu menor tamanho em relação à estrutura da eosina, os nitróxidos se ligariam à região hidrofóbica da PDI mais facilmente.

Embora o Tempol tenha se mostrado capaz de inibir a atividade de PDI isolada (Tabela 4), nos experimentos onde foi testada a atividade de psPDI (Tabela 7), este nitróxido não se mostrou capaz de inibir a atividade catalítica redutase dessa enzima. Esse efeito pode ser decorrente do fato de que foi utilizada concentração baixa dos nitróxidos nos testes realizados. Da mesma forma, o DTNB nas concentrações de 75 a 600nM foi previamente mostrado como capaz de inibir 100% a atividade de PDI isolada e foi necessária maior concentração, cerca de 8333 vezes mais, para se obter inibição expressiva de PDI testada em células (Ryser, H. et al., 1994 & Gallina A., et al., 2002).

Outros trabalhos encontrados na literatura especializada mostram relatos de testes com compostos inibidores de PDI. Nitazoxanida ([2-acetoliloxi-N-(5-nitro 2-tiazolil)

benzamida]), composto desenvolvido originalmente como anti-helmíntico veterinário e que apresenta um amplo espectro como anti-parasitário, foi mostrado como inibidor de PDI presente em *Neospora caninum*. Nestes testes, conduzidos *in vitro* sobre a atividade chaperona de PDI testada sobre o re-enovelamento de insulina, foi mostrada que esta inibição dose-dependente (5-100  $\mu\text{M}$ ) é o mecanismo bioquímico responsável pelo efeito anti-parasitário desse agente tiazolido (Müller, J. et al., 2008). Anteriormente, Horibe e colaboradores (2001) haviam descrito que o anti-biótico ribostamicina, um aminoglicosídeo produzido por *Streptomyces ribosidificus*, cuja estrutura química contém um esqueleto de carboidrato neutro, atua como inibidor de PDI de fígado bovino. Nesse relato, a atividade chaperona foi inibida pela ribostamicina com uma constante de ligação ( $K_D$ ) equivalente a  $3,19 \cdot 10^{-4}$  M e a ação do composto foi descrita como independente da ligação ao sítio catalítico CXXC.

Triiodotironina acetilado (AT3) e óxido de fenilarsina (PAO) foram compostos também mostrados como inibidores de PDI, e descritos como protótipos de agentes farmacológicos capazes de regular funções celulares, dada a importância crescente atribuída à PDI, especialmente associada à infecção por vírus (Gallina A., et al., 2002).

De maneira interessante, ressalta-se que esse último composto citado (PAO) é objeto de requisição de patente como inibidor da chaperona (<http://www.patentstorm.us/patents/6949665/description.html>, consultado em 09 de novembro de 2010, 17h11).

Outros possíveis inibidores de PDI foram propostos através de estudo de modelagem molecular computacional. Tomando-se como base a estrutura de DTNB, foram estudados os compostos ácido tionitrobenzóico, ácido 2-nitro-5-tiocianobenzóico e ácido (5-(3-carboxi-4-nitro-fenil) sulfonil-2-nitrobenzóico), sendo que todos mostraram-se como potenciais inibidores de PDI, com resultados de conformação energeticamente favorável para a ligação aos aminoácidos hidrofóbicos Ala34, Trp36, Cys37, Cys40, His39, Thr68 e Phe80 da estrutura primária da PDI (Gowthamanl, U. et al., 2008).

Recentemente, bisfenol A ([2,2-bis-(4-hidroxifenil) propano]), material industrial utilizado na produção de compostos plásticos, hoje reconhecido como um poluente, é capaz de inibir a atividade de PDI. Os testes, conduzidos em frações de membranas celulares retiradas de células cerebrais de ratos, mostraram que o bisfenol A liga-se à PDI com uma constante de ligação da ordem de  $22,6 \pm 6,6$   $\mu\text{M}$ , impedindo sua atividade isomerase (Hiroi, T., ET AL., 2006). De forma interessante, nesse relato foi proposto este mecanismo como a

explicação para a toxicidade neurológica do bisfenol A, evidenciando claramente a importância da PDI na regulação de diferentes funções celulares.

A atividade de PDI está diretamente relacionada à agregação plaquetária (Furie, J., ET AL., 2008). Assim, com base nos resultados aqui relatados, pode-se propor que nitróxidos são compostos que apresentam estrutura química compatível com atividade inibitória de PDI, devendo ser testados como protótipos de agentes químicos que atuem antagonizando a agregação plaquetária patológica que ocorre em diversas patologias.

## **7 CONCLUSÃO**

A sonda Di-E-GSSG, apresentada como uma ferramenta para monitoramento da atividade de redutase da PDI, foi eficiente para avaliar o efeito de nitróxidos como reguladores da catálise dessa enzima. Baseando-se nos resultados obtidos, propõe-se que os nitróxidos são capazes de modular negativamente a atividade de redutase da PDI em função da hidrofobicidade da estrutura química desses compostos, colocando esses compostos como reguladores de funções celulares onde esteja envolvida a atividade dessa tiol oxidoredutase.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

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

APPENZELLER-HERZOG C., Ellgaard L., The human pdi family: versatility packed into a single fold, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1783, p. 535–548, 2008.

ARONOVITCH, Y. et al. Dual activity of nitroxides as pro- and antioxidants: catalysis of copper-mediated dna breakage and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dismutation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 42, p. 1317-1325, 2007.

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

BALCERCZYK, A. et al. Prooxidative effects of TEMPO on human erythrocytes. **Cell Biology International**, v.28, p. 585-591, 2004.

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**, São Paulo, v. 29, n.1, jan./fev. 2006.

BARROW, G. M.; **Estructuras de las moléculas**. USA: Reverté-SA, 1967.

BARROS M.P., BRIGAGÃO M.R.P.L. MATTEI R. **Métodos de avaliação da capacidade anti-oxidante de princípios ativos aplicados na profilaxia de doenças neurodegenerativas**. In: Almeida R.N. Psicofarmacologia: Fundamentos Práticos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 237-261, 2006

BEGUSOVA M., GILBERTO S., GRAS J., SY D., CHARLIER M., SPOTHEIM-MAURIZOT M. DNA radiolysis in DNA-protein complexes: a stochastic simulation of attack by hydroxyl radicals. **Int. J. Radiat. Biol**, v. 79, p. 385-391, 2006.

BERNFELD, P. Enzymes of starch degradation and synthesis. **Advances in Enzymology**, v. 12, p. 379-428, 1951.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais anti-oxidantes da dieta. **Revista Nutrição**, Campinas, v. 12, n.2, maio/ago. 1999.

BOBKO, A. A. et al. Reversible reduction of nitroxides to hydroxylamines: Roles for ascorbate and glutathione. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 42, p. 404-412, 2007.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteins-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72. p. 248-254, 1976.

BRANCO M.R., MARINHO H.S., CYRNE L., ANTUNES F. Decrease of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plasma membrane permeability during adaptation to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, v. 279, p. 6501-6506, 2004.

BRIGAGÃO, M. R. P. L., LOPES, N.P., COLEPICOLO, P. Inhibitory mechanism of leucocyte respiratory burst by the sesquiterpene lactone lychnopholide through protein S glutathionylation decrease. **Free Rad Biol Med**, v.36, n.1, p. 57-58, 2004.

CASTELLAN, G. W. **Physical chemistry**, 3. ed. Massachusetts: Addison-Wesley Publishing Company, 1983.

CHAMPE, P. C. et al. **Bioquímica ilustrada**, 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

CRUZ, C. M. et al. ATP Activates a Reactive Oxygen Species-dependent Oxidative Stress Response and Secretion of Proinflammatory Cytokines in Macrophages. **J Biol Chem**, v. 282, p. 2871-2879, 2007.

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

DEGANI, A. L. G. et al. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, n. 7, maio, 1998.

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY / MICHIGAN STATE UNIVERSITY. Disponibiliza informações, publicações e resumos científicos. Disponível em: <<http://www.bch.msu.edu/faculty>>. Acesso em: 18 abr. 2010.

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

DRAGUTAN, I., MEHLHORN, R. J. Modulation of oxidative damage by nitroxide free radicals. **Free Radical Research**, v. 41, n.3, p. 303-315, 2007.

FERNANDES, D. C. et al. Tempol diverts peroxynitrite/carbon dioxide reactivity toward albumin and cells from protein-tyrosine nitration to protein-cysteine nitrosation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 38, p. 189-200, 2005.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v. 43, p. 61-8, 1997.

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

FILHO, R. F.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v. 46, n. 3, p. 265-271, 2000.

FLUORESCENCE FUNDAMENTALS. Disponibiliza vídeos, tutoriais e informações sobre o processo de fluorescência. Disponível em:

<<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Introduction-to-Fluorescence-Techniques.html>>. Acesso em: 20 maio 2009.

FUCHS, J., GROTH, N., HERRLING, T., ZIMMER, G. Electron paramagnetic resonance studies on nitroxide radical 2,2,5,5-tetramethyl-4-piperdine-1-oxyl (Tempo) redox reactions in human skin. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 22, p. 967-976, 1997.

FURIE, J., COUGHLIN, S., INVEST, B. A critical role for extracellular protein disulfide isomerase during thrombus formation in mice. **Methods Enzymol**, v. 118, p. 1123-1131, 2008.

GALLINA A, HANLEY TM, MANDEL R, TRAHEY M, BRODER CC, VIGLIANTI GA, RYSER HJ: Inhibitors of protein-disulfide isomerase prevent cleavage of disulfide bonds in receptor-bound glycoprotein 120 and prevent HIV-1 entry. **J Biol Chem**, v. 277, p. 50579-50588, 2002.

GILBERT H.F. Protein disulfide isomerase. **Methods Enzymol**, v. 290, p. 26-50, 1998.

GLEBSKA, J. et al. Pro oxidative activity of nitroxides in their reactions with glutathione. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 35, p. 310-316, 2003.

GODFREY E.W., SCHWARTE R.C. The role of nitric oxide signaling in the formation of the neuromuscular junction. **J. Neurocytol**, v. 32, p. 591-602, 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. **Chem. Res. Toxicol**, v. 17, p. 250-257, 2004.

GOSWAI T., ROLFS A., HEDIGER M.A. Iron transport: emerging roles in health and disease. **Biochem. Cell. Biol.**, v. 80, p. 679-689, 2002.

GOWTHAMAN1, U., JAYAKANTHAN1, M., SUNDAR, D., Molecular docking studies of dithionitrobenzoic acid and its related compounds to protein disulfide isomerase: computational screening of inhibitors to HIV-1 entry. **Bioinformatics** doi:10.1186/1471-2105-9-S12-S14). 9(Suppl 12):S14, 2008.

HAHN, S. M. et al. Hemodynamic effect of the nitroxide superoxide dismutase mimics. **Free Radical Biology & Medicine**, v.27, p. 529-535, 1999.

HAHN, S. M. et al. *In vivo* radioprotection and effects on blood pressure of the stable free radical nitroxides. **International Journal of Radiation Oncology-Biology-Physics**, v. 32, n. 4, p. 839-842, nov. 1998.

HAHN, S. M. et al. Potencial Use of Nitroxides in Radiation Oncology. **Cancer Research**, v. 54, p. 2006-2010, apr. 1994.

HAHN, S. M. et al. Tempol, a stable free radical, is a novel murine radiation protector. **Cancer Research**, v.52, p. 1750-1753, apr. 1992.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3 ed. New York: Oxford University Press., 1998.

HARRIS, D., C., **Análise Química quantitativa**, 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. 876 p.

HILLSON D.A., LAMBERT N., FREEDMAN R.B. (1984) Formation and isomerization of disulfide bonds in proteins: Protein disulfide-isomerase. **Methods Enzymol.** v. 107, p. 281-294, 1984.

HIROI, T., OKADA, K., IMAOKA, S., OSADA, M., FUNAE, Y. Bisphenol A binds to protein disulfide isomerase and inhibits its enzymatic and hormone-binding activities, **Endocrinology Vol.**, v. 147, n. 6, p. 2773-2780, 2006.

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

HOGG, N. et al. Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. **Biochem. J**, v. 281, p. 419-424, 1992.

HORIBE, T., NAGAI, H., SAKAKIBARA K., HAGIWARA, Y., KIKUCHI, M., Ribostamycin inhibits the chaperone activity of protein disulfide isomerase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 289, p. 967-972, 2001.

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

JACOB C., GILES G.I., GILES N.M., SIES H. Sulfur and selenium: the role of oxidation state in protein structure and function. **Angew Chem Int.**, v. 42, p. 4742-4758, 2003.

JOACHIM M., ARUNASALAM N., NORBERT M., ANDREW H. **Experimental Parasitology**, v. 118, n. 1, p. 80-88, jan. 2008.

JUNIOR, L. R. et al. Sistema anti-oxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quim. Nova**, v. 24, n.1, p. 112-119, 2001.

KAISER, C.A., SEVIER, C.S. Ero1 and redox homeostasis in the endoplasmic reticulum. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1783, p. 549-556, 2008.

KANOFSKY J.T., BAKER A., SIMA P.D. Singlet-oxygen diffusion and quenching in studies of photooxidative damage to intact cells and to red cell ghost membranes. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 15, p. 527-530, 1993.

KAROUI H., HOGG N., FREJAVILLE C., TORDO P., KALYANARAMAN B. Characterization of sulfur-centered radical intermediates formed during the oxidation of thiols and sulfite by peroxynitrite. ESR-spin trapping and oxygen uptake studies. **J Biol Chem.**, v. 271, p. 6000-6009, 1996.

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.

KLATT, P., LAMAS, S. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. **Eur J Biochem**, v. 267, p. 4928-4944, 2000.

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

KRISHNA, M. C. et al. Modulation of streptonigrin cytotoxicity by nitroxide sod mimics. **Free Radical Biology & Medicine**, v.17, n. 5, p. 379-388, 1994.

KRISHNA, M. C. et al. Oxoammonium cation intermediate in the nitroxide- catalyzed dismutation of superoxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 5537-5541, jun. 1992.

KRISHNA, M. C. et al. Stimulation by nitroxides of catalase-like activity of heme proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v.271, n. 42, p. 26018-26025, 1996.

KROLL, C., LANGNER, A., BORCHERT, H. H. Nitroxide metabolism in the human keratinocyte cell line HaCaT. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 850-857, apr. 1998.

L. D. BARRON ;A. D. BUCKINGHAM: **Molecular Physics: An International Journal at the Interface Between Chemistry and Physics**, 1362-3028, v. 20, n. 6, p. 1111-1119, 1971.

LAKOWICZ J.R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy Plenum**. New York: New York Press., 1983.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

LIKE A PHYSICISTS. Disponibiliza artigos de física. Disponível em: <  
<http://likeaphysicists.blogspot.com/>>. Acesso em: 2 nov. 2010.

MARNETT L.J., WILCOX A.L. The chemistry of lipid alkoxyl radicals and their role in metal-amplified lipid peroxidation. **Biochem Soc Symp.**, v. 61, p. 65-72, 1995.

MACCARTHY, A.; **Methods of analysis and detection**. England: Cambridge University Press, 2001.

MASON, W.T., Ed., **Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity**, 2.ed. Academic Press, 1999. Available from Molecular Probes (F14944, Books from Molecular Probes - Section 23.6).

MILLER M.R., OKUBO K., ROSEBERRY M.J., WEBB D.J., MEGSON I.L. Extracellular nitric oxide release mediates soluble guanylate cyclase-independent vasodilator action of spermine NONOate: Comparison with other nitric oxide donors in isolated rat femoral arteries. **J. Cardiovascul. Pharmacol**, v. 43, p. 440-451, 2004.

MILLS B.J., LANG C.A. Differential distribution of free and bound glutathione and cyst(e)ine in human blood. **Biochem Pharmacol.**, v. 52, p. 401-406, 1996.

MITCHELL, J. B. Inhibition of oxygen-dependent radiation-induced damage by the nitroxide superoxide dismutase mimic, Tempol. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 289, p. 62-70, aug. 1991.

Muraoka S., Miura T. Inhibition of xanthine oxidase by phytic acid and its antioxidative action. **Life Sci.**, v. 74, p. 1691-1700, 2004.

NISHIMURA, T. S., SWARTZ, H. M. Reduction of lipid-soluble nitroxides in cho cells and macrophage tumor cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 17, n. 5, p. 473-479, nov. 1994.

PAULING, L., **General Chemistry**, 3.ed. San Francisco: Dover Publications, 1970 (1988).

CASTELLAN, G. W. **Physical Chemistry**, 3. ed. Massachusetts: Addison-Wesley Publishing Company, 1983.

PLOEM, J.S., Fluorescence microscopy. **Fluorescent and Luminescent Probes**, 2.ed, Chapter 1, 1999.

POMPELLA, A. et al. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. **Biochem Pharmacol**, v. 66, p. 1499-1503, 2003.

PUNCHARD, N.A., KELLY, F. J. **Free radicals: a practical approach**. New York: Oxford Press., 1996.

RABADJI, R. C. et al. Oscillation of reactive oxygen species released by activated neutrophils. **Biol Rhythm Res.** v.27, p-269-280, 1996.

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, n.3, p. 302-305, 2001.

RATURI, A. et al. Characterization of redox state and reductase activity of protein disulfide isomerase under different redox environments using a sensitive fluorescent assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 42, p. 62-70, 2007.

RIBEIRO, S. M. R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 21, n.3, p. 1333-149, set./dec. 2005.

RICCI, E. G. **Aplicação do método de análise dos componentes principais e espectroscopia Raman para a avaliação da mistura de etanol-metanol**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ciências, UNIFRAN, Franca, 2008.

ROSSETTI, R. P. **Determinação de fenóis totais em frutos do café: avaliações em diferentes fases de maturação**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Química, USP, São Carlos, 2007.

RUBIN, E. et al. **Patologia: Bases Clinicopatológicas da Medicina**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

RYSER HJ, LEVY E.M., MANDEL R, DISCIULLO G.J.: Inhibition of human immunodeficiency virus infection by agents that interfere with thiol-disulfide interchange upon virus-receptor interaction. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 91, p. 4559-4563, 1994.

SAMUNI, A. et al. Kinetics and mechanism of hydroxyl radical and OH-adduct radical reactions with nitroxides and with their hydroxylamines. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 124, n. 29, p. 8719-8724, 2002.

SAMUNI, A. M. et al. Cellular sites of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced damage and their protection by nitroxides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1525, p. 70-76, feb. 2001.

SAMUNI, A. M. et al. The effects of antioxidants on radiation-induced apoptosis pathways in TK6 cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 37, n. 10, p. 1648-1655, nov. 2004.

SAMUNI, A. M., BARENHOLZ, Y., SAMUNI, A. Site-activity relationship of nitroxide radical's antioxidative effect. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 34, p. 117-185, 2003.

SKOOG, DOUGLAS A.; HOLLER, F. JAMES; NIEMAN, TIMOTHY A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5 ed. Bookman, 2002.

SIEDLE, B. The effect of sesquiterpene lactones on the release of human neutrophil elastase. **Biochem Pharmacol.**, v. 7559. p. 1-7, 2003.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radical Biology & Medicine**, v.27, p. 916-921, 1999.

SOULE, B. P. et al. The chemistry and biology of nitroxide compounds. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 42, p.1632-1650, jun. 2007.

SUMIYA T., FUJIMOTO Y., NISHIDA H., MORIKAWA Y., SAKUMA S., FUJITA T. Effects of reactive oxygen species on arachidonic acid metabolism in rabbit platelets. **Free Rad Biol Med.**, v. 15, p. 101-104, 1993.

SUTTON H.C., WINTERBOURN C.C. On the participation of higher oxidation states of iron and copper in Fenton reactions. **Free Rad Biol Med.**, v. 6, p. 53-58, 1989.

SYMONS A.M., KING L.J. Inflammation, reactive oxygen species and cytochrome P450. **Inflammopharmacol.**, v. 11, p. 75-86, 2003.

T.E. CREIGHTON, Intermediates in the folding of reduced ribonuclease A, **J. Mol. Biol.**, v. 129, p. 411- 434, 1979.

VAN GASTEL M., LUBITZ W., LASSMANN G., NEESE F. Electronic structure of the cysteine thiyl radical: a DFT and correlated ab initio study. **J. Am Chem Soc.**, v. 126, p. 2237-2246, 2004.

VOET D., VOET J.G., PRATT C.W. **Fundamentos de Bioquímica**. Porto Alegre: ArtMed. 2002.

VOLODARSKY, L. B. advances in the chemistry of stable nitroxides. **Pure & Appl. Chem.**, v. 62, n. 2, p. 177-181, 1990.

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.

WANG, J. Analytical electrochemistry. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 2000.

WATANABE Y., SUZUKI O., HARUYAMA T., AKAIKE T. Interferon-gamma induces reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress at the hepatic apoptosis. **J. Cell Biochem.**, v. 89, p. 244-253, 2003.

WEDEMEYER W.J., WELKER E., NARAYAN M., SCHERAGA H.A. Disulfide bonds and protein folding. **Biochemistry**, v. 39, p. 4207-4216, 2000.

WILLARD.H.L.; MERRIT, JR.; DEAN J. **Análise Instrumental**. 2. ed. Lisboa: Fundação Colouste Gulbenkian, 1974. 986 p.

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

WILSON K., WALKER J. **Principles and techniques of practical biochemistry**. 5.ed. England: Cambridge University Press, 2001.

XAVIERA, S. et al. Differential protection by nitroxides and hydroxylamines to radiation-induced and metal ion-catalyzed oxidative damage. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1573, n. 2, p. 109-120, nov. 2002.

YAN, S. et al. Tempol, one of nitroxides, is a novel ultraviolet-A1 radiation protector for human dermal fibroblasts. **Journal of Dermatological Science**, v. 37, p. 137-143, 2005.

ZAMIR, E. et al. Nitroxide stable radical suppresses autoimmune uveitis in rats. **Free Radical Biology & Medicine**, v.27, p. 7-15, 1999.

ZAR, J. H. **Bioestatistical analysis**. 3. Ed. New Jersey: Prentice Hal006C, 1996.

ZHANG, R. et al. Mechanism of brain protection by nitroxide radicals in experimental model of closed-head injury. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 24, n.2, p. 332-340, 1998.

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