### UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

# VERÔNICA PAVIANI

# Oxidação de resíduos de triptofano em proteínas: formação da ligação cruzada ditriptofano e implicações patofisiológicas

Versão original corrigida da tese conforme resolução CoPGr5890

São Paulo

Data do Depósito na SPG: 04/02/2016

# VERÔNICA PAVIANI

# Oxidação de resíduos de triptofano em proteínas: formação da ligação cruzada ditriptofano e implicações patofisiológicas

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutora em Ciências (Bioquímica)

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ohara Augusto

São Paulo

Aos meus pais, José Antonio e Lazinha pelo incentivo A minha irmã Anaclaudia e ao meu cunhado Junior pelo companheirismo. Ao Plínio pela paciência, companheirismo e incentivo.

#### AGRADECIMENTOS

A minha família: meu pai José Antônio, minha mãe Lazinha, minha irmã Anaclaudia, meu cunhado Juninho, minha sobrinha Ana Laura, minha sogra Ana Maria e ao meu marido Plinio pelo incentivo, apoio e paciência comigo todos estes anos.

A minha orientadora Professora Ohara Augusto pela confiança, disponibilidade durante meu doutorado.

Aos meus colegas de laboratório: Fernando, Edlaine, Albert, Janaína, Ryan, Berê, Carlos e Daniela pela colaboração e convivência.

Ao meu amigo Raphael Fereira Queiroz pela ajuda com os experimentos, incentivo e discussões científicas.

A todos os colegas do IQ pela amizada, ajuda e companheirismo.

Ao Prof. Paolo DiMascio pela ajuda com os experimentos de massa. A Prof.(a) Marisa Medeiros, Prof. Fábio Rodrigues e Prof. Luis Henrique Catalani pelo empréstimo dos equipamentos em seus laboratórios.

Aos professores e funcionários do IQ que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Aos funcionários da central analítica em especial Emerson e Giovana pela ajuda com os experimentos de espectrometria de massas.

A faculdade de medicina da USP e Hospital das Clínicas, em especial, Dra Amaryllis Avakian, Paulo Junqueira de Mello e Regina Fereira de Almeida pela colaboração e por toda ajuda com o comitê de ética.

A CAPES pela concessão da bolsa de doutorado, ao CNPQ, FAPESP e CEPID – Redoxoma pelo apoio financeiro.

"A felicidade não se resume na ausência de problemas, mas sim na sua capacidade de lidar com eles." (Albert Einstein)

#### RESUMO

PAVIANI, V. **Oxidação de resíduos de triptofano em proteínas: formação da ligação cruzada ditriptofano e implicações patofisiológicas.** 2016. 122p. Tese – Programa de Pós-graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Apesar de extensa investigação das modificações oxidativas irreversíveis sofridas pelas proteínas in vitro e in vivo, os produtos formados pela oxidação de resíduos de triptofano ainda permanecem apenas parcialmente conhecidos. Recentemente, nosso grupo caracterizou uma ligação cruzada de ditriptofano produzida pela recombinação de radicais hSOD1-triptofanila gerados pelo ataque do radical carbonato produzido durante a atividade peroxidásica da enzima superóxido dismutase humana (hSOD1). Neste trabalho, examinamos se a ligação ditriptofano pode ser formada em outras proteínas, além da hSOD1 e por outros oxidantes, além do radical carbonato. A lisozima da clara do ovo e a beta cristalino bovina foram utilizadas como alvos de oxidação. A lisozima foi utilizada por ser uma enzima pequena (129 aminoácidos) e de estrutura bem conhecida, contendo seis resíduos de Trp. Os resultados mostraram que o radical carbonato, gerado enzimatica ou fotoliticamente, promove a oxidação, dimerização e inativação da lisozima. Os principais produtos de oxidação caracterizados por análise de nano-ESI-Q-TOF-MS/MS foram hidroxi-triptofano e N-formilquinurenina juntamente com um dímero de lisozima (lisozima-Trp<sup>28</sup>-Trp<sup>28</sup>-lisozima) e um hetero dímero lisozima-hSOD1 (lisozima-Trp<sup>28</sup>-Trp<sup>32</sup>-hSOD1), ambos ligados por uma ligação ditriptofano. Também demonstramos que a irradiação da lisozima com luz UVC leva à formação do dímero lisozima-Trp<sup>28</sup>-Trp<sup>28</sup>-lisozima. Em consequência, resolvemos tratar a beta cristalino bovina com radical carbonato gerado fotoliticamente ou com luz UVC, e a proteína também sofreu oxidação, dimerização e agregação. Os principais produtos de oxidação caracterizados por nano-ESI-Q-TOF-MS/MS foram hidroxi-triptofano, Nformilguinurenina, DOPA e um dímero de beta cristalino ( $\beta$ B2-Trp<sup>151</sup>-Trp<sup>151</sup>- $\beta$ B2). A irradiação com luz UVC também levou à formação de um dímero intra-cadeia, caracterizado como βA2-Trp<sup>78</sup>-Trp<sup>81</sup>. Quando a beta cristalino foi irradiada com um simulador de luz solar (UVA e UVB) também foi possível observar um dímero, caracterizado como βA2-Trp<sup>150</sup>-Trp<sup>150</sup>-βA2. A presença de produtos de oxidação de resíduos de Trp, dentre eles a ligação cruzada ditritpofano, também foi avaliada in vivo, utilizando o cristalino de pacientes que foram submetidos a cirurgia para remoção de catarata. Beta, alfa e gama cristalino foram as principais proteínas identificadas nas frações solúvel e insolúvel do cristalino. A principal modificação pós-traducionais identificada foi deamidação. Um alto conteúdo de resíduos de metionina e triptofano oxidados foram identificados nas proteínas presentes na fração insolúvel. Os principais produtos de oxidação de Trp identificados por nano-ESI-Q-TOF-MS/MS foram quinurenina e N-formilquinurenina. A presença de dímeros covalentes no cristalino com catarata foi confirmada por análises de massas. A completa caracterização desses dímeros (βB1-Trp<sup>127</sup>-Trp<sup>127</sup>-βB1 e βB1-Trp<sup>193</sup>-Trp<sup>193</sup>-βB1) confirmou que as cadeias polipeptídicas foram ligadas por uma ligação ditriptofano. Em síntese, nossos dados demonstraram que o radical carbonato e a luz UV podem produzir dímeros de ditriptofano em diferentes proteínas. Também, a presença da ligação cruzada de ditriptofano in vivo (catarata humana) foi pela primeira vez detectada.

**Palavras-Chave:** ditriptofano, radical carbonato, luz UV, lisozima, cristalino humano, catarata.

#### ABSTRACT

PAVIANI, V. Oxidation of tryptophan residues in proteins: formation of the ditryptophan cross-link and pathophysiological implications. 2016. 122p. PhD thesis – Graduated Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Despite extensive investigation of irreversible oxidative modifications suffered by proteins *in* vitro and *in vivo*, the products formed by oxidation of tryptophan residues remain partially characterized. Our group recently described a ditryptophan crosslink produced by recombination of hSOD1-tryptophanyl radicals generated by attack of the carbonate radical produced during the peroxidase activity of the human superoxide dismutase (hSOD1) enzyme. Here, we examine whether the ditryptophan cross-link can be produced in others proteins besides the hSOD1 and by other oxidants, in addition to the carbonate radical. The egg white lysozyme and bovine beta crystalline were used as targets. Lysozyme was used because it is a small enzyme (129 amino acids) with a well-known structure, containing six Trp residues. The results showed that the carbonate radical, generated enzymatically or photolytically, promotes lysozyme oxidation, inactivation and dimerization. The major oxidation products characterized by nano-ESI-Q-TOF-MS/MS analysis were hydroxy-tryptophan and N-formylkynurenine together with a dimer of lysozyme (lysozyme-Trp<sup>28</sup>-Trp<sup>28</sup>-lysozyme) and a hetero dimer hSOD1-lysozyme (lysozyme-Trp<sup>28</sup>-Trp<sup>32</sup>-hSOD1), both bound by a ditryptophan cross-link. Also, it was demonstrated that lysozyme irradiation with UVC light leads to the formation of the dimer lysozyme-Trp<sup>28</sup>-Trp<sup>28</sup>-lysozyme. In view of these results, we decided to treat beta crystalline bovine with photolytically generated carbonate radical and UVC. Beta crystalline also suffered oxidation, dimerization and aggregation. The major oxidation products characterized were hydroxy-tryptophan, N-formylkynurenine, DOPA and a beta crystalline dimer ( $\beta$ B2-Trp<sup>151</sup>-Trp<sup>151</sup>- $\beta$ B2) by nano-ESI-Q-TOF-MS/MS. Irradiation with UVC light also led to the formation of an intra-chain dimer, which was characterized as  $\beta A^2$ -Trp<sup>78</sup>-Trp<sup>81</sup>. When beta crystalline was irradiated with a solar simulator (UVA and UVB), it was also possible to observe a dimer which was characterized as  $\beta A2$ -Trp<sup>150</sup>-Trp<sup>150</sup>- $\beta A2$ . The presence of oxidized tryptophan products, including the ditryptophan cross-link, was also evaluated in vivo in the lenses of patients submitted to cataract removal. Beta, alpha and gamma crystalline were the main proteins identified in soluble and insoluble fractions of the lenses. The main post translational modification identified was deamidation. A high content of oxidized methionine and tryptophan residues were identified in proteins present in the insoluble fraction. The main tryptophan oxidation products identified by nano-ESI-Q-TOF-MS/MS were kynurenine and N-formylkynurenine. The presence of covalent dimers in the lenses with cataract was demonstrated by mass analysis. Full MS/MS characterization of the dimers βB1-Trp<sup>127</sup>-Trp<sup>127</sup>-βB1 and βB1-Trp<sup>193</sup>-Trp<sup>193</sup>- $\beta$ B1 confirmed that they were linked by a ditryptophan bond. In summary, our data demonstrate that the carbonate radical and UV light can produce ditryptophan dimers in different proteins. Also, the presence of the ditryptophan cross-link was first detected in vivo (human cataract).

**Keywords**: Ditryptophan, carbonate radical, UV light, lysozyme, beta crystalline, human lenses, cataract.

### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina de soro bovino
DMPO	5,5'-dimetil-1-pirrolina N-óxido
CoC	Complexo de cobalto = complexo
	carbonato-tetramina de cobalto (III)
DBNBS	3,5-dibromo-4-nitrosobenzeno sulfonato
DTPA	Ácido dietilenotriaminopentacético
DTT	Ditiotreitol
EPR	Ressonância paramagnética eletrônica
ESI	lonização por fonte eletrospray
HRP	Peroxidase de raiz forte
MNP	2-metil-2-nitrosopropano
MS	Espectrometria de massas
m/z	Razão massa carga
TEMPOL	4-hidroxi-2,2,6,6-tetra-metil-
	piperidiniloxila
SOD1	Cu/Zn Superóxido dismutase
	citoplasmática <sup>1</sup>
Tween	Polioxietileno-sorbitano monolaurato

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> As letras "h" e "b" colocadas antes de SOD1, denotam proteína humana e bovina, respectivamente.

### SUMÁRIO

1	INT	TRODUÇÃO	12
	1.1	Modificações oxidativas pós-traducionais de proteínas	12
	1.2	Superóxido dismutase	15
	1.3	Radical carbonato	16
	1.4	Cristalino humano	17
2	OB	BJETIVOS	23
3	MA	ATERIAIS E MÉTODOS	24
	3.1	Materiais	24
	3.2	Métodos	25
	3.2	2.1 Quantificação do peróxido de hidrogênio	25
	3.2	2.2 Expressão e purificação da hSOD1	25
	3.2	2.3 Incubações contendo lisozima e beta cristalino	26
	3.2	2.4 Análises de SDS-PAGE	27
	3.2	2.5 Detecção de radical carbonato por espectrometria de re-	ssonância
	pai	ramagnética eletrônica (EPR)	27
	3.2	2.6 Detecção de radicais de proteína	
	3.2	2.7 Experimentos de Western blot	
	3.2	2.8 Avaliação da atividade enzimática da lisozima	
	3.2	2.9 Análise das modificações oxidativas da lisozima e beta cris	stalino por
	HP	PLC/ESI/MSMS após digestão tríptica	
	3.2	2.10 Preparação das lentes de pacientes com catarata	31
	3.2	2.11 Eletroforese bidimensional	
	3.2	2.12 Análise das proteínas obtidas de lentes humana com ca	itarata por
	HP	PLC/ESI/MSMS após digestão tríptica	
	3.2	2.13 Dosagem de proteínas	
	3.2	2.14 Análises estatísticas	
4	RE	ESULTADOS	
	4.1	Experimentos com lisozima	35
	4.1	1.1 O radical carbonato promove oxidação, dimerização e inat	tivação da
lisozima			35
	4.1	1.2 Caracterização dos produtos de oxidação da lisozima	43

4.1.3	Oxidação da lisozima por luz UV53		
4.2 Exp	perimentos com beta cristalino56		
4.2.1	Oxidação e oligomerização da beta cristalino promovida pelo radical		
carbon	ato e por luz UVC56		
4.2.2	Caracterização dos produtos de oxidação da beta cristalino59		
4.2.3	Análise das modificações oxidativas da beta cristalino promovida		
por luz	UVA e UVB65		
4.3 Exp	perimentos com cristalino humano70		
4.3.1	Avaliação das proteínas presentes no cristalino de pacientes com		
catarat	a por eletroforese 1D e 2D70		
4.3.2	Análise das proteínas presentes nas frações do cristalino com		
catarat	a após separação por eletroforese bidimensional		
4.3.3	Caracterização dos produtos de oxidação de resíduos de Trp nas		
frações	do cristalino com catarata76		
5 DISCU	SSÃO86		
6 CONCI	_USÕES97		
7 REFER	ÊNCIAS		
8 APÊND	APÊNDICES107		
9 SUMÚI	_A CURRÍCULAR121		

#### 1.1 Modificações oxidativas pós-traducionais de proteínas

A oxidação de proteínas por oxidantes e radicais livres biológicos tem recebido considerável atenção na literatura por vários motivos, inclusive porque proteínas são os principais alvos de radicais e oxidantes em condições fisiológicas. De fato, estima-se que as proteínas sejam capazes de sequestrar de 50 a 75% das espécies reativas produzidas *in vivo* (Davies e Dean, 1997; Davies et al., 1999).

No geral, a oxidação pode ocorrer tanto no esqueleto das proteínas como nas cadeias laterais dos aminoácidos e o sítio de ataque vai depender de vários fatores, dentre eles: a concentração da molécula alvo, a constante de velocidade da reação do oxidante com o alvo, a localização do oxidante em relação ao alvo e, também, a ocorrência de reações secundárias que podem provocar reações em cadeia (Davies et al., 2004). Alguns oxidantes apresentam um padrão de oxidação específico e reagem com um número limitado de resíduos de aminoácidos, enquanto outros (como o radical hidroxila) apresentam um efeito mais amplo, podendo reagir com diferentes aminoácidos de forma inespecífica (Grune, 2012). Os aminoácidos mais susceptíveis a oxidações são aqueles que contêm átomos de enxofre, a cisteína e a metionina, e resíduos aromáticos, a histidina, a fenilalanina, a tirosina e o triptofano.

Como resultado, as proteínas são reversível ou irreversivelmente oxidadas. As oxidações protéicas reversíveis geralmente envolvem resíduos de Cys (PCys-SOH, PCys-SO2H, PCys-S-CysP e PCys-S-SG), e modulam uma variedade de funções protéicas, incluindo seus papéis em sinalização celular (Rhee et al., 2005; Winterbourn e Hampton, 2008). Em contraste, a oxidação irreversível de proteínas pode levar à perda de função, fragmentação, agregação e/ou alteração de

"turnover", resultando em disfunção celular e em várias patologias humanas (Davies e Dean, 1997; Davies et al., 1999; Stadtman, 2001; Dalle-Done et al., 2006).

Muitas modificações oxidativas irreversíveis como nitração, carbonilação, hidroxilação e ligações cruzadas (principalmente ditirosina) já foram descritas na literatura. Entretanto as modificações de resíduos de triptofano permanecem parcialmente caracterizadas. Dentre as dificuldades para caracterizar essas modificações, ressalta-se a baixa frequência com que resíduos de triptofano aparecem em proteínas (aproximadamente 1%) em comparação a outros resíduos aromáticos, como tirosina (entre 3 e 4%). Também, o fato de que resíduos de triptofano estão, no geral, localizados no interior de proteínas e possuem vários sítios suscetíveis à oxidação (Yamakura e Ikeda, 2006; Bregere et al., 2008; Yamakura e Kawasaki, 2010). Todavia, resíduos de triptofano têm um potencial único para interagir com outras proteínas e estruturas celulares (Yamakura e Ikeda, 2006; Fernández-Vidal, et al., 20 07; Ge, et al., 2011) e suas oxidações podem ter profundas consequências fisiológicas.

Os produtos de oxidação de resíduos de triptofano mais frequentemente caracterizados são radicais proteína-triptofanila e outros produtos ligados a proteínas, como hidroperóxidos, hidroxi-triptofano, *N*-formilquinurenina e quinurenina. Além disso, os resíduos de triptofano são os mais fortes cromóforos de luz UV em proteínas, levando a diferentes produtos por meio de uma rica fotoquímica envolvendo vias mediadas tanto por radicais de proteína, como por oxigênio singlete (Zhang et al., 2003; Zhang et al., 2004; Ehrewshart et al., 2009) (Fig. 1).

Recentemente, nosso grupo caracterizou uma nova modificação oxidativa pós-tradução de triptofano, a ligação cruzada ditriptofano na enzima superóxido dismutase 1 (hSOD1) (hSOD1-Trp<sup>32</sup>-Trp<sup>32</sup>-hSOD1). A formação desse dímero

resulta da recombinação de radicais hSOD1-triptofanila formados pelo ataque do radical carbonato gerado durante a atividade peroxidásica dependente de bicarbonato da enzima (Medinas et al., 2010). Mais recentemente, foram apresentadas evidências de que a ligação ditriptofano dispara a oligomerização e agregação da hSOD1, podendo, eventualmente, participar do mecanismo patogênico da esclerose lateral amiotrófica (Coelho et al., 2014).

A formação de dímeros de triptofano foi também proposta por outros autores, mas a hipotética ligação ditriptofano não foi caracterizada. De fato, a produção de dímeros de triptofano foi descrita para peptídeos submetidos a irradiação com pulsos de laser UV de alta energia (Leo et al., 2013) e na lisozima submetida a riboflavina/luz (Silva et al., 1994) ou a radicais peroxila (Arenas et al., 2013). Por outro lado, Van Vranken e colaboradores sintetizaram vários peptídeos unidos por uma ligação cruzada de ditriptofano entre os C2 de cada triptofano dos monômeros (C2-C2) (Stachel et al., 1996; Dinh e Van Vranken, 1999). Esses dímeros não são formados por recombinação de radicais triptofanila e são altamente fluorescentes, em contraste com o dímero C3-N1 (Fig. 1) caracterizado durante a atividade peroxidásica da hSOD1 (Medinas et al., 2010).



**Figura 1. Alguns produtos caracterizados da oxidação de resíduos de triptofano em proteínas.** (Adaptado: Simat et al., 1998; Medinas et al., 2010).

#### 1.2 Superóxido dismutase

A superóxido dismutase 1 (CuZnSOD) é uma enzima antioxidante encontrada em quase todas as células eucarióticas. Ela é capaz de catalisar de maneira muito eficiente a dismutação do ânion radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio ( $O_2$ ) (Equações 1 - 3) (McCord & Fridovich, 1969).

$O_2^{\bullet} + Cu^{+2}Zn-SOD \rightarrow O_2 + Cu^+Zn-SOD$	Equação 1
$O_2^{\bullet} + Cu^{+1}Zn-SOD + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + Cu^{+2}Zn-SOD$	Equação 2
$2 O_2^{\bullet} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$	Equação 3

A SOD 1 está localizada principalmente no citossol e no espaço intermembranas das mitocôndrias, mas pode ser também encontrada no núcleo e nos lisossomos. Ela contém duas subunidades idênticas formando um homodímero de aproximadamente 32 kDa. Cada subunidade possui uma ponte dissulfeto intramolecular (Cys<sup>57</sup>-Cys<sup>164</sup>) entre dois resíduos de cisteína muito conservados e também um sítio ativo com um átomo de cobre e um átomo de zinco. Os íons de cobre catalisam a reação de dismutação e são mantidos no sítio ativo por interações com o nitrogênio do anel imidazólico de quatro resíduos de histidina. Os íons de zinco possuem um importante papel estrutural auxiliando na estabilidade da enzima (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Além de catalisar de maneira muito eficiente a dismutação do ânion radical superóxido, a SOD1 possui outras atividades catalíticas secundárias, como superóxido redutase, superóxido oxidase, peroxinitrito sintase, tiol oxidase e peroxidase. Esta última é particularmente interessante por ser muito estimulada em presença de tampão bicarbonato, o principal tampão fisiológico. Na ausência de tampão bicarbonato, a SOD1 consome baixos níveis de peróxido de hidrogênio, resultando na oxidação de seus próprios resíduos de histidina do sitio ativo e na sua inativação. Em presença de tampão bicarbonato, o consumo de peróxido de fisiolo de fis

hidrogênio aumenta consideravelmente, levando à produção de radical carbonato  $(CO_3^{\bullet})$ . Esse forte oxidante ( $E^{o'}$ = 1,78 V, pH = 7,0) é capaz de se difundir do sítio ativo e oxidar alvos mais distantes, como o resíduo de Trp<sup>32</sup> localizado na superfície da enzima humana (hSOD1) e/ou outras moléculas presentes no meio, inclusive outras proteínas. Embora a hSOD1 seja considerada uma das principais defesas antioxidantes de mamíferos, suas atividades paralelas têm sido associadas a efeitos prejudiciais, como neurotoxicidade (Zhang et al., 2003; Bonini et al., 2004; Medinas et al., 2007 e 2009, Drechsel et al., 2012).

#### **1.3 Radical carbonato**

Embora a produção de radical carbonato como um produto secundário da oxidação do acetaldeído pela xantina oxidase tenha sido proposta em 1976 (Hodgson & Fridovich, 1976), foi somente a partir de 1999 que o radical carbonato começou a ser considerado um oxidante de importância biológica. Isso ocorreu porque a produção de radical carbonato a partir da reação entre peroxinitrito e dióxido de carbono foi inequivocamente demonstrada por EPR (Bonini et al., 1999).

O ânion radical carbonato (CO<sub>3</sub>••) é um radical eletrofílico centrado em oxigênio e um ácido forte (pKa < 0). Ele é um potente oxidante de um elétron devido ao seu alto potencial de redução (E° = 1,78 V, pH 7,0). A maioria das reações mediadas por radical carbonato envolvem oxidações por transferência de elétrons e/ou abstração de hidrogênio. Em soluções aquosas a pH fisiológicos, o radical carbonato é negativamente carregado e capaz de rapidamente oxidar várias biomoléculas, tais como DNA, RNA, metaloproteínas e resíduos de aminoácidos em proteínas, principalmente triptofano, tirosina, metionina, cisteína e histidina. Diferentemente dos radicais hidroxila e dióxido de nitrogênio, que são capazes tanto de oxidar como de se adicionar à biomoléculas formando produtos estáveis, o

radical carbonato não forma adutos estáveis. Portanto, fica difícil provar sua formação em condições fisiológicas (Augusto et al., 2002; Medinas et al., 2007). Até o momento, a produção do radical carbonato em sistemas biológicos foi demonstrada durante a reação de peroxinitrito com dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), durante a atividade peroxidásica da SOD1 dependente de bicarbonato e durante a atividade enzimática da xantina oxidase. O radical carbonato pode também ser produzido por mecanismos de Fenton durante a reação de peróxido de hidrogênio com íons de metais de transição em presença de tampão bicarbonato (Augusto & Miyamoto, 2012). Em laboratório, o radical carbonato pode ser rotineiramente gerado pela fotólise de complexos carbonato-penta ou tetramina cobalto III (Chen et al., 1973).

#### 1.4 Cristalino humano

O cristalino humano é um tecido avascular envolvido por uma cápsula de colágeno composta por uma única camada de células epiteliais, cuja função é focar a luz na retina. Ele é composto por três principais grupos de proteínas, alfa, beta e gama cristalino, as quais compreendem cerca de 90% das proteínas presentes no cristalino de vertebrados. Essas proteínas são altamente solúveis e sua estrutura organizada é essencial para a transparência do cristalino (Bloemendal et al., 2004; Sharma e Santhoshkumer, 2009). Quando as proteínas presentes no cristalino são homogeneizadas e centrifugadas, duas frações protêicas são obtidas, uma fração contendo proteínas solúveis e outra contendo proteínas insolúveis. Está bem estabelecido que a quantidade de proteínas presentes na fração insolúvel aumenta com o envelhecimento e que uma alta concentração de proteínas modificadas está presente nesta fração (Sharma e Santhoshkumer, 2009).

A alfa cristalino é composta de duas subunidades (cadeias A e B) que possuem 60% de homologia. Essas cadeias polipeptídicas podem se associar não covalentemente para formar heteropolímeros de alto peso molecular (aproximadamente 800 kDa). A estrutura primária desta proteína exibe um alto grau de homologia com as proteínas de choque térmico (sHsp do inglês small heat shock proteins) devido ao domínio alfa cristalino altamente conservado. A estrutura secundária predominante das subunidades da alfa cristalino é a folha beta. Cada domínio alfa cristalino apresenta sete fitas organizadas em duas folhas  $\beta$ , uma delas possui três fitas ( $\beta$ 4,  $\beta$ 5 e  $\beta$ 6+ $\beta$ 7) e a outra quatro ( $\beta$ 2,  $\beta$ 3,  $\beta$ 8 e  $\beta$ 9), empacotadas frente a frente formando um sanduíche (Fig. 2). Os domínios altamente conservados da proteína se estendem do resíduo 63-144 para a cadeia A e 68-148 para a cadeia B. Além de ter uma função estrutural, a alfa cristalino é uma chaperona que eficientemente se liga a outras proteínas parcialmente desenoveladas (dentre elas, beta e gama cristalino) impedindo suas agregações (Bloemendal et al., 2004; Reddy et al., 2006; Sharma e Santhoshkumer, 2009).





A beta e a gama cristalino compreendem um grupo de cadeias polipeptídicas de estrutura e função muito similares. Elas atuam como proteínas estruturais e a principal diferença entre a beta e gama cristalino é que a primeira tem extensões N-

terminais. A beta cristalino possui quatro cadeias polipeptídicas ácidas ( $\beta$ A1,  $\beta$ A2,  $\beta$ A3 e  $\beta$ A4) e três cadeias polipeptídicas básicas ( $\beta$ B1,  $\beta$ B2 e  $\beta$ B3) com pesos moleculares de aproximadamente 22-28 kDa. Já a gama cristalino humana tem cinco diferentes subunidades ( $\gamma$ S,  $\gamma$ A,  $\gamma$ B,  $\gamma$ C e  $\gamma$ D) com pesos moleculares de aproximadamente 20 kDa. Tanto a beta quanto a gama cristalino são compostas de dois motivos chave grega organizados em dois domínios. Os dois motivos chave grega são compostos de oito fitas  $\beta$  que se intercalam para formar um sanduíche de folhas  $\beta$  (Bloemendal et al., 2004).



**Figura 3. Estruturas da gama e beta cristalino humana.** (A) Monômero de gama cristalino cadeia  $\gamma$ S (PDB 2M3T), (B) Monômero de beta cristalino cadeia  $\beta$ B2 (PDB 1YTQ) e (C) Estrutura homodimérica da beta cristalino cadeia  $\beta$ B1 compreendendo os resíduos 54-236 (PDB 1OKI). Todas as beta e gama cristalino compreendem dois domínios com cadeias polipeptídicas idênticas que são conectados por uma sequência conservada de 8-10 aminoácidos. As regiões N e C-terminal são pareadas de maneira simétrica (Bloemendal et al., 2004).

A beta cristalino apresenta cerca de 45-60% de homologia entre suas cadeias e no caso da gama cristalino, essa homologia é de aproximadamente 30%. A  $\beta$ A1 e  $\beta$ A3 são codificadas pelo mesmo gene e a única diferença entre elas é a quantidade de aminoácidos localizados na região N-terminal. A beta cristalino também pode se organizar formando homodímeros, heterodímeros e oligômeros de diferentes tamanhos estabilizados principalmente por interações hidrofóbicas. Em contraste, a gama cristalino apresenta-se como monômero. De acordo com o perfil de separação obtido por cromatografia de filtração em gel, a beta cristalino pode ser dividida em três categorias:  $\beta$ H (hexâmero e octâmeros),  $\beta$ L<sub>2</sub> (dímeros) e  $\beta$ L<sub>1</sub> (espécies intermediárias: tetrâmeros e dímeros). A beta cristalino representa cerca de 40% das proteínas presentes no cristalino de indivíduos jovens e pode ser altamente modificada com o envelhecimento (Van Montfort et al., 2003; Bloemendal et al., 2004).

A transparência das lentes depende da manutenção da estrutura terciária nativa e da solubilidade das proteínas que compõem o cristalino. Estudos sugerem que mudanças nas estruturas das proteínas que compõem o cristalino causadas por mutações, oxidação, deaminação e irradiação UV podem levar à formação de agregados insolúveis, os quais levam à opacificação do cristalino, espalhamento da luz e subsequente catarata (Moreau e King, 2012 e Zhao et al., 2015).

A catarata ainda hoje é a principal causa de cegueira no mundo, atingindo milhões de pessoas. Ela pode ter uma origem genética e se manifestar nos primeiros anos de vida sendo denominada catarata congênita ou juvenil. Pode também, ser decorrente do envelhecimento e, neste caso, denominada catarata relacionada à idade. Na catarata congênita, as alterações na estrutura das proteínas que compõem o cristalino podem ocorrer principalmente devido a mutações nos genes que codificam a alfa, beta e gama cristalino. Já a catarata relacionada à idade

possui uma etiologia complexa e vários fatores podem contribuir para o seu desenvolvimento. O mecanismo responsável pela agregação das proteínas permanece em estudo (Moreau e King, 2012).

Muitas modificações pós-traducionais já foram identificadas nas proteínas que compõem o cristalino, sendo que as principais são deamidação, metilação de resíduos de cisteína, oxidação, fosforilação, acetilação e oxidação. Análises comparativas no perfil de deamidação do cristalino de pacientes de diferentes idades sem catarata com aqueles que possuem catarata mostraram que a deamidação aumenta com a idade e que vários sítios adicionais de deamidação estão presentes no cristalino com catarata. O papel exato da deamidação na agregação das proteínas ainda não é completamente entendido. Todavia, deamidações introduzem cargas negativas nas proteínas, as quais podem causar alterações estruturais que afetam a estabilidade das proteínas (Lampi et al., 2014). Além de apresentarem deamidações, as proteínas presentes na fração insolúvel do cristalino mostram agregados de alfa, beta e gama cristalino com perda de vários resíduos de aminoácidos da porção N-terminal. Essa perda compromete a solubilidade das proteínas afetadas (Sharma e Santhoshkumer, 2009).

Modificações oxidativas de proteinas são consideradas um dos principais fatores que contribuem para o desenvolvimento da catarata relacionada à idade. À medida que envelhecemos, o organismo vai ficando menos capaz de controlar perigos sempre presentes mas fortemente regulados na juventude, como os níveis homeostáticos de espécies reativas (Finkel, 2003; Winterbourn, 2008; Forman et al., 2010). A desregulação dessas espécies leva ao aumento de processos oxidativos e, portanto, pode estar relacionada com as modificações oxidativas descritas para as proteínas do cristalino na catarata.

Análises de proteômica das proteínas presentes no cristalino têm identificado vários sítios de oxidação na alfa, beta e gama cristalino sendo que os principais aminoácidos modificados foram cisteína, metionina e triptofano. Cerca de 50% dos resíduos de metionina foram oxidados a metionina sulfóxido no cristalino com catarata em estágios avançados. Análises semiquantitativas dos produtos de oxidação de resíduos triptofano no cristalino de diferentes idades também mostraram um aumento significativo dos níveis de triptofanos oxidados com o envelhecimento e o com o desenvolvimento de catarata (Hains e Truscott, 2007).

Vários estudos epidemiológicos indicam que a irradiação ultravioleta pode estar associada com o desenvolvimento da catarata, pois um aumento de espécies oxidantes pode ocorrer como resultado da irradiação UV. Embora a córnea seja capaz de absorver grande parte da irradiação UV, a luz UV de comprimentos de onda mais longos (raios UVA e UVB) pode também ser absorvida pelo cristalino apresentando, perigo às proteínas. (Moreau e King, 2012). O cristalino humano contém pequenas moleculas derivadas do metabolismo de triptofano (denominadas filtros de UV) que são conhecidas por absorver luz UV protegendo as proteínas presentes no cristalino. Todavia, estudos indicam que os níveis desses filtros podem diminuir linearmente com a idade, reduzindo os efeitos protetores. Além disso, esses filtros podem ser modificados por luz UV e, em consequência, atuar como fotossensibilizadores, aumentando os danos oxidativos nas proteínas (Vinson, 2006; Korlimbinis et al., 2006; Moreau e King, 2012).

Objetivos

#### 2 Objetivos

Este projeto de tese objetivou contribuir para elucidar a natureza molecular e as possíveis consequências patofisiológicas de modificações oxidativas de proteínas, particularmente daquelas em resíduos de triptofano, as quais permanecem parcialmente estudadas. O oxidante escolhido foi o radical carbonato porque resíduos de triptofano são excelentes alvos desse radical (k = 7,0 x 10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) e, também, porque não existem biomarcadores que provem a formação do radical carbonato. A primeira proteína escolhida como alvo foi a lisozima por ser uma enzima pequena e estruturalmente conhecida, contendo seis resíduos de triptofano. No decorrer do projeto, ficou evidente que também deveríamos estudar os efeitos oxidantes da luz UV sobre proteínas, principalmente sobre aquelas do cristalino humano. Escolhemos a beta cristalino bovino por facilidade de obtenção comercial. Finalmente, examinamos as modificações das proteínas no cristalino humano de pacientes submetidos à cirurgia de remoção de catarata. Os resultados obtidos são apresentados e discutidos a seguir, bem como suas possíveis implicações patofisiológicas.

#### 3 Materiais e Métodos

#### 3.1 Materiais

O complexo de cobalto ([Co(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>CO<sub>3</sub>]ClO<sub>4</sub>) foi cedido pelo Prof. Vitor F. Ferreira (Universidade Federal Fluminense).

Ditiotreitol (DTT), tris(hidroximetil)aminometano (Tris), bicarbonato de sódio, 5,5'-dimetil-1-pirrolina N-óxido (DMPO), 2-metil-2-nitrosopropano (MNP), peróxido de hidrogênio, bis-acrilamida, iodoacetamida, azul de coomassie blue, tempol, *Micrococcus lysodeikiticus* ATCC 4698, beta cristalino bovina (β<sub>L</sub>), lisozima da clara de ovo, polioxietileno-sorbitano monolaurato (Tween), triptofano e tirosina foram obtidos da Sigma. Acetona, ácido acético, ácido fosfórico, etanol, metanol, ácido fórmico, ácido clorídrico 37%, albumina sérica bovina (BSA) e ureia foram obtidos da Merck. Catalase de fígado bovino foi adquirida da Boehringer. Guanidina foi obtida da Invitrogen. Azul de bromofenol e tetrametiletilenodiamina (TEMED) foram obtidos da Acros. Reagente de Bradford e o marcador de peso molecular Kaleidoscope foram obtidos da Bio-Rad. Tripsina grau sequenciamento foi obtida da Promega. Acrilamida e dodecilssulfato de sódio (SDS) foram obtidos da Gibco BRL. Perssulfato de amônio foi obtido da Pharmacia Biotech. Os anticorpos antilisozima produzido em coelhos e anti-hSOD produzido em ovelha foram obtidos da Abcam. Os anticorpos secundários anti-sheep produzido em coelho e anti-rabbit produzido em cabra ambos conjugados com peroxidase e Cu/Zn superóxido dismutase bovina (bSOD) foram obtidos da Calbiochem. As colunas de dessanilização (PD-10), tiras de gel de poliacrilamida com gradiente de pH imobilizados e anfólitos foram adquiridas da GE Healthcare. Coluna para nano HPLC ZORBAX 300SB C-18, calibrante interno "lock mass calibrant" e calibrante externo "low concentration Tune mix" foram obtidos da Agilent Technologies. Filtros de 0,22 µm foram obtidos da Millipore. O substrato quimioluminescente para análise

de *Western blot* foi obtido da Thermo Scientific. O DMPO foi purificado por destilação fracionada. Todos os reagentes foram de grau analítico ou superior. As concentrações de SOD1 humana e bovina foram determinadas por Bradford e espectrofotometricamente pelo conteúdo de cobre ( $\epsilon_{680} = 3,0 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Symonyan e Nalbandyan, 1972). A concentração de HRP foi determinada espectrofotometricamente ( $\epsilon_{403} = 1,02 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). O DBNBS (3,5 - dibromo - 4 - nitrosobenzeno sulfonato) foi sintetizado segundo o procedimento de Kaur et al., (1981). A água utilizada em todos os experimentos foi deionizada num sistema de purificação Milli-Q da Millipore. Todos os tampões foram tratados "overnight" com Chelex para remover traços de íons metálicos contaminantes, além de conterem DTPA (0,1 mM).

#### 3.2 Métodos

#### 3.2.1 Quantificação do peróxido de hidrogênio

As soluções de peróxido de hidrogênio foram preparadas antes do uso e as concentrações foram determinadas espectrofotometricamente pela sua reação com peroxidase de raiz forte (HRP) para produzir o composto I  $(\Delta \epsilon_{403} = 5,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$  (Toledo et al., 2011).

#### 3.2.2 Expressão e purificação da hSOD1

Obtenção e purificação da hSOD1 foi realizada em nosso laboratório por Fernando Coelho segundo protocolo previamente publicado (Medinas et al., 2010). Os plasmídeos (pET-3d) que codificam a enzima hSOD1<sup>WT</sup> foram fornecidos por Dr. J. S. Beckman do instituto Linus Pauling. Os plasmídeos foram expressos em cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS. Tipicamente a hSOD1 recombinante continha aproximadamente 0,7 de íons cobre e 0,7 de íons zinco por monômero e uma atividade dismutase específica de 3900 ± 400 U/mg (mg de proteína normalizada por conteúdo de cobre). Neste trabalho, as concentrações de hSOD1 foram sempre expressas como dímero.

#### 3.2.3 Incubações contendo lisozima e beta cristalino

A concentração da solução estoque de lisozima foi obtida utilizando ε280nm = 3,846 x 10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> (Website http://bo.expasy.org/tools/protparam.html). A concentração da solução estoque de beta cristalino foi calculada em relação ao monômero tomando a média da massa molecular das diferentes cadeias e a média valores 5.3 10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> dos seus de х (Website E280nm = http://bo.expasy.org/tools/protparam.html).

Na maioria dos experimentos foi utilizada lisozima (0,14 mM) ou beta cristalino (40  $\mu$ M) e DTPA (0,1 mM) em tampão fosfato de potássio 20 mM, pH 7,0, irradiadas na presença ou não de complexo de cobalto ([Co(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>CO<sub>3</sub>]ClO<sub>4</sub>) (4 mM) em Fotoreator ICH-2 com luz UV de comprimento de onda de 254 nm (radiância de 6,3 mW/cm<sup>2</sup>) (Queiroz et al., 2013). As amostras (200  $\mu$ L) foram irradiadas por tempos de 30 s a 10 min em cela chata de quartzo ("*flat cell*") no caso da lisozima, ou em tubo de quartzo no caso da beta cristalino.

O CO<sub>3</sub>•<sup>-</sup> foi também produzido pela atividade peroxidásica da superóxido dismutase dependente de bicarbonato. Neste caso, as misturas de reação continham SOD1 humana ou bovina (15 µM dímero), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (1 mM), bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) (25 mM), DTPA (0,1 mM) e lisozima (0,14 mM) em tampão fosfato 20 mM a pH final ajustado para pH 7,4 (Medinas et al., 2009; Queiroz et al., 2013). As soluções foram incubadas a 37°C sob agitação por 1 h. A reação foi interrompida pela adição de catalase 1U/mL. Em alguns

experimentos, os níveis de oxigênio molecular foram alterados por borbulhar argônio ou oxigênio molecular no tampão por 6 min.

As amostras contendo beta cristalino (40  $\mu$ M), DTPA (0,1 mM) em tampão fosfato 20 mM, pH 7,0 também foram irradiadas em simulador solar (SOL-UV-2) equipado com lâmpadas de UVA e UVB com comprimentos de onda de 315 nm (radiância de 5 mW/cm<sup>2</sup>) e 365 nm (radiância de 6,6 mW/cm<sup>2</sup>) nos tempos de 1-180 min. Cerca de 200  $\mu$ L de reação foram transferidos para um tubo de quartzo e após a irradiação as amostras foram mantidas em gelo.

#### 3.2.4 Análises de SDS-PAGE

Alíquotas das amostras tratadas como descrito acima (cerca de 10-30 µg de proteína) foram adicionadas em tampão de amostra (62 mM Tris-HCL, pH 6,8 contendo 10% de glicerol, 2% SDS, 100 mM de DTT e 0,01% de azul de bromofenol), fervidas por 5 min e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (5% gel de empacotamento, 15% ou 20% gel de resolução) a 180 V por aproximadamente 3-6 h. Em seguida, os géis foram fixados com metanol (45%) e ácido acético (10%) por 60 min e foram corados com azul de Comassie "overnight". Análise de densitometria das bandas foi realizada usando o ImageJ 1.44p software (NIH, USA).

### 3.2.5 Detecção de radical carbonato por espectrometria de ressonância paramagnética eletrônica (EPR)

A produção de CO<sub>3</sub>•- por fotólise de UV do complexo de cobalto ou pela atividade peroxidásica da superóxido dismutase em presença de bicarbonato foram avaliadas por ERP utilizando DMPO (200 mM) como captador de spin. As incubações continham DMPO (200 mM), complexo de cobalto (4 mM) e DTPA (0,1

mM) em tampão fosfato (20 mM), pH 7,0 e em seguida foram irradiadas em "*flat cell*" de quartzo durante 10-120 s como descrito acima. Para a produção enzimática de CO<sub>3</sub>•• foi utilizado o sistema composto de DMPO (200 mM), bSOD1 (15 μM), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM), bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) (25 mM) e DTPA (0,1mM) em tampão fosfato (20 mM) pH ajustado para 7,4. As soluções foram incubadas a 37°C sob agitação por 1 h e os espectros registados a cada 10 min. A concentração de CO<sub>3</sub>•• gerada foi estimada pela integração dupla dos sinais e comparando com uma curva padrão com concentrações conhecidas de 4-hidroxi-2,2,6,6-tetra-metil-piperidiniloxila (tempol) (Queiroz et al., 2013).

#### 3.2.6 Detecção de radicais de proteína

Os radicais de lisozima ou beta cristalino foram detectados utilizando MNP ou DBNBS como spin trap. As reações contendo lisozima (0,35 mM) ou beta cristalino (40 µM) em presença de MNP (10 mM) ou DBNBS (10 mM) e DTPA (0,1 mM) em tampão fosfato de potássio (20 mM), pH 7,0 foram irradiadas em cela chata de quartzo "flat cell" ou tubo de quartzo por 60 s.

No caso da lisozima, a produção de radicais de proteína também foi avaliada utilizando o sistema enzimático (hSOD1/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) para a geração de radical carbonato. As misturas continham lisozima (0,35 mM), MNP (10 mM), DTPA (0,1 mM), bSOD (15  $\mu$ M por dímero), bicarbonato de sódio (25 mM) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) em tampão fosfato de potássio (20 mM), pH ajustado para 7,4 e foram incubadas 20 min a 37°C. A reação foi então interrompida pela adição de catalase (1 U/mL) e alíquotas de 200  $\mu$ L foram transferidas para cela chata de quartzo ("flat cell"). Os espectros foram obtidos à temperatura ambiente em um espectrômetro de banda X Bruker ER 200-SRD com instrumentação EMX e equipado com cavidade de alta sensibilidade (4119HS) (Vaz et al., 2009).

#### 3.2.7 Experimentos de Western blot

As amostras de lisozima irradiadas com complexo de cobalto ou incubadas com hSOD1/bicarbonato/peróxido de hidrogênio foram submetidas a eletroforese em SDS-PAGE conforme descrito acima (item 3.2.4). Em seguida, as bandas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose para marcação com anticorpos. A membrana foi previamente hidratada por 10 min com tampão de transferência (Tris (48 mM), glicina (39 mM), SDS (0,037%) e metanol (20%), pH 8,3) e a transferência realizada a 12 V por 2 h. Após a transferência, a membrana foi bloqueada com leite (5%) em tampão tris-salina e tween-20 (TBST) "overnight"; após 3 lavagens com tampão TSBT por 10 min, foi feita a marcação com anticorpo primário anti-hSOD produzido em ovelha (diluição de 1:5000) por 2 h. Após lavagens com TBST (3 vezes por 10 min), a membrana foi incubada por 2 h com o anticorpo secundário anti-IgG produzido em ovelha (para hSOD1) marcado com peroxidase. Após novas lavagens com tampão TBST, executou-se a revelação. A membrana foi incubada por 2 min com substrato quimioluminescente (Thermo Scientific) antes de ser exposta ao filme Kodak T-MAT G/RA para revelação. Após a revelação a membrana foi incubada com tampão Tris (62 mM) contendo SDS (2%) e β-mercaptoetanol (100 mM), pH 6,7 por 45 min a 50°C para remoção dos anticorpos. Após várias lavagens a membrana foi bloqueada novamente e incubada por 2 h com o segundo anticorpo primário anti-lisozima produzido em coelho (1:5000) e em seguida, com anticorpo secundário anti-IgG produzido em coelho para lisozima (1:5000) marcado com peroxidase. Após 1 h de incubação e 3 lavagens com TBST por 10 min, procedeu-se à revelação como descrito acima.

#### 3.2.8 Avaliação da atividade enzimática da lisozima

A atividade enzimática da lisozima foi determinada pela velocidade de lise de uma solução de *Micrococcus Iysodeikiticus* (ATCC 4698). Cerca de 6 µL das amostras de lisozima tratada ou não foram adicionadas a 994 µL de solução de *M. Iysodeikiticus* (0,01%) diluída em tampão fosfato de potássio (66 mM), pH 6,2 a 25°C. A lise bacteriana foi monitorada em espectrofotômetro a 450 nm (Shimadzu 1650 PC). Uma unidade de atividade foi definida como uma mudança de 0,001 unidades de absorbância por min (Hawkins e Davies, 2005).

### 3.2.9 Análise das modificações oxidativas da lisozima e beta cristalino por HPLC/ESI/MSMS após digestão tríptica

As bandas referentes ao monômero nativo e oxidado, dímeros e agregados separadas por SDS-PAGE foram cortadas, picadas e descoradas com uma solução de acetonitrila (50%) em bicarbonato de amônio (50 mM) "overnight". No dia seguinte, os "spots" foram reduzidos com DTT (10 mM) e alquilados com iodoacetamida (50 mM) por 30 min a cada tratamento. No caso da lisozima, os "spots" reduzidos e alquilados foram digeridos com tripsina gold (razão de proteína:tripsina 100:1) em bicarbonato de amônio (50 mM) por 16 h a 37°C. No caso da beta cristalino, os "spots" foram digeridos com tripsina gold (razão de proteína:tripsina 50:1) por 16 h a 37°C. Após digestão, os peptídeos foram eluídos do gel de poliacrilamida uma vez com água deionizada contendo 1% de ácido fórmico por 10 min a cada tratamento. Os hidrolisados foram secos em rotaevaporador e mantidos a -20°C até análise. Antes das análises, os hidrolisados foram ressuspendidos em água contendo 0,1% de ácido fórmico, desalinizados e concentrados em ZipTipC18 (Millipore, Bedford, MA). Préviamente, o ZipTipC18 foi lavado com 50% e 100%

acetonitrila contendo 0,1% ácido fórmico e então equilibrado com água contendo 0,1% de ácido fórmico. Os peptídeos foram carregados no ZipTipC18, seguindo por 3 passos de lavagem com água contendo 5% de metanol e 0,1% de ácido fórmico. Os peptídeos foram eluídos com 50% de acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico. Os hidrolisados livres de sal foram carregados em coluna ZORBAX 300SB-C18 (150 mm x 75 µm; 3,5 µm; Agilent Technologies) em um HPLC-nano acoplado a um espectrômetro de massas UHR-ESI-Q-TOF Bruker Daltonics MaXis 3G com uma fonte CaptiveSpray (Bremen, Germany). As amostras foram eluídas (300 nl/min) usando um gradiente linear de 95% solvente A (água com 0,1% ácido fórmico) e 5% solvente B (acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico) até 40% de solvente B por 40 min. As condições para a fonte CaptiveSpray foram: voltagem de capilar de 1,8kV, temperatura de desolvatação de 150°C. Como gás de colisão para MS/MS foi utilizado nitrogênio fluxo 6 l/min. A fonte de ionização foi operada em um modo positivo. Para análise e aquisição dos dados foram utilizados os softwares: "DataAnalysis" (Bruker), "Prospector" (University of California, San Francisco) e Mascot (Versão 2.5). Para análises de "cross-links" foi utilizado o "Sequence Editor" (Bruker Daltonics) e SIM-XL softwares (Lima et al., 2015), além da atribuição manual dos peptídeos. Em todos os experimentos foi utilizado um erro  $\leq \pm 0.05$  Da e  $\leq 10$ ppm.

#### 3.2.10 Preparação das lentes de pacientes com catarata

As proteínas da lente de quatro pacientes com idade de 63-75 anos contendo catarata nuclear em estágio avançado, de acordo com o sistema de classificação LOCSII (Chylack et al., 1989), foram obtidas do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo e foram utilizadas e preparadas de acordo com protocolo estabelecido pelo comitê de ética da Faculdade de Medicina, USP (CAAE

51557515.4.0000.0068). Primeiramente, as proteínas foram separadas em fração solúvel e fração insolúvel conforme descrito previamente por Wilmarth e colaboradores (2006) com algumas modificações. Cada lente foi homogeneizada separadamente em tampão Tris-HCI (20 mM), pH 7,0 contendo: metionina (2 mM), triptofano (2 mM) e coquetel de inibidores de protease (Sigma). O homogenato foi centrifugado 20,000 g por 30 min a 4°C. O sobrenadante contendo as proteínas solúveis foi separado e o pellet foi novamente ressuspendido e centrifugado como descrito acima. O pellet contendo as proteínas insolúveis foi ressuspendido por sonicação (2 pulsos de 5 sec) no gelo em tampão de homogeneização. As frações, solúvel e insolúvel, foram secas em rotaevaporador a vácuo e, subsequentemente, ressuspendidas em tampão Tris-HCI (20 mM) contendo ureia (8 M). Os resíduos de cisteína foram reduzidos com DTT (30 mM) e, depois, alquilados com iodoacetamida (50 mM) por 2 horas a cada tratamento. Finalmente, as amostras foram dialisadas "overnight" para remoção dos sais e as proteínas foram secas em rotaevaporador e mantidas a -80°C até análise. A concentração de proteínas nas frações solúvel e insolúvel foi determinada pelo método de Bradford.

#### 3.2.11 Eletroforese bidimensional

As proteínas extraídas do cristalino com catarata (fração solúvel e fração insolúvel), obtidas conforme descrito acima, foram separadas primeiramente pelo seu ponto isoelétrico utilizando fitas de gel de poliacrilamida com gradiente de pH imobilizado (GE *Healthcare*). As amostras contendo as proteínas (cerca de 1 mg) foram solubilizadas em tampão de reidratação contendo: ureia (8 M), tiouréia (2 M), detergente CHAPS (2%), azul de bromofenol (0,002%), DTT (1 M) e anfólitos pH 3-10 (0,05%). Em seguida as fitas foram colocadas sobre as amostras e foram reidratadas por 17 h em um recipiente fechado. Em seguida, as fitas foram

transferidas para um equipamento Ettan IPGphor 3 IEF e submetidas ao protocolo para focalização isoelétrica padrão para o tipo de fita empregada (GE *Healthcare*). Antes de realizar a segunda dimensão da eletroforese, as proteínas presentes na fita de poliacrilamida foram reduzidas com DTT (10 mM) e alquiladas com iodoacetamida (50 mM) por 30 min a cada tratamento executado em tampão de equilíbro contendo tampão Tris-HCI (1 M), pH 8,8, ureia (8 M), SDS (2%), glicerol (29,3% v/v) e azul de bromofenol (1%). As fitas foram localizadas no topo de um gel de 15% SDS-PAGE e o sistema foi selado com agarose e resolvido conforme descrito **item 3.2.4**.

### 3.2.12 Análise das proteínas obtidas de lentes humana com catarata por HPLC/ESI/MSMS após digestão tríptica

As bandas referentes ao monômero nativo e oxidado e ao dímero foram separadas por SDS-PAGE em 1D e 2D e foram preparadas como descrito no **item 3.2.9**. Os "spots" contendo as proteínas foram tratados para redução e alquilação dos resíduos de cisteína e, em seguida, digeridos com tripsina gold (razão de proteína: tripsina 50:1) em tampão bicarbonato de amônio 50 mM, pH 8,0 por 8 h a 37°C. Em seguida, foi realizada uma nova adição de tripsina e as amostras foram incubadas por mais 12 h. Os peptídeos foram extraídos do gel, desalinizados e analisados por HPLC-ESI-MSMS como descrito no **item 3.2.9** com modificações nas condições de HPLC. Os hidrolisados livres de sal foram carregados em uma coluna nano ACQUITY UPLC-C18 (100 mm x 100 µm; 1,7 µm; Waters). Para os peptídeos provenientes da digestão triptíca do monômero nativo e oxidado foi utilizado um gradiente linear (fluxo de 400 nl/min) de 99% de solução A (água em 0,1% de ácido fórmico) e 1% de solução B (acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico)

solução B até 70 min. No caso dos peptídeos provenientes da digestão triptíca do dímero foi utilizado um gradiente linear de 99% de solução A (água em 0,1% de ácido fórmico) e 1% de solução B (acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico) até 80 min, 50% de solução B até 83 min, 90% de solução B até 103 min e 90-1% de solução B até 124 min.

#### 3.2.13 Dosagem de proteínas

A concentração de proteína total das amostras tratadas bem como das proteínas purificadas foi determinada pelo ensaio colorimétrico de Bradford a 595 nm (Bradford, 1976). A curva de calibração foi construída com BSA (0 a 5 µg/mL).

#### 3.2.14 Análises estatísticas

Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. A significância estatística foi calculada com o teste *t* ou, no caso de comparações múltiplas, com o teste ANOVA e pós teste Tukey utilizando o programa Graphpad versão 4.0.

#### 4 **Resultados**

#### 4.1 Experimentos com lisozima

# 4.1.1 O radical carbonato promove oxidação, dimerização e inativação da lisozima

Para examinar os efeitos do radical carbonato na estrutura e função da lisozima, o oxidante foi produzido pela fotólise do complexo de cobalto ([Co(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>CO<sub>3</sub>]ClO<sub>4</sub>) ou pela atividade peroxidásica dependente de bicarbonato da enzima hSOD1 como previamente descrito (Zhang et al., 2003; Queiroz et al., 2013; Iqbal et al., 2014). Os rendimentos de radical carbonato produzido em nossos experimentos fotolíticos (complexo de cobalto (4 mM), DTPA (0,1 mM) em tampão fosfato (20 mM), pH 7,0 irradiação a 254 nm) ou enzimáticos (hSOD1 (15 μM), bicarbonato (25 mM), DTPA (0,1 mM) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) em tampão fosfato (20 mM), pH 7,4, 37°C) foram estimados por experimentos de captação de spin com DMPO (200 mM) (Fig. 4). De fato, o radical carbonato oxida o captador de spin para produzir o radical aduto DMPO/•OH, o qual pode ser detectado e quantificado por seu espectro de EPR característico (Zhang et al., 2002; Alvarez et al., 2007). Os rendimentos do aduto DMPO/•OH foram tempo-dependentes, sendo que o rendimento máximo foi obtido após 60 s de irradiação do complexo de cobalto (130  $\pm$  11  $\mu$ M) (Fig. 4A e B) ou depois de 20 min de incubação com o sistema enzimático  $(47 \pm 7 \mu M)$  (Fig. 4C). Em tempos longos, os níveis do DMPO/•OH diminuem, provavelmente devido a sua instabilidade (t<sub>1/2</sub> de aproximadamente 14 min em soluções aquosas) (Castelhano et al., 1983). Também, porque a produção de radical carbonato cessa. De fato, o complexo de cobalto decai a pH 7,0 (Dasgupta, e Harris, 1969) e a hSOD1 é inativada durante sua atividade peroxidásica dependente de bicarbonato (Queiroz et el., 2013 e Coelho et al., 2014). Portanto, a
concentração do aduto DMPO/•OH a cada tempo fornece uma sub-estimação da concentração total de radical carbonato produzido. Além do decaimento do DMPO/•OH, outros alvos competem com DMPO pelo radical carbonato, tais como a hSOD1 que não apenas produz, mas também reage com radical carbonato (Queiroz et al., 2013). Mesmo assim, esses experimentos foram úteis para mostrar que, sob as condições experimentais empregadas, o sistema fotolítico gera aproximadamente 2,8 vezes mais radical carbonato do que o sistema enzimático. Os rendimentos do radical carbonato estimados quando hSOD1 foi substituída por bSOD1 foram comparáveis (dados não mostrados).



Figura 4. Rendimento do radical carbonato produzido por fotólise e pelo sistema enzimático estimado por experimentos de captação de spin com DMPO (A) espectro de EPR representativo do radical aduto DMPO/\*OH produzido por fotólise de complexo de cobalto (4 mM), DMPO (200 mM) e DTPA (0,1 mM) em tampão fosfato (20 mM), pH 7,0 após os tempos especificados. (B) Rendimentos de DMPO/\*OH produzidos como em (A) e quantificados como descrito nos procedimentos experimentais. (C) Rendimentos do radical aduto DMPO/\*OH produzidos pelo sistema enzimático após os tempos especificados e quantificados como em (B). As incubações enzimáticas continham: hSOD1 (15  $\mu$ M), bicarbonato (25 mM), DTPA (0,1 mM) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) em tampão fosfato (20 mM) ajustado para pH 7,4, e foram incubadas a 37°C. Condições instrumentais: Potência, 20 mW; constante de tempo, 81,92 ms; tempo de varredura, 167,77 s, amplitude de modulação, 1 G; ganho de 6,32 x 10<sup>4</sup>. Os valores mostrados correspondem à média ± desvio padrão obtido em 3 experimentos independentes; os valores a diferentes tempos para ambos sistemas foram significativamente diferentes \*p < 0,05.

Em seguida, a lisozima (0,35 mM) foi tratada com ambos os sistemas geradores de radical carbonato e a produção de radicais de lisozima foi estimada por experimentos com o captador de spin MNP (Fig. 5). Embora o MNP seja sensível à luz, sendo oxidado e gerando um sinal de EPR consistente com um triplete móvel (Kalyanaraman et al., 1979), ele foi empregado porque o ácido 5,5-bromo-4-nitrosobenzenosulfonico, outro eficiente captador de radicais de proteínas, promove agregação da lisozima (dados não mostrados). Nesses estudos, a lisozima foi empregada em concentrações mais altas (0,35 mM) do que nos outros

experimentos (0,14 mM) para minimizar o sinal devido à oxidação do MNP pela luz (o triplete móvel marcado na (Fig. 5A, primeiro espectro)). A oxidação do MNP induzida pela luz foi menor em presença de lisozima (Fig. 5A, segundo espectro) porque parte da luz é absorvida pela enzima. Os radicais derivados da lisozima foram detectados apenas em presença de complexo de cobalto/luz (Fig. 5A, quarto espectro). No sistema enzimático, hSOD1 foi substituída pela bSOD1 porque sua atividade peroxidásica dependente de bicarbonato produz o radical carbonato mas não produz rendimentos consideráveis de radical aduto de proteína como ocorre com a hSOD1 (Iqbal et al., 2014 e Karunakaran et al., 2004). Os nitróxidos imobilizados detectados em presença do complexo de cobalto/luz e em presença do sistema enzimático foram similares e característicos de um radical aduto MNP/•proteína, tais como MNP/•Trp-lisozima e/ou MNP/•Tyr-lisozima. Infelizmente, esses adutos não podem ser distinguidos exclusivamente pelos parâmetros do espectro de EPR (Aust et al., 1993; Augusto e Vaz, 2007). O rendimento máximo do radical aduto MNP/•lisozima nos experimentos de fotólise foi aproximadamente 2,5 vezes maior do que aquele do sistema enzimático (Fig. 5), seguindo a mesma tendência observada para o rendimento do radical carbonato (Fig. 4).



Figura 5. Espectro de EPR representativo do radical aduto MNP/lisozima produzido pelo radical carbonato. Gerado por fotólise (A) e enzimaticamente (B). Lisozima (0,35 mM) foi incubada em presença de MNP (10 mM) com sistema fotolítico (complexo de cobalto (CoC) (4 mM) e DTPA (0,1 mM) em tampão fosfato (20 mM), pH 7,0) por 60 s a temperatura ambiente ou com o sistema enzimático (hSOD1 (15  $\mu$ M), bicarbonato (25 mM), DTPA (0,1 mM) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) em tampão fosfato (20 mM) ajustado para pH 7,4) por 20 min a 37°C. Os controles apropriados foram corridos em paralelo; o sistema fotolítico mostra 2 controles, luz mais MNP (primeiro espectro) e lisozima mais MNP mais luz (segundo espectro). O espectro marcado refere-se ao nitróxido móvel produzido por foto-oxidação do MNP. As incubações e análises foram realizadas como descrito nos procedimentos experimentais. Condições experimentais: Potência, 20 mW; constante de tempo 327,7 ms; tempo de varredura, 335,5 s; amplitude de modulação, 1 G; ganho 6,32 x 10<sup>5</sup> para todos os espectros exceto no primeiro espectro para o qual o ganho foi de 6,32 x 10<sup>4</sup>.

Após a detecção de radicais derivados da lisozima (Fig. 5), avaliamos a presença de oligômeros da lisozima analisando as incubações por SDS-PAGE em condições redutoras. Os primeiros experimentos foram realizados com o sistema que gera concentrações mais altas de radical carbonato e, portanto, de radicais de lisozima, ou seja, a fotólise do complexo de cobalto (Fig. 6). Após tratamento com esse sistema, a lisozima mostrou uma pequena redução da banda do monômero (aproximadamente 14 kDa) e o aparecimento de uma banda a aproximadamente 28 kDa. A intensidade dessa banda aumentou com o tempo de irradiação até 60 s (Fig. 6A e 6B), similarmente ao rendimento do radical carbonato (Fig. 4). Esses

resultados sugerem que o ataque da lisozima pelo radical carbonato produz um hipotético dímero covalente além de outros produtos. Para confirmar esses resultados, a lisozima (60  $\mu$ M) foi tratada com ambos os sistemas em condições de máxima geração de radical carbonato (Figs. 4 e 5). As incubações foram examinadas por SDS-PAGE em condições redutoras, seguidas de análises de Western-blot revelados com anticorpo anti-SOD1, e, subsequentemente, com anticorpo anti-lisozima. Os resultados confirmaram a produção do dímero de lisozima tanto no sistema fotolítico como no sistema enzimático (Fig. 6C). Adicionalmente, eles mostraram que o tratamento da lisozima com o sistema enzimático resultava na formação de um hetero-dímero lisozima-hSOD1. Além disso, a adição de lisozima ao sistema enzimático levou a uma diminuição da intensidade do dímero hSOD1-Trp<sup>32</sup>-Trp<sup>32</sup>-hSOD1 (aproximadamente 40 kDa) (Medinas et al., 2010) e ao aparecimento de uma nova banda correspondente a um hetero-dímero lisozima-hSOD1 em aproximadamente 35 kDa (Fig. 6C). Experimentos de Western-blot realizados em paralelo com o anticorpo anti-lisozima confirmaram que a irradiação da lisozima por 60 s em ausência do complexo de cobalto não leva à dimerização (Fig. 6D).



Figura 6. Oligomerização da lisozima promovida pelo radical carbonato gerado enzimaticamente e fotoliticamente. (A) Análises de SDS-PAGE da lisozima (0,14 mM) irradiada nos tempos específicados com o complexo de cobalto (4 mM) em tampão fosfato (20 mM) contendo DTPA (0,1 mM). Alíquotas correspondentes a 30 µg de proteína foram analisadas como descrito nos procedimentos experimentais. O gel foi corado com azul de Comassie. (B) O rendimento do dímero de lisozima expresso como área relativa da banda de aproximadamente 28 kDa obtida como descrito em (A) em 3 experimentos independentes; \*p < 0,05. (C) Análise de western blot da lisozima (60 μM) incubada com o sistema fotolítico (complexo de cobalto (4 mM) e DTPA (0,1 mM) em tampão fosfato (20 mM), pH 7,0) por 60 s à temperatura ambiente ou com o sistema enzimático (hSOD1 (15 µM), bicarbonato (25 mM), DTPA (0,1 mM) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) em tampão fosfato (20 mM) pH ajustado para 7,4) por 60 min a 37°C; controles apropriados foram corridos em paralelo. Depois da incubação, as amostras (10 µg proteína) foram analisadas por SDS-PAGE e Western-blot com anticorpo antihSOD1 e, subsequentemente, com anticorpo anti-lisozima, (D) Análises de Western-blot com outro lote de anticorpo anti-lisozima para confirmar que a lisozima irradiada por 60 s em ausência de complexo de cobalto não produz dímero de lisozima. A posição do dímero de lisozima (Liso-Liso) e dímero da hSOD1 (hSOD1-hSOD1) e do hetero-dímero (Liso-hSOD1) estão marcadas e especificadas.

Os resultados acima (Figs. 4-6) mostram que a lisozima é oxidada pelo radical carbonato gerado fotoliticamente ou enzimaticamente produzindo radicais derivados de lisozima, os quais, reagem com eles mesmos para produzir dímeros de lisozima e também, reagem com radicais derivados da hSOD1, se presentes, para produzir um hetero-dímero lisozima-hSOD1. Além do dímero e do hetero-dímero de lisozima, outros produtos foram formados como indicado pelas bandas

mais fracas observadas (Fig. 6). Como consequência da sua oxidação, a lisozima é inativada (Figs. 7A e 7B) de forma dependente do rendimento de radical carbonato formado em cada sistema (Fig. 4). O efeito de variar os níveis de oxigênio molecular no rendimento do dímero de lisozima obtido no sistema fotolítico foi examinado. Para isso, os níveis do oxigênio molecular no tampão (250 µM de oxigênio atmosférico, 25°C) foram diminuídos ou aumentados borbulhando argônio ou oxigênio molecular, respectivamente, no tampão. Os resultados mostraram que o rendimento do dímero de lisozima aumentou sob níveis reduzidos de oxigênio e diminuiu com altos níveis de oxigênio (Fig. 7C e 7D); as diferenças foram pequenas, mas significativas em todas as condições testadas. Experimentos similares não foram realizados com o sistema enzimático porque a atividade peroxidásica da hSOD1 produz oxigênio molecular (Medinas et al., 2009).

Em seguida, tentamos caracterizar os principais produtos de oxidação da lisozima sob tensões atmosféricas de oxigênio.

42



Figura 7. Inativação da lisozima promovida pelo radical carbonato gerado fotoliticamente (A) e enzimaticamente (B) e efeitos dos níveis de oxigênio molecular na dimerização da lisozima (C e D). Lisozima (0,14 mM) foi incubada com o sistema fotolítico (complexo de cobalto (4 mM) e DTPA (0,1 mM) em tampão fosfato (20 mM), pH 7,0) pelos tempos específicados à temperatura ambiente ou com o sistema enzimático (hSOD1 (15 µM), bicarbonato (25 mM), DTPA (0,1 mM) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) em tampão fosfato (20 mM) pH ajustado para 7.4) 60 min a 37°C; os controles apropriados foram corridos em paralelo. Após os tempos especificados, alíquotas foram removidas e a atividade enzimática da lisozima foi determinada como descrito nos procedimentos experimentais. A atividade residual foi expressa como porcentagem do controle apropriado, como especificado. Os valores apresentados correspondem à média ± desvio padrão obtidos em 3 experimentos independentes; \*p < 0,05. (C) Análises de SDS-PAGE da lisozima (0,14 mM) irradiada pelos tempos especificados com complexo de cobalto (4 mM) em tampão fosfato (20 mM) contendo DTPA (0,1 mM) sob condições normais ou reduzidas de oxigênio. Alíquotas correspondentes a 10 ug de proteína foram removidas e analisadas como descrito nos procedimentos experimentais. O gel foi corado com azul de Coomassie. (D) O rendimento do dímero de lisozima foi expresso como área relativa da banda de aproximadamente 28 kDa como obtido em (C) em 3 experimentos independentes; \*p < 0,05.

#### 4.1.2 Caracterização dos produtos de oxidação da lisozima

Aparentemente, os radicais de lisozima captados por MNP (Fig. 5A) foram críticos para a formação do dímero de lisozima à medida que MNP inibiu a dimerização da lisozima captando os radicais (Fig. 8A). Para caracterizar o radical

aduto MNP/•lisozima por análises de MS, as misturas de reação mostradas em Fig.

8A foram aplicadas em triplicatas no gel de SDS-PAGE e as bandas correspondentes ao monômero de lisozima foram cortadas, agrupadas, digeridas com tripsina e submetidas à análise por nano-ESI-Q-TOF-MS, como descrito nos procedimentos experimentais. Apenas o espectro de MS da amostra contendo MNP mostrou um pico com razão massa/carga (*m/z*) de 706,34 (Fig. 8B). Este pico corresponde ao peptídeo da lisozima <sup>22</sup>GYSLGNWVCAAK<sup>33</sup> com adição de MNP (massa monoisotópica de 1410,64) com duas cargas, indicando que o MNP captou o radical de lisozima centrado no Trp<sup>28</sup>. Infelizmente, não foi possível caracterizar o aduto MNP/\*Trp<sup>28</sup>-lisozima por análises de MS/MS devido à baixa detecção do íon. Todavia, os resultados mostrados na Fig. 8B indicam que o radical lisozima/Trp<sup>28</sup>• é o responsável pela dimerização da lisozima. Está conclusão foi confirmada por análises de MS/MS do dímero de lisozima e do hetero-dímero de lisozima-hSOD1 como será mostrado abaixo.



Figura 8. Caracterização por ESI-Q-TOF-MS do radical aduto MNP/lisozima produzido pelo radical carbonato gerado fotoliticamente. (A) Análise de SDS-PAGE da lisozima (0,14 mM) irradiada por 60 s com complexo de cobalto (4 mM) em presença ou ausência de MNP (10 mM) em tampão fosfato (20 mM), pH 7,0 contendo DTPA (0,1 mM). Após incubação, alíquotas correspondente a 30 µg de proteína foram removidas e analisadas como descrito nos procedimentos experimentais. O gel foi corado com azul de Coomassie. (B) Espectros de ESI-Q-TOF-MS das amostras obtidas como descrito em (A). Depois da eletroforese, cada amostra foi digerida, extraída do gel e submetida a análise por ESI-Q-TOF-MS como descrito nos procedimentos experimentais.

Para analisar os principais produtos de oxidação da lisozima, as amostras foram separadas como descrito na Fig. 6B e submetidas a SDS-PAGE. As bandas correspondentes ao monômero nativo e ao monômero oxidado pelo radical carbonato gerado fotoliticamente ou enzimaticamente (aproximadamente 14 kDa, 3 bandas correspondentes bandas cada) е as ao dímero da lisozima (aproximadamente 28 kDa, 8 bandas) e ao hetero-dímero lisozima-hSOD1 (aproximadamente 35 kDa, 8 bandas) foram cortadas, digeridas com tripsina e nano-ESI-Q-TOF-MS/MS submetidas à análise por como descrito nos procedimentos experimentais.

45

Como esperado, o monômero nativo apresentou seus peptídeos não modificados (Tabela 1). As amostras correspondentes ao monômero nativo da lisozima tratada com radical carbonato gerado enzimaticamente ou fotoliticamente apresentaram uma mistura de peptídeos modificados e não modificados. O monômero oxidado pelo radical carbonato produzido fotoliticamente apresentou peptídeos trípticos contendo triptofanos oxidados a hidroxi-triptofano (Trp<sup>28</sup> e Trp<sup>123</sup>) e *N*-formilquinurenina (Trp<sup>28</sup>, Trp<sup>62</sup> e Trp<sup>123</sup>). Os resultados são resumidos na Tabela 1 e os espectros de MS e MS/MS dos peptídeos contendo resíduos de Trp oxidados são apresentados no apêndice A (Figs. A1-A3). No caso da lisozima oxidada pelo sistema enzimático, a única modificação encontrada foi no Trp<sup>28</sup> oxidado a *N*-formilquinurenina (Tabela 1). A limitada oxidação da lisozima pelo sistema enzimático é provavelmente devida ao baixo rendimento de radical carbonato em comparação ao sistema fotolítico (Fig. 4) e ao fato de que a hSOD1 compete com a lisozima pelo radical gerado.

**Tabela 1.** Caracterização por nano-ESI-Q-TOF-MS/MS das modificações oxidativas no monômero da lisozima tratada com radical carbonato gerado enzimaticamente e fotoliticamente <sup>a</sup>

Peptídeos <sup>b</sup>	Massa teórica (M+H)	Monômero nativo <sup>c</sup>	Monômero oxidado (UV/CoC)	Monômero oxidado (hSOD1/HCO3 <sup>-</sup> /H2O2)	Aminoácidos modificados <sup>d</sup>	Íon score <sup>e</sup>
<sup>6</sup> CELAAAMK <sup>13</sup>	893,421	893,421	893,421	893,421		41
<sup>22</sup> GYSLGNWVCAAK <sup>33</sup>	1325,631	1325,631	1325,631	1325,631		48
			1341,626		W <sup>28</sup> +16 (OH)	61
			1357,621	1357,621	W <sup>28</sup> +32 (NFK)	31
<sup>34</sup> FESNFNTQATNR <sup>45</sup>	1428,650	1428,650	1428,650	1428,650		71
<sup>46</sup> NTDGSTDYGILQINSR <sup>61</sup>	1753,835	1753,835	1753,835	1753,835		101
<sup>62</sup> WWCNDGR <sup>68</sup>	993,399	993,399	993,399	993,399		38
			1025,364		W <sup>62</sup> +32 (NFK)	48
62WWCNDGRTPGSR73	1491,654	1491,654	1491,654			31
<sup>74</sup> NLCNIPCSACCSSDITASVNCAK <sup>96</sup>	2508,189	2508,189	2508,189	2508,189		69
<sup>97</sup> KIVSGNGMNAWVAWR <sup>112</sup>	1803,896	1803,896	1803,896	1803,896		62
98IVSDGNGMNAWVAWR112	1675,801	1675,801	1675,801	1675,801		129
<sup>115</sup> CKGTDVQAWIR <sup>125</sup>	1333,668	1333,668	1333,668	1333,668		46
<sup>117</sup> GTDVQAWIR <sup>125</sup>	1045,543	1045,543	1045,543	1045,543		45
			1061,537		W <sup>123</sup> +16 (OH)	31
			1077,538		W <sup>123</sup> +32 (NFK)	47

<sup>a</sup> Lisozima (0,14 mM) foi incubada com o sistema fotolítico (complexo de cobalto (4 mM) e DTPA (0,1 mM) em tampão fosfato (20 mM), pH 7,0 por 60 s à temperatura ambiente) ou com o sistema enzimático (hSOD1 (15 μM), bicarbonato (25 mM), DTPA (0,1 mM) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) em tampão fosfato (20 mM), pH 7,4 (ajustado) por 60 min a 37°C). As amostras foram submetidas a análises de SDS-PAGE e as bandas correspondentes à lisozima monômero (aproximadamente 14 kDa) foram cortadas do gel, reduzidas, alquiladas, digeridas com tripsina e submetidas a LC-MS/MS como descrito nos procedimentos experimentais.

<sup>b</sup> Todos os resíduos de cisteína e metionina foram modificados a carbamidometil e metionina sulfóxido, respectivamente.

° Lisozima não tratada.

<sup>d</sup> NFK refere-se a *N*-formilquinurenina.

• Íon score é -10 log (P) onde P é a probabilidade da marca observada ser um evento aleatório. Em média, íon score individual > 30 indica identidade ou extensa homologia (p < 0,05). Os valores mostrados são aqueles do monômero oxidado pelo sistema enzimático; os valores referentes ao sistema fotolítico são diferentes (como esperado) mas similares.</p>

O hipotético dímero da lisozima (aproximadamente 28 kDa) (Figs. 6 e 8) foi similarmente caracterizado por nano-ESI-Q-TOF-MS/MS. Os digestos trípticos desse dímero apresentaram picos com *m*/z 883,41 e *m*/z 662,81, correspondendo ao peptídeo dimérico (<sup>22</sup>GYSLGNWVCAAK<sup>33</sup>)<sub>2</sub>, com massa monoisotópica de 2647,24 Da, com 3 e 4 cargas, respectivamente (Fig. 9 inserto). O sequenciamento do pico com *m*/z 662,81 é também mostrado na Fig. 9. Esse peptídeo dimérico exibiu uma ligação cruzada envolvendo dois resíduos de triptofano, a qual foi quebrada sob as condições de MS/MS para produzir fragmentos da série y e fragmentos da série y com - 2 Da a partir do fragmento y<sub>6</sub> ao y<sub>12</sub> da série y (Tabela 2), comportamento similar ao relatado para o dímero hSOD1-Trp<sup>32</sup>-Trp<sup>32</sup>-hSOD1 (Medinas et al., 2010). Esses resultados caracterizam completamente o dímero de lisozima -Trp<sup>28</sup>-Trp<sup>28</sup>-lisozima. Deve ser notado que os digestos trípticos do dímero de lisozima não apresentaram picos correspondentes a outros peptídeos modificados (Dados não apresentados).



**Figura 9.** Análise por nano-ESI-Q-TOF-MS/MS do peptídeo dimérico (<sup>22</sup>GYSLGNWVCAAK<sup>33</sup>)<sub>2</sub> obtido da lisozima tratada com o radical carbonato gerado fotoliticamente. O sequenciamento do pico com *m*/z 662,81 foi realizado por análises de MS/MS e corresponde ao peptídeo (<sup>22</sup>GYSLGNWVCAAK<sup>33</sup>)<sub>2</sub> com massa monoisotópica 2647,24 Da com 4 cargas. O inserto acima exibe o espectro de MS do peptídeo com 4 cargas (lado esquerdo) e os fragmentos do peptídeo com as séries y e b (lado direito). O dímero da lisozima (Liso-Liso) foi produzido sob as mesmas condições descritas na Fig. 6A. As amostras foram separadas por SDS-PAGE e 8 bandas (aproximadamente 28 kDa) foram cortadas do gel, digeridas com tripsina e submetidas à análise por ESI-Q-TOF-MS/MS como descrito nos procedimentos experimentais.

		• • • • • • • • • •	•/ • • • / •	
Fragmento y	Sequência <sup>b</sup>	m/z	Sequência <sup>b</sup>	m/z
<b>y</b> 1	К	147,10	К	147,10
<b>y</b> 2	AK	218,14	AK	218,14
Уз	AAK	289,18	AAK	289,18
<b>y</b> 4	<b>C</b> <sup>b</sup> AAK	449,21	<b>C</b> <sup>b</sup> AAK	449,21
<b>y</b> 5	VCAAK	548,28	VCAAK	548,28
<b>y</b> 6	WVCAAK	734,36	W <b>(-2H)</b> VCAAK	732,36
У7	NWVCAAK	848,40	NW <b>(-2H)</b> VCAAK	846,40
<b>y</b> 8	GNWVCAAK	905,42	GNW <b>(-2H)</b> VCAAK	903,42
<b>y</b> 9	LGNWVCAAK	1018,51	LGNW <b>(-2H)</b> VCAAK	1016,51
<b>y</b> 10	SLGNWVCAAK	1105,53	SLGNW <b>(-2H)</b> VCAAK	1103,53

**Tabela 2.** Série y dos fragmentos obtidos por análise de MS/MS do peptídeo tríptico do dímero da lisozima (<sup>22</sup>GYSLGNWVCAAK<sup>33</sup>)<sub>2</sub><sup>a</sup>

<sup>a</sup> As condições experimentais de análise são as mesmas condições descritas na Fig. 9. As duas series y foram obtidas durante o sequenciamento do pico *m/z* 662,81 por análises de MS/MS.
<sup>b</sup> Os resíduos de cisteína foram modificados a carbamidometil.

Em seguida, o hipotético hetero-dímero entre lisozima e hSOD1 (banda em aproximadamente 35 kDa) (Fig. 6C) foi similarmente caracterizado por nano-ESI-Q-

TOF-MS/MS. Análises de MS dos peptídeos trípticos do hetero-dímero usando o programa Mascot (Matrix Science Ltd., London) e a atribuição manual dos peptídeos identificaram 61% os peptídeos da lisozima e 64% dos peptídeos da hSOD1, todos eles não modificados (Tabela 3). Além disso, o peptídeo hetero-dimérico foi evidenciado pelos picos com *m/z* 671,33 e 503,75, correspondentes ao peptídeo  $^{22}$ GYSLGNW(<sup>31</sup>VWGSIK<sup>36</sup>)VCAAK<sup>33</sup> (peptídeos da hSOD1 são descritos em negrito) com uma massa monoisotópica de 2011,02 Da, com 3 e 4 cargas, respectivamente. O sequenciamento do peptídeo de *m/z* 671,33 por análises de MS/MS é mostrado na Fig. 10 e os fragmentos das séries y são apresentados na Tabela 4. Observa-se que o fragmento y<sub>6</sub> da lisozima aparece como y<sub>6</sub> (*m/z* 734,36) como um fragmento relacionado com -2 Da (*m/z* 732,36) e outro fragmento y<sub>6</sub> com +184,04 Da (*m/z* 919,47) correspondente ao Trp<sup>32</sup> da hSOD1 (186,08) - 2H (Tabela 4). Esses resultados mostram que o hetero-dímero formado possui uma ligação cruzada entre o Trp<sup>28</sup> da lisozima e o Trp<sup>32</sup> da hSOD1 (lisozima-Trp<sup>28</sup>-Trp<sup>32</sup>-hSOD1) (Fig. 10 e Tabela 4).

MS <sup>a</sup>				
	Peptídeos trípticos <sup>b</sup>	Massa	Dímero Liso-hSOD1	Íon
		teórica	(hSOD1/HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	score d
		(M+H)		
Peptídeos				
hSOD1				
	<sup>5</sup> AVCVLKGDGPVQGIINFEQK <sup>24</sup>	2172,148	2172,148	66
	<sup>11</sup> GDGPVQGIINFEQK <sup>24</sup>	1501,765	1501,765	91
	<sup>38</sup> GLTEGLHGFHVHEFGDNTAG	3519,635	3519,635	65
	CTSAGPHFNPLSR <sup>70</sup>			
	<sup>81</sup> HVGDLGNVTADK <sup>92</sup>	1225,671	1225,671	58
	<sup>81</sup> HVGDLGNVTADKDGVADVSI	3720,813	3720,813	76
	EDSVISLSGDHCIIGR <sup>116</sup>			
Peptídeos				
Liso <sup>c</sup>				
	<sup>6</sup> CELAAAMK <sup>13</sup>	893,421	893,421	50
	<sup>34</sup> FESNFNTQATNR <sup>45</sup>	1428,650	1428,650	91
	<sup>46</sup> NTDGSTDYGILQINSR <sup>61</sup>	1753,835	1753,835	130
	<sup>62</sup> WWCNDGR <sup>68</sup>	993,399	993,399	46
	74NLCNIPCSACCSSDITASVNC	2508,189	2508,189	108
	AK <sup>96</sup>			
	<sup>97</sup> KIVSGNGMNAWVAWR <sup>112</sup>	1803,896	1803,896	71
	98IVSDGNGMNAWVAWR112	1675,801	1675,801	138
	<sup>115</sup> CKGTDVQAWIR <sup>125</sup>	1333,668	1333,668	36
	<sup>117</sup> GTDVQAWIR <sup>125</sup>	1045,543	1045,543	35
Hetero	<sup>22</sup> GYSLGNW( <sup>31</sup> VWGSIK <sup>36</sup> )V	2012,006	2012,006	65
peptídeo	CAAK <sup>33</sup>			

**Tabela 3.** Caracterização das modificações oxidativas do dímero lisozimahSOD1 resultante do radical carbonato gerado enzimaticamente por análise de MS<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Lisozima (0,14 mM) foi incubada com hSOD1 (15  $\mu$ M), bicarbonato (25 mM), DTPA (0,1 mM) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM) em tampão fosfato, pH 7,4 (ajustado) por 1 h, 37°C. As amostras foram submetidas a SDS-PAGE e as bandas correspondentes ao dímero lisozima-hSOD1 (aproximadamente 35 kDa) foram cortadas do gel, reduzidas, alquiladas, digeridas com tripsina e submetidas a LC-MS/MS como descrito nos procedimentos experimentais.

<sup>b</sup> Liso é usada como abreviação de lisozima.

<sup>c</sup> Todos os resíduos de cisteína e metionina foram modificados a carbamidometil e metionina sulfóxido, respectivamente.

<sup>d</sup> Íon score é -10 log (P) onde P é a probabilidade da marca observada ser um evento aleatório. Em média, íon score individual > 30 indica identidade ou extensa homologia (p < 0,05).



**Figura 10.** Análise do peptídeo tríptico dimérico <sup>22</sup>GYSLGNW(<sup>31</sup>VWGSIK<sup>36</sup>)VCAAK<sup>33</sup> obtido da lisozima tratada com radical carbonato gerado enzimaticamente por nano-ESI-Q-TOF-MS/MS. A sequência do peptídeo foi obtida por análises de MS/MS do pico *m/z* 671,33, o qual corresponde ao peptídeo <sup>22</sup>GYSLGNW(<sup>31</sup>VWGSIK<sup>36</sup>)VCAAK<sup>33</sup> (massa monoisotópica de 2011,02 Da) com 3 cargas. O inserto exibe o espectro de MS do peptídeo com 3 cargas (lado direito) e os fragmentos da série y (lado esquerdo). O dímero lisozima-hSOD1 foi produzido nas mesmas condições descritas na Fig. 6C. As amostras foram separadas por SDS-PAGE e 8 bandas (aproximadamente 35 kDa) foram cortadas do gel, digeridas com tripsina e submetidas à análises por nano-ESI-Q-TOF-MS/MS como descrito nos procedimentos experimentais.

Fragmentos y (lisozima)	Sequência °	m/z	Fragmentos y (hSOD1)	Sequência	m/z
<b>y</b> 1	К	147,10	<b>y</b> 1	К	147,10
У2	AK	218,14	y <sub>2</sub>	IK	260,21
Уз	AAK	289,18	y <sub>3</sub>	SIK	347,24
y4	CAAK	449,21	У4	GSIK	404,27
У5	VCAAK	548,28	y <sub>5</sub>	WGSIK	590,32
y <sub>6</sub> d	WVCAAK	734,36	¥6	VWGSIK	688,39
	W(-2H)VCAAK	732,36	•		
	WVCAAK+( <b>W</b> )-2 H	919,47			
<b>Y</b> 7	NWVCAAK	848,39			
y8	GNWVCAAK	905,43			
у У9	LGNWVCAAK	1018,51			
У10	SLGNWVCAAK	1105,54			

**Tabela 4.** Fragmentos das series y obtidos após análises de MS/MS do peptídeo tríptico do dímero lisozima-hSOD1 (<sup>22</sup>GYSLGNW(<sup>31</sup>VWGSIK<sup>36</sup>)VCAAK<sup>33</sup>) <sup>a b</sup>

<sup>a</sup>Os resíduos da hSOD1 são mostrados em negrito.

<sup>b</sup> As condições experimentais são as mesmas descritas na Fig. 10. As séries-y foram obtidas durante as análises de MS/MS do pico de *m/z* 671,33.

° Os resíduos de cisteína foram modificados a carbamidometil.

<sup>d</sup> O fragmento y<sub>6</sub> foi observado intacto, com - 2 Da e com o resíduo de **W** da hSOD1 - 2 Da.

#### 4.1.3 Oxidação da lisozima por luz UV

A oxidação das proteínas por luz UV tem sido extensivamente investigada na literatura (Pattison et al., 2011). Nas condições empregadas aqui para gerar o radical carbonato por fotólise do complexo de cobalto, os radicais derivados da lisozima (Fig. 4) e o dímero da lisozima (Fig. 6A e 6D) não foram observados nos controles porque a enzima foi irradiada por 60 s. Todavia, 60 s de irradiação em ausência de complexo de cobalto levou à inativação da lisozima embora em menor extensão do que observado em presença do complexo (Fig. 7A). Análises de MS e MS/MS da lisozima irradiada por 60 s confirmaram que o resíduo de Trp<sup>62</sup> era oxidado a N-formilquinurenina em rendimento aproximadamente 8 vezes menor do que obtido em presença de luz e complexo de cobalto. Com tempos mais longos de irradiação em ausência de complexo de cobalto, os dímeros de lisozima tornam-se detectáveis por análises de SDS-PAGE (Fig. 11A). Após 10 min de irradiação, o dímero produzido apenas por luz pode ser caracterizado como lisozima-Trp<sup>28</sup>-Trp<sup>28</sup>lisozima por análise de MS e MS/MS (Fig. 11B e C). Em paralelo, o monômero da lisozima também mostrou o Trp<sup>28</sup> oxidado a hidroxi-triptofano e o Trp<sup>62</sup> e Trp<sup>123</sup> oxidados a N-formilquinurenina (dados não mostrados). Relevantemente, esses resultados mostraram que a ligação cruzada Trp-Trp pode ser produzida por luz UV.



**Figura 11. Dimerização da lisozima em presença de luz UV (A) caracterização do dímero por análises de MS (B) e MS/MS (C).** (A) Análise por SDS-PAGE da dimerização da lisozima em amostras contendo lisozima (0,14 mM) e DTPA (0,1 mM) em tampão fosfato (20 mM), pH 7,0 e irradiada pelos tempos especificados. Alíquotas correspondentes a 30 μg de proteína foram removidas e analisadas como descrito nos procedimentos experimentais. O gel foi corado com azul de Coomassie. (B) e (C) Análise por nano-ESI-Q-TOF-MS/MS do peptídeo dimérico (<sup>22</sup>GYSLGNWVCAAK<sup>33</sup>)<sub>2</sub> presente na amostra irradiada por 10 min. A caracterização do dímero foi realizada a partir do sequenciamento por MS/MS do pico com *m/z* 883,41, o qual corresponde ao peptídeo (<sup>22</sup>GYSLGNWVCAAK<sup>33</sup>)<sub>2</sub> (massa monoisotópica de 2647,24 Da) com 3 cargas. O dímero de lisozima mostrado em (A) foi isolado e 8 bandas (aproximadamente 28 kDa) que foram cortadas, agrupadas, digeridas com tripsina e submetidas a análise por ESI-Q-TOF-MS/MS como descrito nos procedimentos experimentais.

Os resultados acima descritos mostraram que o radical carbonato gerado tanto enzimaticamente como fotoliticamente promove a oxidação da lisozima a radicais de lisozima como esperado de um forte oxidante de um elétron como o radical carbonato (E<sup>°</sup> = 1,78 V, pH 7,0) (Augusto et al., 2002; Medinas et al., 2007). Os radicais de lisozima decaíram a produtos que levaram à inativação da enzima e sua dimerização covalente, entre outras modificações. Em nossas condições experimentais, todas as modificações de lisozima foram dependentes do

rendimento do radical carbonato. Os principais produtos de oxidação resultantes de ambos os sistemas geradores de radical de carbonato foram caracterizados por análise de nano-ESI-Q-TOF-MS/MS. A lisozima tratada com o sistema fotolítico resultou em monômeros oxidados a hidroxi-triptofano no Trp<sup>28</sup> e Trp<sup>123</sup> e *N*-formilquinurenina no Trp<sup>28</sup>, Trp<sup>62</sup> e Trp<sup>123</sup>. A lisozima tratada com o sistema enzimático resultou em monômeros oxidados contendo *N*-formilquinurenina no Trp<sup>28</sup>. O dímero de lisozima (aproximadamente 28 kDa) foi completamente caracterizado como lisozima-Trp<sup>28</sup>-Trp<sup>28</sup>-lisozima e o heterodímero de lisozima-hSOD1 (aproximadamente 35 kDa) foi caracterizado como lisozima-Trp<sup>28</sup>-Trp<sup>32</sup>-hSOD1. Ambos, o dímero e o heterodímero de lisozima apresentaram a ligação ditriptofano (Fig. 12). Relevantemente, mostramos que a irradiação da lisozima com luz UV também leva à dimerização da lisozima (lisozima-Trp<sup>28</sup>-Trp<sup>28</sup>-lisozima) através de uma ligação ditriptofano.



Figura 12. Representação esquemática da formação de dímeros de lisozima-hSOD1 e lisozima-lisozima por ação do radical carbonato na lisozima.

55

#### 4.2 Experimentos com beta cristalino

## 4.2.1 Oxidação e oligomerização da beta cristalino promovida pelo radical carbonato e por luz UVC

Os resultados obtidos com a lisozima, principalmente sua oxidação a ditriptofano por luz UVC, motivou-nos a estudar os efeitos do radical cabonato e da luz UV sobre proteínas do cristalino, as quais possuem um alto conteúdo de triptofano. Escolhemos a beta cristalino bovino pela facilidade de obtenção comercial.

Primeiramente examinamos a formação de radicais de proteína por EPR utilizando DBNBS como captador de spin. A irradiação do DBNBS em tampão Pi 20 mM, pH 7,0 contendo DTPA (0,1 mM) resultou na formação de um triplete móvel (marcado), devido à oxidação do captador pela luz UVC (Fig. 13, primeiro espectro) (Iqbal et al., 2014). Como esperado, a intensidade do triplete móvel diminuiu em presença de beta cristalino devido à absorção de parte da luz pela proteína (Fig. 13, segundo espectro); de fato, a presença de um radical aduto imobilizado de proteína também é notada. Quando a beta cristalino foi irradiada com o sistema gerador de radical carbonato por 60 s foi observada a presença radica(is)I aduto(s) bastante imobilizado(s). As características do espectro sugerem mais de um aduto (DBNBS/\*Trp-beta cristalino e/ou DBNBS/\*Tyr-beta cristalino (Fig. 13, quarto espectro)).

Após verificar a formação de radicais de proteína nós avaliamos a oligomerização da beta cristalino promovida por radical carbonato e luz UVC por eletroforese em condições redutoras (Fig. 14).

56



Figura 13. Espectros de EPR do radical aduto DBNBS/'beta cristalino produzido por radical carbonato e luz UVC. O radical carbonato foi gerado por fotólise do complexo de cobalto. Beta cristalino (40  $\mu$ M) foi incubada em presença de DBNBS (10 mM) com sistema fotolítico (complexo de cobalto (CoC) (4 mM) e DTPA (0,1 mM) em tampão fosfato (20 mM), pH 7,0) por 60 s a temperatura ambiente. Os controles: luz mais DBNBS (primeiro espectro), luz mais DBNBS mais beta cristalino (segundo espectro) e beta cristalino mais complexo de cobalto (terceiro espectro) foram corridos em paralelo. As incubações e análises foram realizadas como descrito em procedimentos experimentais. Condições experimentais: Potência de micro-ondas de 20 mW, constante de tempo de 327,7 ms, tempo de varredura 335,5 s, amplitude de modulação 1 G, ganho de 6,32 x 10<sup>5</sup> para todos os espectros exceto para o primeiro espectro no qual o ganho foi de 6,32 x 10<sup>4</sup>.

Deve-se notar que a beta cristalino, é um complexo protéico contendo cadeias polipeptídicas básicas (B1, B2 e B3) e cadeias ácidas (A1, A2, A3 e A4) (Wilmarth et al., 2006). Sua irradiação com o sistema gerador de radical carbonato levou a uma diminuição da banda principal da proteína nativa, a qual sendo um complexo de múltiplas cadeias similares, aparece como bandas dispersas na região de 25 kDa do gel. Paralelamente, ocorreu a formação de um hipotético dímero (na região de 50 kDa) e, em maior extensão, de agregados que não entram no gel de resolução (região > 100 kDa) e de agregados ainda maiores que não entram no gel de empilhamento (Fig. 14A). Análise de densitometria da banda a 50 kDa, mostrou que o nível do hipotético dímero aumenta com o tempo de irradiação até 60 s (Fig. 14B). Esses resultados indicam que o radical carbonato é capaz de oxidar a beta cristalino produzindo radicais da proteína, dímeros e agregados. Diferentemente da lisozima, a beta cristalino quando irradiada com luz UVC sem a presença de

complexo de cobalto gerou dímeros putativos em tempos curtos de irradiação. Isso é provavelmente devido à presença de maior conteúdo de resíduos aromáticos/mol na beta cristalino (Iqbal et al, 2014). O nível do dímero putativo aumenta com o tempo de irradiação até aproximadamente 2 min, decrescendo em tempos mais longos. Após 6 min de irradiação ocorre uma diminuição significativa das bandas referente aos monômeros (região de 25 kDa) e hipotéticos dímeros (região de 50 kDa) e um correspondente aumento da banda correspondente aos agregados da região > 100 kDa (Fig. 14C e D).



Figura 14. Oligomerização da beta cristalino promovida pelo radical carbonato e por luz UVC. (A) Análise de SDS-PAGE da beta cristalino (40  $\mu$ M) irradiada em tempos específicos em presença (A) ou não (C) de complexo de cobalto (4 mM) em tampão fosfato (20 mM), pH 7,0 contendo DTPA (0,1 mM). Alíquotas correspondentes a 30  $\mu$ g de proteína foram analisadas como descrito nos procedimentos experimentais. O gel foi corado com azul de Comassie. (B) O rendimento do dímero de beta cristalino em presença de radical carbonato (C) ou luz UVC (D) foi expresso como área relativa da banda de aproximadamente 50 kDa obtida como descrito em (A) ou (B) em 3 experimentos independentes; \*p < 0,05.

#### 4.2.2 Caracterização dos produtos de oxidação da beta cristalino

A análise dos principais produtos da oxidação da beta cristalino promovida por radical carbonato e UVC foi realizada por espectrometria de massas. As amostras foram separadas por SDS-PAGE conforme descrito na Fig. 14 e as bandas correspondentes ao monômero nativo e monômero oxidado (região de 25 kDa, 3 bandas), o hipotético dímero (aproximadamente 50 kDa, 8 bandas) e os agregados (região > 100 kDa, 8 bandas) foram cortadas do gel, digeridas e em seguida analisadas por nano-ESI-Q-TOF-MS/MS.

Como esperado, a comparação dos dados experimentais obtidos da digestão tríptica do monômero nativo e oxidado (25 kDa), dímero (50 kDa) e agregados (> 100 kDa) com os dados teóricos presentes em um banco de dados (SwissProt Database) identificou a presença da beta cristalino cadeias: B2, B3, A2, A3 e A4 com 80-92% dos peptídeos identificados. Os digestos do monômero nativo apresentou seus peptídeos não modificados e a digestão do monômero oxidado por radical carbonato e luz UVC apresentou uma mistura de peptídeos oxidados e não oxidados. O monômero oxidado por radical carbonato apresentou peptídeos trípticos contendo resíduos de Trp oxidados a hidroxi-triptofano (Trp<sup>59</sup> da cadeia B2 e Trp<sup>66</sup> da cadeia B3) e oxidados a *N*-formilguinurenina (Trp<sup>59</sup>, Trp<sup>82</sup> e Trp<sup>151</sup> da cadeia B2 e Trp<sup>198</sup> da cadeia A2) e um resíduo de Tyr (Tyr<sup>164</sup>, cadeia B2) oxidado a DOPA. (Tabela 5 e Apêndice B Figs. B1-4). Para as amostras irradiadas com luz UVC, o monômero oxidado apresentou peptídeos contendo Trp oxidados a Nformilquinurenina (Trp<sup>82</sup> e Trp<sup>151</sup> da cadeia B2, Trp<sup>198</sup> da cadeia A3) e a hidroxitriptofano (Trp<sup>158</sup> da cadeia B3) e um resíduo de Tyr oxidado a DOPA (Tyr<sup>161</sup> da cadeia B3) (Tabela 5).

59

**Tabela 5.** Caracterização por ESI-Q-TOF-MS/MS das modificações oxidativas promovida pelo radical carbonato e luz UVC no monômero da beta cristalino <sup>a</sup>

Cadeia	Peptídeos <sup>b</sup>	Massa teórica (M+H)	Monômero oxidado (UV/CoC)	Monômero oxidado (UV)	Aminoácidos modificados <sup>c</sup>	Íon score <sup>d</sup>
B2 (CRYBB2)						
. ,	<sup>49</sup> AGSVLVQAGPWVGYEQANCK GEQFVFEK <sup>76</sup>	3073,510	3073,510	-	W <sup>59</sup> +32 (NFK)	76
	<sup>49</sup> AGSVLVQAGPWVGYEQANCK GEQFVFEK <sup>76</sup>	3114,504	3114,504	-	W <sup>59</sup> +16 (OH)	127
	77GEYPRWDSWTSSR <sup>89</sup>	1658,730	1658,730	1658,730	W <sup>82</sup> +32 (NFK)	54
	146VQSGTWVGYQYPGYRGLQY LLEK <sup>168</sup>	2737,300	2737,300	2737,300	W <sup>151</sup> +32 (NFK)	26
	<sup>161</sup> GLQYLLEKGDYKDSGDFGAP QPQVQSVR <sup>188</sup>	3111,538	3111,538	-	Y <sup>164</sup> +16 (OH)	203
B3 (CRYBB3)						
, , , , , , , , , , , , , , , , , , ,	<sup>56</sup> VGSIQVESGPWLAFER <sup>71</sup>	1790,907	1790,907	-	W <sup>66</sup> +16 (OH)	1645
	<sup>153</sup> AINGTWVGYEFPGYR <sup>167</sup>	1761,318	-	1761,318	W <sup>158</sup> +16 (OH) e Y <sup>161</sup> +16 (OH)	82
A3 (CRYBA3)					ζ, ,	
. ,	<sup>197</sup> EWGSHATQSQIQSIR <sup>211</sup>	1759,846	1759,846	1759,846	W <sup>198</sup> +32 (NFK)	260
A2 (CRYBA2)						
- ·	<sup>78</sup> WSAWSGSAGHHSDQLLSFRP VLCANHSDSR <sup>107</sup>	3363,582	-	3363,568	(W <sup>78</sup> -W <sup>81</sup> )-2H	30

<sup>a</sup> Beta cristalino (40 μM) foi incubada ou não com o sistema fotolítico (complexo de cobalto (4 mM) e DTPA (0,1 mM) em tampão fosfato (20 mM), pH 7,0) e irradiada por 60 s com luz UVC de comprimento de onda de 254 nm. As amostras foram submetidas a análises de SDS-PAGE e as bandas correspondentes a beta cristalino monômero (aproximadamente 25 kDa) foram cortadas do gel, reduzidas, alquiladas, digeridas com tripsina, e submetidas a LC-MS/MS como descrito em procedimentos experimentais.

<sup>b</sup> Os resíduos de cisteína foram modificados a carbamidometil, exceto para o peptídeo com massa monoisotópica de 3073,510 no qual a cisteína estava reduzida.

° NFK refere-se a *N*-formilquinurenina.

<sup>d</sup> Íon score é -10 log (P) onde P é a probabilidade da marca observada ser um evento aleatório. Em média, íon score individual > 26 indica identidade ou extensa homologia (p < 0,05). Os valores mostrados são aqueles do monômero oxidado por radical carbonato; os valores referente a oxidação por luz UV são diferentes (como esperado) mas similares.

Além da oxidação de Trp a hidroxi-triptofano e *N*-formilquinurenina, foi possível detectar uma ligação cruzada intra-cadeia entre dois resíduos de Trp para as amostras irradiadas com luz UVC. Dentre os peptídeos identificados no monômero oxidado por luz UVC um peptídeo tríptico apresentou uma massa monoisotópica de 3362,582 (*m/z* 841,641) com quatro cargas. Essa massa monoisotópica corresponde a massa do peptídeo que se estende do resíduo 78-107 (cadeia A2) - 2 Da. A completa caracterização deste dímero foi realizada por análises de nano-ESI-Q-TOF-MS/MS (Fig. 15). O sequenciamento do peptídeo 78-107 apresentou a maioria dos fragmentos da série b e y. A fragmentação deste peptídeo mostrou uma diferença de - 1 Da a partir do fragmento b<sub>2</sub> (que contêm o resíduo de Trp<sup>78</sup>). O fragmento b<sub>4</sub> (que contêm o resíduo e no total uma diferença de - 2 Da se estendeu até o resíduo b<sub>30</sub>. Este comportamento também foi observado para os fragmentos y<sub>27</sub> e y<sub>30</sub> indicando que Trp<sup>78</sup> e Trp<sup>81</sup> podem formar uma ligação covalente intra-cadeia com perda de dois H (Fig. 15).



peptídeo Figura 15. Análise por nano-ESI-Q-TOF-MS/MS do tríptico (<sup>78</sup>WSAWSGSAGHHSDQLLSFRPVLCANHSDSR<sup>107</sup>) - 2H presente na cadeia A2 do monômero oxidado por luz UVC. Sequenciamento por análises de MS/MS do pico com m/z 841,641 o qual corresponde ao peptídeo (78WSAWSGSAGHHSDQLLSFRPVLCANHSDSR107) - 2H (massa monoisotópica de 3362,582 Da) com quatro cargas é mostrado. O inserto acima representa o espectro de MS do pico com quatro cargas e os fragmentos da série y e b. As amostras foram aplicadas em triplicata e as bandas (em aproximadamente 25 kDa) foram cortadas do gel, digeridas com tripsina e sujeitas a análises de nano-ESI-Q-TOF-MS/MS como descrito em procedimentos experimentais.

O provável dímero de beta cristalino formado por radical carbonato e luz UVC (região de 50 kDa) foi também caracterizado por nano-ESI-Q-TOF-MS/MS (Figs. 16 e 17). A análise comparativa dos peptídeos trípticos obtidos após a digestão do dímero formado por luz UVC (Fig. 16B) e do dímero e tetrâmero formados por radical carbonato (Fig. 16C e D, respectivamente) mostrou a presença de picos com *m/z* 1173,550 com três cargas que corresponde ao peptídeo dimérico  $(^{146}VQSGTWVGYQYPGYR^{160})_2 - 2$  Da com massa monoisotópica de 3517,655.



peptídeo nano-ESI-Q-TOF-MS Figura 16. Análises de do tríptico dimérico (146VQSGTWVGYQYPGYR<sup>160</sup>)<sub>2</sub> formado por radical carbonato e luz UVC. Espectros de MS do peptídeo tríptico correspondente ao resíduo 146-160 (presente na cadeia B2) com m/z 1173,55 com três cargas após digestão. (A) banda referente ao monômero nativo (25 kDa), (B) banda referente ao dímero (50 kDa) formado por luz UVC, (C) banda do dímero (50 kDa) e (D) dos agregados (>100 kDa) formados por radical carbonato. As amostras foram separadas por SDS-PAGE e 8 bandas foram cortadas do gel, digeridas com tripsina e submetidas à análise por ESI-Q-TOF-MS como descrito nos procedimentos experimentais.

O sequenciamento do pico com *m/z* 1173,55 foi realizado por análises de MS/MS e o espectro apresentado corresponde a fragmentação do dímero de beta cristalino formado por radical carbonato (região de 50 kDa) (Fig. 17). Estas análises confirmaram a presença de uma ligação cruzada Trp<sup>151</sup>-Trp<sup>151</sup>, o qual foi quebrada sob as condições de massa, produzindo fragmentos da série y e série b com massa intacta e fragmentos com perda de - 2 Da a partir do y<sub>10</sub> e b<sub>6</sub> (Tabela 6), comportamento similar ao observado para o dímero Lisozima-Trp<sup>28</sup>-Trp<sup>28</sup>-Lisozima (Paviani et al., 2015).



Figura 17. Análise por nano-ESI-Q-TOF-MS/MS do peptídeo dimérico (146VQSGTWVGYQYPGYR<sup>160</sup>)<sub>2</sub> obtido da cadeia B2 da beta cristalino tratada com o radical carbonato. O sequenciamento do pico com m/z 1173,55 foi realizado por análises de MS/MS, o qual corresponde ao peptídeo (146VQSGTWVGYQYPGYR160)2 com massa monoisotópica 3517,655 Da com 3 cargas. O inserto acima exibe os fragmentos do peptídeo com as séries y e b. O dímero de beta cristalino foi produzido sob as mesmas condições descritas na Fig. 14A. As amostras foram separadas por SDS-PAGE e 8 bandas (aproximadamente 50 kDa) foram cortadas do gel, digeridas com tripsina e sujeitas a análises por ESI-Q-TOF-MS/MS, como descrito nos procedimentos experimentais.

Fragmento				
Ур	Sequência	m/z	Sequência	m/z
<b>y</b> 1	R	175,11	R	175,11
<b>y</b> 2	YR	338,18	YR	338,18
Уз	GYR	395,20	GYR	395,20
<b>y</b> 4	PGYR	492,25	PGYR	492,25
<b>y</b> 5	YPGYR	655,31	YPGYR	655,31
<b>y</b> 6	QYPGYR	783,40	QYPGYR	783,40
<b>y</b> 7	YQYPGYR	946,44	YQYPGYR	946,44
<b>y</b> 8	GYQYPGYR	1003,46	GYQYPGYR	1003,46
Уэ	VGYQYPGYR	1102,53	VGYQYPGYR	1102,53
<b>y</b> 10	WVGYQYPGYR	1288,61	<b>W(-2H)</b> VGYQYPGYR	1286,61
<b>y</b> 11	TWVGYQYPGYR	1389,65	T <b>W(-2H)</b> VGYQYPGYR	1387,65
<b>y</b> 12	GTWVGYQYPGYR	1446,68	GT <b>W(-2H)</b> VGYQYPGYR	1444,68
<b>y</b> 13	SGTWVGYQYPGYR	1533,71	SGT <b>W(-2H)</b> VGYQYPGYR	1531,71
<b>y</b> 14	QSGTWVGYQYPGYR	1661,77	QSGT <b>W(-2H)</b> VGYQYPGYR	1659,77
<b>y</b> 15	VQSGTWVGYQYPGYR	1760,83	VQSGT <b>W(-2H)</b> VGYQYPGYR	1758,83
		880,92 <sup>c</sup>		879,93

**Tabela 6.** Fragmentos das series y obtidos após análises de MS/MS do peptídeo tríptico dimérico da beta cristalino (<sup>146</sup>VQSGTWVGYQYPGYR<sup>160</sup>)<sub>2</sub> <sup>a</sup>

<sup>a</sup> As condições experimentais de análise são as mesmas condições descritas na Fig. 17.
<sup>b</sup> As duas series y foram obtidas durante o sequenciamento do pico *m/z* 1173,55 por análises de MS/MS.

<sup>c</sup> Os resíduos correspondente ao peptídeo intacto e peptídeo - 2 Da são apresentados no espectro com uma carga (m/z 1760,83/1758,83) e com duas cargas (m/z 880,92/879,93).

# 4.2.3 Análise das modificações oxidativas da beta cristalino promovida por

### luz UVA e UVB

Após confirmar a produção de um dímero Trp-Trp na proteína beta cristalino em presença de luz UVC e radical carbonato nós avaliamos a possibilidade desta ligação covalente ser formada com luz UVA e UVB. Para isso as amostras foram irradiadas em um simulador solar equipado com luz UVA e UVB. Primeiramente foram avaliadas a dimerização e oligomerização da beta cristalino por análise de SDS-PAGE. Uma banda difusa na região de 50 kDa foi observada quando as amostras foram submetidas a irradiação com luz UVA/UVB (Fig. 18A). Uma sútil diminuição da banda do monômero foi observada com o aumento do tempo de irradiação, entretanto a presença de bandas de maior peso molecular não foi observada. Análise de densitometria da banda em 50 kDa mostra que sua intensidade aumentou com o tempo de irradiação. Todavia, em comparação ao controle, o aumento só foi significativo após 1 hora de irradiação (Fig. 18B).



**Figura 18. Dimerização da beta cristalino promovida por luz UVA/UVB.** (A) Análises de SDS-PAGE da beta cristalino (40  $\mu$ M) irradiada em tempos específicos em tampão fosfato (20 mM), pH 7,0 contendo DTPA (0,1 mM). Alíquotas correspondentes a 30  $\mu$ g de proteína foram analisadas como descrito em procedimentos experimentais. O gel foi corado com azul de Comassie. (B) O rendimento do dímero de beta cristalino foi expresso como área relativa da banda de aproximadamente 50 kDa obtida como descrito em (A) em 3 experimentos independentes; \*p < 0,05.

Análises de MS e MS/MS dos peptídeos obtidos após a digestão tríptica das proteínas presentes na banda do monômero nativo e oxidado identificaram a presença de beta cristalino cadeias: B2, B3, A2 e A3 com 70-89% dos peptídeos identificados. Dentre os peptídeos trípticos identificados na banda referente ao monômero oxidado por luz UVA/UVB foi observado a presença de peptídeos com resíduos de Trp oxidados a *N*-formilquinurenina (Trp<sup>82</sup>, cadeia B2 e Trp<sup>198</sup>, cadeia A3) (dados não apresentados).

A completa caracterização do dímero obtido foi realizada por espectrometria de massas após a digestão das proteínas presentes na região de 50 kDa. Um peptídeo tríptico de m/z 1135,540 com três cargas, correspondente ao peptídeo dimérico (<sup>145</sup>VSSGAWVAYQYPGYR<sup>159</sup>)<sub>2</sub> - 2 Da, com massa monoisotópica de 3403,598 foi identificado por análises de MS (Fig. 19A). O sequenciamento do pico com m/z 1135,540 confirma a presença de uma ligação covalente Trp<sup>150</sup>-Trp<sup>150</sup>

66

(cadeia A2). De fato, foram observados fragmentos da série y e série b com diferenças de menos 2 Da a partir de  $b_6$  e  $y_{10}$  (Fig. 19B, Tabela 7).



Figura 19. por nano-ESI-Q-TOF-MS/MS peptídeo dimérico Análise do (<sup>145</sup>VSSGAWVAYQYPGYR<sup>159</sup>)<sub>2</sub> obtido da cadeia A2 da beta cristalino irradiada com simulador solar. (A) Espectros de MS do peptídeo tríptico correspondente ao resíduo 145-159 (presente na cadeia A2) com m/z 1135,54 com três cargas após digestão. (B) Sequenciamento do pico com m/z1135,540 foi realizado por análises de MS/MS, o qual corresponde ao peptídeo (145VSSGAWVAYQYPGYR<sup>159</sup>)<sub>2</sub> com massa monoisotópica 3403,598 Da com 3 cargas. O inserto acima exibe os fragmentos do peptídeo com as séries y e b. O dímero de beta cristalino foi produzido sob as mesmas condições descritas na Fig. 18. As amostras foram separadas por SDS-PAGE e 8 bandas (aproximadamente 50 kDa) foram cortadas do gel, digeridas com tripsina e sujeitas a análises por nano-ESI-Q-TOF-MS/MS, como descrito nos procedimentos experimentais.

<u>(143</u> VSSGA	WVAYQYPGYR <sup>159</sup> )2 <sup>a</sup>			
Fragmento				
у <sup>ь</sup>	Sequência	m/z	Sequência	m/z
<b>y</b> 1	R	175,11	R	175,11
<b>y</b> 2	YR	338,18	YR	338,18
Уз	GYR	395,20	GYR	395,20
<b>y</b> 4	PGYR	492,25	PGYR	492,25
<b>y</b> 5	YPGYR	655,31	YPGYR	655,31
<b>y</b> 6	QYPGYR	783,40	QYPGYR	783,40
<b>y</b> 7	YQYPGYR	946,44	YQYPGYR	946,44
<b>y</b> 8	AYQYPGYR	1017,47	AYQYPGYR	1017,47
Уэ	VAYQYPGYR	1116,54	VAGYQYPGYR	1116,54
<b>y</b> 10	WVAYQYPGYR	1302,62	<b>W(-2H)</b> VAYQYPGYR	1300,62
<b>y</b> 11	AWVAYQYPGYR	1373,66	A <b>W(-2H)</b> VAYQYPGYR	1371,66
<b>y</b> 12	GAWVAYQYPGYR	1430,68	GA <b>W(-2H)</b> VAYQYPGYR	1428,68
<b>y</b> 13	SGAWVAYQYPGYR	1517,71	SGA <b>W(-2H)</b> VAYQYPGYR	1515,71
<b>y</b> 14	SSGAWVAYQYPGYR	1604,74	SSGA <b>W(-2H)</b> VAYQYPGYR	1602,74
<b>y</b> 15	VSSGAWVAYQYPGYR	1703,81	VSSGA <b>W(-2H)</b> VAYQYPGYR	1701,81
		852,41°		851,40

**Tabela 7.** Fragmentos das series y obtidos após análises de MS/MS do peptídeo tríptico do dímero da cadeia A2 da beta cristalino (145VSSGAWVAYQYPGYR<sup>159</sup>)2<sup>a</sup>

<sup>a</sup> As condições experimentais de análise são as mesmas condições descritas na Fig. 19.
<sup>b</sup> As duas series y foram obtidas durante o sequenciamento do pico *m/z* 1135,54 por análises de MS/MS.

<sup>c</sup> Os resíduos correspondente ao peptídeo intacto e peptídeo - 2 Da são apresentados no espectro com uma carga (m/z 1703,81/1701,81) e com duas cargas (m/z 852,41/851,40).

Em resumo, esses estudos realizados *in vitro* com a beta cristalino bovina confirmaram que ligações cruzadas ditriptofano são produtos de oxidação de proteínas promovidas tanto por luz UV (UVC e simulador solar) como pelo radical carbonato. Evidentemente, a extensão das modificações de proteínas por luz UV dependerá da intensidade da luz e da absorção de luz na região de 280 nm por cada proteína. A absortividade molar da beta cristalino (5,3 x 10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, média das seis cadeias polipeptídicas) e da lisozima (3,8 x 10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) explicam a maior susceptibilidade da primeira à luz UV. De fato, a irradiação da beta cristalino com luz UVC de 254 nm sem a presença de complexo de cobalto também levou à formação de um dímero em tempos curtos de irradiação, em contraste com a lisozima. A intensidade do dímero da beta cristalino diminuiu a tempos maiores do

que 6 min de irradiação enquanto aumentou a presença de oligômeros de alta massa molecular (Figs. 14 e 18). O dímero de beta cristalino formado em presença de radical carbonato foi caracterizado como  $\beta$ B2-Trp<sup>151</sup>-Trp<sup>151</sup>- $\beta$ B2 e foi identificado tanto nas bandas correspondentes ao dímero (50 kDa) como nas bandas correspondentes aos oligômeros de alta massa molecular (> 100 kDa). Além da presença do dímero inter-cadeias (envolvendo duas cadeias polipeptídicas distintas) também observamos que luz UVC promove a formação de dímeros de Trp intra-cadeia entre dois resíduos de Trp próximos ( $\beta$ A2-Trp<sup>78</sup>-Trp<sup>81</sup>). Para as amostras irradiadas com simulador o dímero ditriptofano foi identificado na cadeia A2 como ( $\beta$ A2-Trp<sup>150</sup>-Trp<sup>150</sup>- $\beta$ A2).



Figura 20. Representação esquemática dos dímeros covalentes da beta cristalino (cadeia B2 e cadeia A2) produzidos por radical carbonato e luz UVA e UVB. Devido à inexistência da estrutura tridimensional da cadeia A2 utilizamos a cadeia B2 como modelo.

#### 4.3 Experimentos com cristalino humano

## 4.3.1 Avaliação das proteínas presentes no cristalino de pacientes com catarata por eletroforese 1D e 2D

Os resultados descritos acima motivaram-nos a verificar se a ligação ditriptofano pode ocorrer *in vivo*. Para isso, decidimos analisar os produtos de oxidação de resíduos de triptofano em lentes de pacientes com catarata. Os resultados aqui descritos foram obtidos com poucas variações de quatro diferentes cristalinos e os resultados mostrados são representativos. Primeiramente, nós avaliamos o perfil das proteínas presentes no cristalino com catarata por eletroforese 1D sob condições redutoras. O homogenato contendo as proteínas foi separado em fração solúvel e fração insolúvel conforme descrito nos procedimentos experimentais e as frações examinadas por SDS-PAGE (15%). O extrato bruto (EB), a fração solúvel (S-1) obtida após a primeira centrifugação, fração solúvel (S-2) obtida após a segunda centrifugação e a fração contendo as proteínas insolúveis (P) apresentaram bandas extremamente difusas. Mesmo assim, são notórias várias bandas ao redor de 15-25 kDa e uma banda difusa ao redor de 40 kDa. As frações referentes ao extrato bruto (EB) e precipitado (P) apresentaram também agregados covalentes de alto peso molecular que não entraram no gel (Fig. 21).



Figura 21. Avaliação da oligomerização das proteínas presentes no cristalino de pacientes com catarata por SDS-PAGE. As proteínas presentes no cristalino com catarata foram homogeneizadas em tampão (Tris-HCI 20 mM, DTPA 0,1 mM, metionina 1 mM, triptofano 1 mM e coquetel com inibidores de protease, pH 7,4) e as frações correspondentes ao extrato bruto (EB), fração solúvel 1 (S-1), fração solúvel 2 (S-2) e precipitado contendo proteínas insolúveis (P) foram separadas em gel de SDS-PAGE 15%. Alíquotas correspondentes a 50 µg de proteína foram analisadas como descrito nos procedimentos experimentais. O gel foi corado com azul de Comassie.

As frações S-1 e S-2 agrupadas (proteínas solúveis) e a fração P (proteínas insolúveis) foram também examinadas por eletroforese bidimensional utilizando uma fita com gradiente de pH de 3-10. As proteínas solúveis presentes na fração S-1 e S-2 e as insolúveis presentes na fração P foram reduzidas, alquiladas e após diálise, a quantidade de proteínas foi estimada pelo método de Bradford. Cerca de 1 mg de proteína de cada fração foi aplicada por fita para separação das proteínas segundo seus pontos isoelétricos. Após a separação por ponto isoelétrico, as proteínas foram separadas de acordo com seu peso molecular utilizando gel redutor (SDS-PAGE 15%).


Figura 22. Análise das proteínas presentes em frações do cristalino de pacientes com catarata por eletroforese bidimensional. As proteínas foram extraídas conforme descrito na Fig. 21. (A) Fração contendo proteínas solúveis (S-1 e S-2) e (B) Fração contendo proteínas insolúveis (P). Cerca de 1 mg foi aplicado por fita. Para a segunda dimensão, as proteínas foram separadas por SDS-PAGE (15%). Os géis foram corados com azul de Comassie.

O gel 2D das proteínas presentes na fração solúvel (Fig. 22A) apresentou um número de bandas na faixa de peso molecular de 15-25 kDa consideravelmente maior do que àquele da fração insolúvel (Fig. 22B). Esta, mostrou em paralelo, um aumento de bandas difusas e de agregados de alto peso molecular que praticamente não entraram no gel (Fig. 22B). Nas duas frações foi observada uma banda relativamente fraca e dispersa na região de 50 kDa. As proteínas presentes nas diferentes bandas do gel 1 D e gel 2 D foram digeridas com tripsina e analisadas por espectrometria de massas para sua identificação.

## 4.3.2 Análise das proteínas presentes nas frações do cristalino com catarata após separação por eletroforese bidimensional

As bandas das frações solúvel e insolúvel correspondentes à da região de 15-25 kDa foram cortadas dos géis 2D (Fig. 22), digeridas com tripsina e os peptídeos trípticos analisados por nano-LC acoplado a espectrometria de massas.

As proteínas foram identificadas por comparação dos dados experimentais com os dados teóricos presentes em um banco de dados (SwissProt Database).

A maioria das bandas presentes no gel foram identificadas com cobertura de 50% ou mais das sequências (Tabela 8). Na fração solúvel, as principais proteínas identificadas foram: beta cristalino (cadeia B1, B2, A3 e A4), alfa cristalino (cadeia A e B) e gama cristalino (cadeia S, C e D). Um grande número de resíduos de metionina foi oxidado a metionina sulfóxido. A deamidação de resíduos de glutamina e asparagina também foi observada para a maioria das cadeias peptídicas identificadas. A cadeia B1 foi também identificada em pl mais ácido (pl = 6,6), indicando extensiva deaminação (Fig. 22A e B) (Hains e Truscott, 2007; Lampi et al., 2014). Na fração insolúvel não foi possível identificar a presença de alfa cristalino (cadeia S) nas bandas da região de 15-25 kDa.

Banda	Proteína	Score da	% de cobertura	Peptídeos marcados/Peptídeos	PM/pl ⁰	Aminoácidos modificados <sup>d</sup>
	identificada	proteína	da sequência	com íons score significativo <sup>b</sup>		
1	β <b>B1</b>	1783	72	105/75	28/8,6	M <sup>113,126,137</sup> e N <sup>58,68,82,158</sup>
2	β <b>B1</b>	1151	67	81/46	28/8,6	M <sup>113,137,226</sup> e N <sup>58,68</sup>
3	β <b>B1</b>	1253	63	64/45	28/8,6	M <sup>113,137</sup> , N <sup>58,82,158</sup> e Q <sup>68,197</sup>
4	β <b>B1</b>	1600	63	49/39	28/8,6	M <sup>113,137</sup> , N <sup>82,158</sup> e Q <sup>68</sup>
5	β <b>B1</b>	1552	67	91/66	28/8,6	M <sup>113,137,226</sup> , N <sup>82,125</sup>
6	β <b>B1</b>	1159	57	77/62	28/8,6	M <sup>113,137,144,226</sup> , N <sup>58,82,125,158</sup> e Q <sup>70,197</sup>
7	, β <b>B</b> 2	994	58	76/58	21/6,6	M <sup>122</sup> ,N <sup>116</sup> e Q <sup>8,13,185</sup>
8	β <b>B1</b>	524	63	57/39	28/8,6	M <sup>113,137,226</sup> , N <sup>58,82</sup> , Q <sup>70,197,225</sup> e S <sup>77</sup>
9	β <b>A3</b>	1681	54	58/48	25/5,8	M <sup>46,111,126</sup> , N <sup>103,208,62</sup> e Q <sup>42</sup>
10	β <b>A3</b>	1359	57	70/65	25/5,8	M <sup>46,62,126</sup> , N <sup>40,103,133</sup> e Q <sup>42,164,205,208</sup>
11	γS	912	56	80/45	21/6,4	M <sup>74</sup> e Q <sup>93,171</sup>
12	βA3	819	56	62/49	25/5,8	M <sup>46,126</sup> ,N <sup>62,103</sup> e Q <sup>38,206</sup>
13	, β <b>Α3</b>	314	41	33/21	25/5,8	M <sup>46,126</sup> e Q <sup>42</sup>
14	, β <b>A</b> 4	359	44	39/30	22/5,8	M <sup>14</sup> , N <sup>83,101</sup> e Q <sup>23,189</sup>
15	γS	767	55	46/38	21/6,4	N <sup>77</sup> e Q <sup>17,93,149,171</sup>
16	άB	354	56	40/25	20/6,7	M <sup>1,68</sup>
17	αΒ	450	56	46/36	20/6,7	M <sup>1,68</sup>
18	αΒ	240	40	44/36	20/6,7	M <sup>1,68</sup> e Q <sup>151</sup>
19	αΑ	1841	58	85/69	20/5,7	M <sup>1</sup> , N <sup>99</sup> e Q <sup>6,147</sup>
20	β <b>A4</b>	1440	63	83/69	22/5,8	M <sup>14</sup> , N <sup>83,114</sup> e Q <sup>23,189</sup>
21	, β <b>A</b> 4	1110	57	45/42	22/5,8	M <sup>14</sup> , N <sup>83,101,114</sup> e Q <sup>189</sup>
22	άA	586	61	43/35	20/5,7	M <sup>1</sup> e Q <sup>90</sup>
23	αΑ	777	45	76/65	20/5,7	M <sup>1</sup> , N <sup>101</sup> e Q <sup>6,145</sup>

Tabela 8. Identificação das proteínas presentes nas frações solúveis agrupadas (S) após separação por eletroforese bidimensional<sup>a</sup>

<sup>a</sup> As proteínas presentes nas frações solúveis agrupadas foram separadas por gel eletroforese bidimensional e as bandas na região de 15-25 kDa foram cortadas, digeridas com tripsina e analisadas por nano-ESI-Q-TOF-MS/MS.

<sup>b</sup> Peptídeos identificados em cada cadeia polipeptídica/peptídeos identificados com valor de P significativo (p < 0,05) o que indica extensa homologia.

° PM, peso molecular; pl, ponto isoelétrico.

<sup>d</sup> Resíduos de metionina foram oxidados a metionina sulfóxido e glutamina e asparagina foram deamidados e serina foi fosforilada.

Banda	Proteína	Score da	% de cobertura	Peptídeos marcados/Peptídeos	PM/pI °	Aminoácidos modificados d	
	identificada	proteína	da sequência	com íons score significativo <sup>b</sup>			
1	β <b>B1</b>	1610	57	114/75	28/8,6	M <sup>113,137,226</sup> e N <sup>58,82,158</sup> e Q <sup>70,197,205</sup>	
2	β <b>B1</b>	1149	67	104/60	28/8,6	M <sup>113,137</sup> e N <sup>58,68,82,123,158</sup> e Q <sup>197,205,236</sup>	
3	β <b>B1</b>	1772	68	116/80	28/8,6	M <sup>113,137,144</sup> , N <sup>58,82,125,158</sup> e Q <sup>70,106,125,197,236</sup>	
4	β <b>A3</b>	309	50	18/15	25/5,8	N <sup>103</sup> e Q <sup>38,206</sup>	
5	β <b>B1</b>	975	68	107/55	28/8,6	M <sup>113,137,226</sup> , N <sup>82,125</sup>	
6	β <b>A3</b>	110	67	79/50	25/5,8	M <sup>46</sup> ,N <sup>103,133</sup> e Q <sup>38,172,203</sup>	
7	β <b>A3</b>	967	55	49/39	25/5,8	M <sup>46</sup> ,N <sup>54,103,133,203</sup> e Q <sup>172,180</sup>	
8	β <b>A3</b>	903	55	49/35	25/5,8	M <sup>46</sup> , N <sup>40,54,103,133</sup> e Q <sup>42,164,203</sup>	
9	β <b>A3</b>	724	52	47/30	25/5,8	M <sup>46,126</sup> , N <sup>134</sup> e Q <sup>42,164,180</sup>	
10	β <b>A3</b>	637	55	41/30	25/5,8	M <sup>26,126</sup> , N <sup>40,54,62,133,140</sup> e Q <sup>38,164,203,208</sup>	
11	β <b>A</b> 4	309	50	12/11	22/5,8	M <sup>14</sup> ,N <sup>101,114</sup> e Q <sup>111</sup>	
12	β <b>A3</b>	207	56	25/18	22/5,8	M <sup>14</sup> e N <sup>101</sup>	
13	γC	417	48	25/20	21/7,0	M <sup>80</sup> e Q <sup>84</sup>	
14	γD	297	50	28/20	21/7,2	M <sup>147</sup> e Q <sup>161</sup>	

Tabela 9. Identificação das proteínas presentes na fração insolúvel (P) após separação por eletroforese bidimensional a

<sup>a</sup> As proteínas presentes na fração insolúvel foram separadas por gel eletroforese bidimensional e as bandas da região de 15-25 kDa foram cortadas, digeridas com tripsina e analisadas por nano-ESI-Q-TOF-MS/MS.

<sup>b</sup> Peptídeos identificados em cada cadeia polipeptídica/peptídeos identificados com valor de P significativo (p < 0,05) o que indica extensa homologia.

° PM: peso molecular , pl: ponto isoelétrico.

<sup>d</sup> Resíduos de metionina foram oxidados a metionina sulfóxido e glutamina e asparagina foram deamidados.

# 4.3.3 Caracterização dos produtos de oxidação de resíduos de Trp nas frações do cristalino com catarata

Para as análises das modificações oxidativas de resíduos de Trp as proteínas extraídas dos tecidos com catarata foram analisadas por SDS-PAGE 1D. As bandas com peso molecular na região do monômero (entre 15-25 kDa, 3 bandas) e dímeros (a aproximadamente 50 kDa, 8 bandas) foram digeridas com tripsina e analisadas por nano-ESI-Q-TOF-MS/MS.

A análise das proteínas presentes nas frações solúvel e insolúvel das bandas centradas na região de 15-25 kDa revelou um perfil proteômico semelhante ao do gel 2 D. As principais cadeias polipeptídicas identificadas foram: cadeias B1, B2, A3 e A4 da beta cristalino, cadeia A da alfa cristalino e cadeias C e S da gama cristalino. Cerca de 80-90% dos peptídeos dessas cadeias foram identificados e sequenciados. Os peptídeos trípticos apresentaram uma mistura de peptídeos modificados e não modificados. Além da oxidação de resíduos de metionina foi também observado um alto conteúdo de resíduos de triptofano oxidados. Na fração solúvel, os peptídeos trípticos apresentaram resíduos de Trp oxidados a Nformilquinurenina (Trp<sup>101</sup>, Trp<sup>127</sup> da cadeia B1, Trp<sup>198</sup> da cadeia A3 e Trp<sup>163</sup> da cadeia gama S). Na fração contendo proteínas insolúveis, a guantidade de resíduos e Trp oxidados foi ainda maior. Observaram-se resíduos de Trp oxidados a quinurenina (Trp<sup>127</sup>, Trp<sup>193</sup> e Trp<sup>237</sup> da cadeia B1) e resíduos de Trp oxidados a Nformilquinurenina (Trp<sup>101</sup>, Trp<sup>127</sup>, Trp<sup>175</sup> Trp<sup>193</sup> e Trp<sup>237</sup> da cadeia B1, Trp<sup>99</sup>, Trp<sup>168</sup> e Trp<sup>198</sup> da cadeia A3, Trp<sup>54</sup> da cadeia A4 e Trp<sup>136</sup> e Trp<sup>163</sup> da cadeia gama S) (Apêndice C Figs. C1-7 e Tabela 10).

**Tabela 10.** Caracterização das modificações oxidativas de resíduos de Trp presentes nas proteínas das frações solúvel e insolúvel na região de 15-25 kDa do cristalino com catarata por ESI-Q-TOF-MS/MS<sup>a</sup>

Cadeia	Peptídeos <sup>b</sup>	Massa teórica	Monômero	Monômero	Aminoácidos	Íon score d
		(M+H)	solúvel (S1-S2)	insolúvel (P)	modificados <sup>c</sup>	
B1 (CRYBB1)						
	93SIIVSAGPWVAFEQSNFR110	2040,020	2040,020	-	W <sup>101</sup> +32 (NFK)	35
	<sup>124</sup> WNTWSSSYR <sup>132</sup>	1190,531	-	1190,531	W <sup>127</sup> +4 (Kyn)	597
	124WNTWSSSYR132	1218,526	1218,526	1218,526	W <sup>127</sup> +32 (NFK)	127
	<sup>161</sup> GNTIEIQGDDAPSLWVYGFS	2472,138	-	2472,138	W <sup>175</sup> +32 (NFK)	5248
	DR <sup>182</sup>					
	188VSSGTWVGYQYPGYR <sup>202</sup>	1723,816	-	1723,816	W <sup>193</sup> +4 (Kyn)	4160
	188VSSGTWVGYQYPGYR <sup>202</sup>	1751,810	-	1751,810	W <sup>193</sup> +32 (NFK)	4111
	<sup>236</sup> QWHLEGSFPVLATEPPK <sup>252</sup>	1939,996	-	1939,996	W <sup>237</sup> +4 (Kyn)	77
	<sup>236</sup> QWHLEGSFPVLATEPPK <sup>252</sup>	1968,003	-	1968,003	W <sup>237</sup> +32 (NFK)	522
A3 (CRYBA3)						
	<sup>96</sup> WDAWSGSNAYHIER <sup>109</sup>	1723.762	-	1723.762	W <sup>99</sup> +32 (NFK)	4109
	<sup>163</sup> IQSGAWVCYQYPGYR <sup>177</sup>	1879.847		1879.847	W <sup>168</sup> +32 (NFK)	211
	<sup>197</sup> EWGSHATQSQIQSIR <sup>211</sup>	1759.852	1759.852	1759.852	W <sup>198</sup> +32 (NFK)	1049
A4 (CRYBA4)		,				
	<sup>49</sup> VLSGAWVGFEHAGFQGQQYI	2624,299	-	2624,299	W <sup>54</sup> +32 (NFK)	1643
	LER <sup>71</sup>					
Gama S (CRYGB)						
	<sup>132</sup> VLEGVWIFYELPNYR <sup>146</sup>	1929,978	-	1929,978	W <sup>136</sup> +32 (NFK)	2182
	<sup>159</sup> KPIDWGAASPAVQSFR <sup>174</sup>	1761,899	1761,899	-	W <sup>163</sup> +32 (NFK)	7600

<sup>a</sup> As proteínas presentes no cristalino com catarata foram separadas em fração solúvel e insolúvel e as bandas na região de 15-25 kDa foram cortadas do gel, reduzidas, alquiladas, digeridas com tripsina, e submetidas a LC-MS e MS/MS como descrito nos procedimentos experimentais.

<sup>b</sup> Os resíduos de cisteína foram modificados a carbamidometil.

<sup>c</sup>NFK refere-se a *N*-formilquinurenina e Kyn refere-se a quinurenina.

<sup>d</sup> Íon score é -10 log (P) onde P é a probabilidade da marca observada ser um evento aleatório. Em média, íon score individual > 33 indica identidade ou extensa homologia (p < 0,05). Os valores mostrados são aqueles do monômero insolúvel; os valores referentes ao monômero solúvel são diferentes (como esperado) mas similares.

O hipotético dímero encontrado nas frações solúvel e insolúvel também foi caracterizado por nano-ESI-Q-TOF-MS/MS. Para estas análises as proteínas extraídas do cristalino com catarata foram separadas por SDS-PAGE 1 D e as bandas na região de 40-50 kDa (total de 8 bandas) foram cortadas do gel, digeridas com tripsina e os peptídeos trípticos extraídos analisados por espectrometria de massas. Primeiramente foi realizada a identificação das proteínas presentes na banda referente ao dímero por comparação dos dados experimentais com os dados teóricos do banco (SwissProt Database). Tal análise identificou: cadeias B1, B2, A3 e A4 da beta cristalino, cadeias A e B da alfa cristalino e cadeias C, D e S da gama cristalino. Todas as cadeias tiveram cerca de 50-80% de seus peptídeos identificados e sequenciados (Tabela 11). Como esperado, os digestos trípticos das bandas referentes ao dímero apresentaram a maioria de seus resíduos de metionina oxidados, mas não detectamos com íon score significativo (P < 0,05) presença de quinurenina ou *N*-formilquinurenina (dados não mostrados).

**Tabela 11.** Análise das proteínas presentes nas bandas referentes ao hipotético dímero região de 50 kDa das frações solúvel e insolúvel do cristalino com catarata por nano-ESI-Q-TOF-MS/MS.

	·		Parâmetros Mascot				
Amostra <sup>a</sup>	Proteína	PM (kDa)/ pl <sup>b</sup>	Peptídeos marcados/Peptídeos com íon score significativo <sup>c</sup>	% Cobertura	Score da proteína		
Dímero Fração solúvel (S-1 e S-2)							
	Beta cristalino (B1)	28/ 8,59	95/80	63	2871		
	Beta cristalino (A3)	25/ 5,81	54/48	80	1791		
	Beta cristalino (S)	21/ 6,44	62/54	79	1611		
	Beta cristalino (A4)	22/ 6,4	28/26	48	1507		
	Alfa cristalino (B)	20,1/ 6,9	43/39	61	1455		
	Alfa cristalino (A)	20/ 5,8	24/18	61	1269		
	Gama cristalino (C)	21/7,7	36/35	61	1003		
	Gama cristalino (D)	21/7,8	24/18	51	889		
Dímero Fração insolúvel (P)							
3	Beta cristalino (B1)	28/ 8,59	78/69	80	2778		
	Beta cristalino (A3)	25/ 5,81	55/49	78	2043		
	Alfa cristalino (A)	20/ 5,77	48/46	60	1795		
	Alfa cristalino (B)	20,1/ 6,9	43/40	62	1662		
	Beta cristalino (B2)	23,5/6,6	52/47	70	1321		
	Beta cristalino (A4)	22/ 5,83	23/21	80	878		
	Beta cristalino (S)	21/ 6,44	21/21	55	679		

<sup>a</sup> As proteínas presentes nas frações solúvel e insolúvel foram separadas por gel SDS-PAGE e as bandas na região de 50 kDa (8 bandas) foram cortadas, digeridas e analisadas por nano-ESI-Q-TOF-MS/MS.

<sup>b</sup> PM, peso molecular; pl, ponto isoelétrico.

<sup>c</sup> Peptídeos identificados com valor de P significativo (p < 0,05), indicando extensa homologia.

<sup>d</sup> Íon score de cada peptídeo é -10 log (P) onde P é a probabilidade da marca observada ser um evento aleatório. Em média, íon score individual > do que o apresentado indica identidade ou extensa homologia (p < 0,05).

Todavia, a análise dos peptídeos trípticos obtidos após a digestão das proteínas presentes na região de 50 kDa das frações solúvel e insolúvel mostrou a presença de um pico com *m/z* 593,278 com quatro cargas que corresponde ao peptídeo dimérico (<sup>124</sup>WNTWSSSYR<sup>132</sup>)<sub>2</sub> - 2 Da com massa monoisotópica de 2369,070, presente na cadeia B1 (Fig. 23). Como mostrado na Fig. 23, o peptídeo dimérico não foi detectado na região dos monômeros das frações correspondentes (15-25 kDa).



**Figura 23.** Análises do peptídeo tríptico dimérico (<sup>124</sup>WNTWSSSYR<sup>132</sup>)<sub>2</sub> encontrado nas frações solúvel e insolúvel do cristalino com catarata por nano-ESI-Q-TOF-MS. Espectros de MS do peptídeo tríptico correspondente ao resíduo 124-132 (presente na cadeia B1) com *m*/*z* 593,278 com quatro cargas após digestão. (A) Análise da região correspondente ao monômero da fração solúvel (15-25 kDa), (B) Análise da região correspondente ao dímero da fração solúvel (50 kDa), (C) Análise da região correspondente ao monômero da fração insolúvel (15-25 kDa) e (D) Análise da banda correspondente ao dímero da fração insolúvel (50 kDa). As amostras foram separadas por SDS-PAGE 1D e 8 bandas foram cortadas do gel, digeridas com tripsina e sujeitas a análises por nano-ESI-Q-TOF-MS, como descrito nos procedimentos experimentais.

O sequenciamento do pico com *m/z* 593,278 foi realizado por análises de MS/MS e o espectro apresentado na Fig. 24 corresponde a fragmentação do dímero presente na fração solúvel (banda em aproximadamente 50 kDa). As análises confirmaram a presença de uma ligação cruzada Trp<sup>127</sup>-Trp<sup>127</sup> na cadeia B1. Tal

ligação cruzada também foi quebrada sob as condições de MS/MS, produzindo fragmentos da série y e série b com massa intacta e com massa de - 2 Da (Tabela 12 Fig. 24).



**Figura 24.** Análise do peptídeo dimérico (<sup>124</sup>WNTWSSSYR<sup>132</sup>)<sub>2</sub> encontrado na fração solúvel do cristalino com catarata por nano-ESI-Q-TOF-MS/MS. O sequenciamento do pico com *m*/z 593,278 foi realizado por análises de MS/MS, o qual corresponde ao peptídeo (<sup>124</sup>WNTWSSSYR<sup>132</sup>)<sub>2</sub> com massa monoisotópica 2369,070 Da com 4 cargas. O inserto acima exibe os fragmentos do peptídeo com as séries y e b. O dímero foi obtido sob as mesmas condições descritas na Fig. 21. As amostras foram separadas por SDS-PAGE 1D e 8 bandas do dímero presente na fração solúvel (em aproximadamente 40 kDa) foram cortadas do gel, digeridas com tripsina e submetidas a análises por nano-ESI-Q-TOF-MS/MS como descrito nos procedimentos experimentais.

Fragmento				
у	Sequência	m/z	Sequência	m/z
<b>y</b> 1	R	175,11	R	175,11
<b>y</b> 2	YR	338,18	YR	338,18
Уз	SYR	425,21	SYR	425,21
<b>y</b> 4	SSYR	512,24	SSYR	512,24
<b>y</b> 5	SSSYR	599,27	SSSYR	599,27
<b>y</b> 6	WSSSYR	785,35	W(-2H)SSSYR	783,35
<b>y</b> 7	TWSSSYR	886,40	T <b>W(-2H)</b> SSSYR	884,40
<b>y</b> 8	NT <b>W</b> SSSYR	1000,44	NT <b>W(-2H)</b> SSSYR	998,44
Уэ	WNT <b>W</b> SSSYR	1186,57	WNT <b>W(-2H)</b> SSSYR	1184,57

**Tabela 12.** Fragmentos das series y obtidos após análises de MS/MS do peptídeo tríptico do dímero da beta cristalino (<sup>124</sup>WNTWSSSYR<sup>132</sup>)<sub>2</sub> <sup>a</sup>

<sup>a</sup> As condições experimentais de análise são as mesmas condições descritas na Fig. 24. As duas series y foram obtidas durante o sequenciamento do pico *m/z* 593,27 por análise de MS/MS.

Além da presença de uma ligação cruzada envolvendo dois resíduos de Trp de cadeias B1 (Trp<sup>127</sup>-Trp<sup>127</sup>), também identificamos na fração solúvel (banda em aproximadamente 50 kDa) um íon de *m/z* 1146,205 com três cargas, correspondente ao peptídeo dimérico (<sup>188</sup>VSSGTWVGYQYPGYR<sup>202</sup>)<sub>2</sub> - 2 Da de massa monoisotópica 3435,602 Da (Fig. 25). A presença da ligação cruzada Trp<sup>193</sup>-Trp<sup>193</sup> nesse dímero foi obtida pela análise de MS/MS do pico de *m/z* 1146,205. A fragmentação apresentou picos das séries y e b com massa intacta e com massa de - 2H, mostrando novamente a instabilidade dessa ligação sob as condições de MS/MS (Fig. 26 e Tabela 13).



**Figura 25.** Análises do peptídeo tríptico dimérico (<sup>188</sup>VSSGTWVGYQYPGYR<sup>202</sup>)<sub>2</sub> encontrado nas frações solúvel e insolúvel do cristalino com catarata por nano-ESI-Q-TOF-MS. Espectros de MS do peptídeo tríptico correspondente ao resíduo 188-202 (presente na cadeia B1) com *m/z* 1146,205 com três cargas após digestão. (A) Análise da região correspondente ao monômero da fração solúvel (15-25 kDa), (B) Análise da região correspondente ao dímero da fração solúvel (50 kDa), (C) Análise da região correspondente ao monômero da fração insolúvel (15-25 kDa) e (D) Análise correspondente ao dímero da fração insolúvel (50 kDa). As amostras foram separadas por SDS-PAGE 1D e 8 bandas foram cortadas do gel, digeridas com tripsina e submetidas a análise por nano-ESI-Q-TOF-MS como descrito nos procedimentos experimentais.



**Figura 26.** Análise do peptídeo dimérico (<sup>188</sup>VSSGTWVGYQYPGYR<sup>202</sup>)<sub>2</sub> encontrado na fração solúvel do cristalino com catarata por nano-ESI-Q-TOF-MS/MS. O sequenciamento do pico com *m*/*z* 1146,205, o qual corresponde ao peptídeo (<sup>188</sup>VSSGTWVGYQYPGYR<sup>202</sup>)<sub>2</sub> com massa monoisotópica 3435,602 Da com 3 cargas. O inserto acima exibe os fragmentos do peptídeo com as séries y e b. O dímero foi obtido sob as mesmas condições descritas na Fig. 21. As amostras foram separadas por SDS-PAGE 1D e 8 bandas (aproximadamente 40 kDa) foram cortadas do gel, digeridas com tripsina e sujeitas a análises por nano-ESI-Q-TOF-MS/MS, como descrito nos procedimentos experimentais.

Fragmento								
у	Sequência	m/z	Sequência	m/z				
<b>y</b> 1	R	175,11	R	175,11				
<b>y</b> 2	YR	338,18	YR	338,18				
Уз	GYR	395,20	GYR	395,20				
<b>y</b> 4	PGYR	492,25	PGYR	492,25				
<b>y</b> 5	YPGYR	655,31	YPGYR	655,31				
<b>y</b> 6	QYPGYR	783,40	QYPGYR	783,40				
<b>y</b> 7	YQYPGYR	946,44	YQYPGYR	946,44				
<b>y</b> 8	GYQYPGYR	1003,46	GYQYPGYR	1003,46				
<b>y</b> 9	VGYQYPGYR	1102,53	VGYQYPGYR	1102,53				
<b>y</b> 10	WVGYQYPGYR	1288,61	<b>W(-2H)</b> VGYQYPGYR	1286,61				
<b>y</b> 11	T <b>W</b> VGYQYPGYR	1389,65	T <b>W(-2H)</b> VGYQYPGYR	1387,65				
<b>y</b> 12	GT <b>W</b> VGYQYPGYR	1446,68	GT <b>W(-2H)</b> VGYQYPGYR	1444,68				
<b>y</b> 13	SGT <b>W</b> VGYQYPGYR	1533,71	SGT <b>W(-2H)</b> VGYQYPGYR	1531,71				
<b>y</b> 14	SSGT <b>W</b> VGYQYPGYR	1620,74	SSGT <b>W(-2H)</b> VGYQYPGYR	1619,74				
<b>y</b> 15	VSSGT <b>W</b> VGYQYPGYR	1719,81	VSSGT <b>W(-2H)</b> VGYQYPGYR	1717,81				
		860,40 <sup>b</sup>		859,40				

**Tabela 13.** Fragmentos das series y obtidos após análises de MS/MS do peptídeo <u>tríptico do dímero da beta cristalino (188</u>VSSGTWVGYQYPGYR<sup>202</sup>)<sub>2</sub><sup>a</sup>

<sup>a</sup> As condições experimentais de análise são as mesmas condições descritas na Fig. 26. As duas series y foram obtidas durante o sequenciamento do pico m/z 1146,205 por análises de MS/MS. <sup>b</sup> Os resíduos correspondente ao peptídeo intacto e peptídeo - 2 Da são apresentados no espectro com uma carga (m/z 1719,81/1717,81) e com duas cargas (m/z 860,40/859,40).

Estes resultados iniciais obtidos com o cristalino de pacientes idosos (63-75 anos) submetidos à cirurgia de remoção de catarata nuclear confirmaram extensiva oxidação de resíduos de metionina e triptofano (Hains et al., 2007) e extensiva deamidação das proteínas do cristalino (Wilmarth et al., 2006). Também, nossos dados mostraram pela primeira vez a presença da ligação ditriptofano nos extratos protêicos das cataratas.



Figura 27. Principais modificações encontradas no cristalino com catarata.

#### 5 DISCUSSÃO

Este trabalho contribuiu para elucidar a natureza molecular e possíveis consequências biológicas de oxidações de resíduos de triptofano em proteínas como proposto. De fato, a maioria das oxidações descritas na literatura para resíduos de Trp envolve a formação de derivados do aminoácido, como os produtos da quebra do anel indólico, quinurenina e *N*-formilquinurenina, e de derivados hidroxilados e/ou nitrados (revisão em Ehrenshaft et al., 2015). Todavia, demonstramos aqui que a recombinação de radicais proteína-Trp• para formar a ligação cruzada ditriptofano ocorre pela ação do radical carbonato ou da luz UV sobre proteínas e pode, eventualmente, participar de processos patogênicos.

Previamente, a formação de dímeros protêicos unidos pela ligação ditriptofano só fora demonstrada durante a atividade peroxidásica da hSOD1 dependente de bicarbonato (hSOD1-Trp<sup>32</sup>-Trp<sup>32</sup>-hSOD1) (Medinas et al., 2010). Esse poderia ser um caso específico, à medida que o radical carbonato é formado pela própria enzima, a qual, no caso da enzima humana, não possui resíduos de Tyr e possui um único resíduo de Trp, o Trp<sup>32</sup> exposto ao solvente. Os dados aqui relatados mostram que a formação de dímeros protêicos ligados por ditriptofano pode ter ocorrência mais geral.

De fato, demonstramos que o radical carbonato gerado fotoliticamente ou enzimaticamente promove a formação de dímeros e heterodímeros de lisozima, respectivamente, os quais foram caracterizados como lisozima-Trp<sup>28</sup>-Trp<sup>28</sup>-lisozima (Fig. 9, Tabela 2) e lisozima-Trp<sup>28</sup>-Trp<sup>32</sup>-hSOD1 por nano-ESI-Q-TOF-MS/MS (Fig. 10, Tabelas 3 e 4). Também demonstramos que a beta cristalino tratada com o radical carbonato gerado fotoliticamente forma um dímero βB2-Trp<sup>151</sup>-Trp<sup>151</sup>-βB2, o

qual foi caracterizado tanto na região referente ao dímero hipotético (região de 50 kDa) como na região de oligômeros de alta massa molecular (região > 100 kDa) (Fig. 16-17, Tabela 6). Por outro lado, a lisozima tratada com luz UVC foi dimerizada a lisozima-Trp<sup>28</sup>-Trp<sup>28</sup>-lisozima (Fig. 11) e a beta cristalino tratada com luz UVC produziu o dímero βB2-Trp<sup>151</sup>-Trp<sup>151</sup>-βB2, que foi caracterizado na região referente ao dímero hipotético (região de 50 kDa) (Figs. 16A). A beta cristalino tratada com um simulador de luz solar (UVB e UVA) também formou o dímero caracterizado como βA2-Trp<sup>150</sup>-Trp<sup>150</sup>-βA2 (Fig. 19).

Nossos resultados mostraram que, além dos dímeros protêicos caracterizados, outros produtos foram formados e identificados nos sistemas estudados. Todavia, a maioria deles já fora caracterizada anteriormente (ver, por exemplo, Ehrenshaft et al., 2015; Plowman et al., 2013; Pattison et al., 2012). Por isso, começaremos discutindo as possíveis razões pelas quais a dimerização protêica por meio de uma ligação cruzada de ditriptofano tem recebido limitada atenção na literatura.

Uma das razões é possivelmente a reação de radicais proteína-Trp• com oxigênio molecular para produzir radicais peroxila e seus produtos (Fig. 1). Todavia, a reação de radicais triptofanila com oxigênio não é particularmente rápida (k  $\leq$  5 x 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) (Candeias et al., 1997), enquanto a velocidade da reação de recombinação de radicais triptofanila está próxima do controle pela difusão (k ~ 5 × 10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>) (Candeias et al., 1997). De fato, o rendimento do dímero de lisozima aumentou com a redução do nível de oxigênio molecular no tampão (Figs. 7C e 7D). Essa observação apenas confirma nossa proposta anterior de que o radical triptofanila decai preferencialmente por dois processos competitivos: reação com oxigênio molecular e recombinação (Medinas et al., 2010) (Fig. 1). Apesar de

realizarmos a maioria de nossos experimentos sob tensões atmosféricas de oxigênio, todos os dímeros aqui detectados foram produzidos em quantidades consideráveis. Essas quantidades serão provavelmente maiores sob as baixas concentrações de oxigênio presentes na maioria dos ambientes fisiológicos.

A pouca atenção recebida pela ligação de ditriptofano pode também ser atribuída ao fato de que as modificações oxidativas em proteínas são extensivamente estudadas por metodologias gerais e incapazes de revelar os resíduos modificados, como a detecção de carbonilação e nitração. Por exemplo, a oxidação da lisozima por agentes diversos como ozônio, ácido hipocloroso, peroxinitrito, radicais peroxila e fotosensibilizadores/luz foi extensivamente investigada, mas os resíduos oxidados foram raramente mapeados (Kuroda, 1975; Hawkins e Davies, 2005; Gracanin et al., 2009; Kerkaert et al., 2013). Da mesma forma, a dimerização de lisozima por ligação cruzada de triptofano durante o tratamento da enzima por riboflavina/luz (Silva et al., 1994) ou por radicais peroxila (Arenas et al; 2013) foi previamente proposta. Todavia, os resíduos envolvidos na dimerização e a estrutura do dímero não foram elucidados.

Deve ser notado que vários peptídeos ligados por ligação cruzada C2-C2 de dois resíduos de Trp já foram sintetizados químicamente e caracterizados (Stachel et al.,1996 e Dinh et al., 1999). Tais dímeros, entretanto, são altamente fluorescentes e não são produzidos por recombinação de radicais triptofanila. Em contraste, nós relatamos que radicais triptofanila derivados de peptídeos e proteínas se recombinam, produzindo dímeros fracamente fluorescentes que se quebram em grande extensão durante a fragmentação por MS/MS, produzindo resíduos de Trp não modificados e resíduos de Trp com perda de 2 átomos de hidrogênio (Medinas et al., 2010, Coelho et al., 2012 e Queiroz et al., 2013). Estas características são

compartilhadas pelos dímeros lisozima-Trp<sup>28</sup>-Trp<sup>28</sup>-lisozima e lisozima-Trp<sup>28</sup>-Trp<sup>32</sup>hSOD1, βB2-Trp<sup>151</sup>-Trp<sup>151</sup>-βB2 e βA2-Trp<sup>150</sup>-Trp<sup>150</sup>-βA2 aqui relatados (Figs. 9, 10, 17 e 19), indicando que eles também devem estar ligados por uma ligação C3-N1 entre dois resíduos de Trp, um de cada monômero (Fig.1). Evidentemente, a consistente quebra da ligação ditriptofano C3-N1 durante a fragmentação em condições de MS/MS também não deve ter favorecido seu reconhecimento em estudos anteriores.

Além disso, a ocorrência de recombinações radicalares pressupõe altos fluxos de radicais. Todavia, as condições patofisiológicas capazes de gerar altos fluxos de radicais protêicos específicos, como radicais proteína-Trp•, são limitadas. A alta reatividade do radical carbonato com o aminoácido Trp (k = 7,0 x 10<sup>8</sup>) em comparação a outros aminoácidos ( $k_{Tyr} = 4,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{Cys} = 4,6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{Phe} = 5,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) (Chen e Hoffman, 1973) e sua tendência de oxidar biomoléculas por um elétron e não se adicionar a elas formando adutos estáveis (Medinas et al., 2007) foram as razões para selecioná-lo como oxidante em nossos sistemas. Justamente por não formar adutos estáveis com biomoléculas, o radical carbonato não pode ser distinguido de outros oxidantes de um elétron, tornando trabalhoso comprovar a sua formação em sistemas biológicos mesmo *in vitro*.

Assim, um dos nossos objetivos era também avaliar se a formação da ligação cruzada ditriptofano poderia ser usada como um biomarcador do radical carbonato. Considerações teóricas e experimentos complementares (dados não mostrados) apoiavam essa hipótese.

Entre os oxidantes de um eléctron produzidos sob condições fisiológicas, o radical carbonato ( $E^{\circ}=1,78$  V) (Medinas et al., 2007) é um dos mais habilitados para atacar resíduos de triptofano em proteínas ( $E^{\circ'}=1,0$  V para Trp) (Butler et al., 1986),

90

produzindo radicais triptofanila em rendimentos suficientes para favorecer a recombinação. Radicais hidroxila ( $E^{\circ'} = 2,3 V$ ) e dióxido de nitrogênio ( $E^{\circ'} = 1,0 V$ ) oxidam, mas também se adicionam a proteínas, gerando produtos hidroxilados e nitrados (Santos et al., 2007 e Augusto et al., 2002). Radicais peroxila (Eº de aproximadamente 1,0 V) e alcoxila (Eº de aproximadamente 1,6 V) são fortes oxidantes que oxidam por reações de abstração de hidrogênio. Entretanto, eles também sofrem rápido rearranjos monomoleculares e fragmentações que competem com as reações de abstração de hidrogênio (Porter et al., 1981; Cheng et al., 2007; Augusto e Miyamoto, 2012). Por exemplo, a formação de um dímero de lisozima foi relatada para o tratamento da enzima com radicais peroxila gerados da termólise de 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) por 3 h (Arenas et al, 2013). O rendimento do dímero foi extremamente baixo e, repetindo o experimento relatado, praticamente não conseguimos detectá-lo, tornando impossível analisá-lo por espectrometria de massas (dados não mostrados). Os altos estados de oxidação das hemeproteínas (Composto I e Composto II) também têm alto potencial de redução, mas apenas o composto I oxida o Trp em velocidades substanciais (Jantschko et al., 2002). Como consequência, o ciclo peroxidásico destas enzimas é interrompido, produzindo baixos rendimentos de radical triptofanila e, consequentemente, de ligações cruzadas de ditriptofano. De fato, realizamos experimentos paralelos e, como previsto, a atividade da peroxidase de raiz forte levou à dimerização da Tyr (Pichorner et al., 1995) mas não do Trp (dados não mostrados).

O cenário muda em condições de exposição à luz UV. Previamente, foi relatado que a oxidação de peptídeos contendo resíduos de Trp por lasers de alta energia produz radicais peptideo-Trp<sup>•</sup> que se recombinam para produzir uma

ligação cruzada de ditriptofano que não foi caracterizada (Leo et al., 2013). Aqui, demonstramos que o tratamento da lisozima e da beta cristalino com luz UV leva à formação de radicais proteína-Trp<sup>•</sup> e, subsequentemente, de dímeros protêicos ligados por ligação ditriptofano que foi caracterizada. Portanto, confirmamos que a ligação ditriptofano é também produzida por irradiação de proteínas com luz UV. Como a beta cristalino é uma proteína que possui várias cadeias polipeptídicas ( $\beta$ B1,  $\beta$ B2,  $\beta$ B3,  $\beta$ A1,  $\beta$ A2,  $\beta$ A3 e  $\beta$ A4) com alto conteúdo de resíduos de Trp (cerca de 5-9 resíduos por cadeia), ela foi mais suscetível à dimerização por luz UV do que a lizozima (monômero com 6 Trp).

Neste ponto, podemos concluir que a detecção de ligações cruzadas de triptofano em células e tecidos não expostos à luz pode revelar a produção de radicais carbonato. Portanto, nosso estudo abre a possibilidade de explorar a formação de ligações cruzadas de ditriptofano como um biomarcador do radical carbonato. Ao confirmar que esse oxidante é propenso a promover ligações cruzadas de biomoléculas (Crean et al., 2008; Medinas et al., 2010; Queiroz et al., 2013; Coelho et al, 2014 e lqbal et al., 2014), as quais são lesões resistentes ao reparo celular, nosso estudo também suporta um papel para o radical carbonato em mecanismos patogênicos associados à condições oxidativas.

Outro aspecto a discutir é a localização dos resíduos oxidados a produtos estáveis nas proteínas durante os tratamentos executados. Essa é uma questão complexa porque a transferência de elétrons entre diferentes resíduos de aminoácidos é um processo comum em proteínas (Prütz et al., 1980; Butler et al., 1986; Stuart-Audette et al., 2003; Zhang et al., 2005 e Bhattacharjee et al., 2007). A discussão fica complexa mesmo para uma proteína monomérica como a lisozima e mais ainda para uma proteína constituída por diferentes cadeias polipeptídicas

como a beta cristalino. Restringindo a discussão à lisozima, foi uma surpresa detectar e caracterizar apenas produtos de oxidação de resíduos de Trp na proteína tratada (Tabela 1), à medida que ela contém 3 resíduos Tyr que poderiam ser oxidados a lisozima-Tyr<sup>•</sup> por lisozima-Trp<sup>•</sup> (Prütz et al., 1980 e Butler et al., 1986). De gualquer forma, dos resíduos de Trp oxidados no sistema fotolítico (Trp<sup>28</sup>, Trp<sup>62</sup> e Trp<sup>123</sup>), apenas o Trp<sup>62</sup> é altamente exposto ao solvente, como determinado por modificação química da lisozima (Strohalm et al., 2004). Dessa forma, é possível que o Trp<sup>62</sup> seja o primeiro resíduo atacado pelo radical carbonato, mas, subsequentemente, transfira o eléctron aos resíduos Trp<sup>28</sup> e Trp<sup>123</sup> produzindo os correspondentes radicais e seus produtos de decaimento. Alternativamente, o pequeno radical carbonato pode atacar o resíduo de Trp<sup>62</sup> exposto ao solvente e pode também se difundir através da proteína (Zhang et al, 2002 e Zhang et al, 2003), atacando o Trp<sup>28</sup> e o Trp<sup>123</sup>. No caso do sistema enzimático, o qual produz baixos rendimentos de radical carbonato e tem duas proteínas competindo por ele, apenas o Trp<sup>28</sup> foi encontrado oxidado a *N*-formilquinurenina e ao dímero lisozima-Trp<sup>28</sup>-Trp<sup>32</sup>-hSOD1 (Fig. 10, Tabela 4). O tratamento da lisozima apenas com luz UV por 10 min mostrou monômeros oxidados a hidroxi-triptofano (Trp28) e a Nformilguinurenina (Trp<sup>62</sup> and Trp<sup>123</sup>) e o mesmo dímero produzido pelo radical carbonato (lisozima-Trp<sup>28</sup>-Trp<sup>28</sup>) (Fig. 11). Portanto, os mesmos resíduos da lisozima foram oxidados pelo radical carbonato e pela luz UVC a produtos estáveis similares, inclusive ao mesmo dímero ligado pela ligação ditriptofano.

O caso da beta cristalino bovina é mais complexo não só pela estrutura da proteína mas também porque diferentes fontes de irradiação (UVC e simulador solar) foram utilizadas. Como já colocado ao final do item 4.2, notamos que o radical carbonato e a luz UVC oxidaram os mesmos resíduos de Trp e produziram o mesmo

dímero ( $\beta$ B2-Trp<sup>151</sup>-Trp<sup>151</sup>- $\beta$ B2) (Figs. 16 e 17; Tabela 6). Por razões a serem equacionadas, o único dímero ligado por ditriptofano caracterizado no caso do simulador solar ( $\beta$ A2-Trp<sup>150</sup>-Trp<sup>150</sup>- $\beta$ A2) (Fig. 19; Tabela 7) foi diferente daquele inter-molecular obtido com luz UVC ou radical carbonato.

Em resumo, ao comparar os resíduos oxidados a produtos estáveis nas proteínas aqui tratadas podemos concluir que o radical carbonato (oxidante forte) e luz UVC (alta energia) oxidam os mesmos resíduos de Trp. Um outro aspecto que chama atenção é o fato de que todos os dímeros ligados por ditriptofano já identificados (hSOD1-Trp<sup>32</sup>-Trp<sup>32</sup>-hSOD1, lisozima-Trp<sup>28</sup>-Trp<sup>28</sup>-lisozima, lisozima-Trp<sup>28</sup>-Trp<sup>32</sup>-hSOD1, βB2-Trp<sup>151</sup>-Trp<sup>151</sup>-βB2 e βA2-Trp<sup>150</sup>-Frp<sup>150</sup>-βA2) possuem um resíduo de Val em sequência ao Trp. Embora essa observação possa ser uma coincidência, a possibilidade que um resíduo hidrofóbico, tal como a Val, favorecer a recombinação de radicais triptofanila não pode ser excluída.

Os dados obtidos com a beta cristalino, principalmente os gerados pela irradiação com o simulador solar, nos estimularam a examinar a possibilidade de que a contínua exposição à luz solar resulte na formação de ligações cruzadas de ditriptofano *in vivo*. Um sistema apropriado para examinar essa possibilidade é o cristalino com catarata, devido à potencial importância da luz UV no desenvolvimento da catarata relacionada ao envelhecimento. Apesar de muitos estudos (ver, por exemplo Bloemendal et. al, 2004; Moreau e King, 2012), o processo de agregação que ocorre durante a catarata permanece discutível e a possibilidade de um papel para as ligações cruzadas de ditriptofano não foi até então considerado. Assim, analisamos os produtos de oxidação presentes no cristalino de pacientes que se submeteram à remoção de catarata em estágio avançado.

As proteínas presentes no cristalino com catarata foram separadas em fração solúvel e insolúvel e sua oligomerização foi avaliada por análises de SDS-PAGE e eletroforese bidimensional. A presença de uma banda fraca e dispersa na região de 50 kDa indicativa de hipotéticos dímeros covalentes foi observada em todas as frações analisadas por SDS-PAGE. Agregados de alta massa molecular (região > 100 kDa) foram também observados, principalmente na fração contendo proteínas insolúveis (Figs. 21 e 22). A separação das proteínas solúveis e insolúveis foi realizada também por eletroforese bidimensional. Várias bandas com pl entre 5,0 - 9,0 e peso molecular entre 15-25 kDa foram identificadas na fração solúvel. Uma diminuição significativa das bandas entre 15-25 kDa foi observada no gel contendo as proteínas insolúveis. Paralelamente uma diminuição das bandas referentes ao monômero e a presença de agregados de alto peso molecular que não foram

Análise protêomica das proteínas detectadas por eletroforese bidimensional nas frações solúvel e insolúvel não revelou a presença de outras proteínas a não ser aquelas constituintes da alfa, beta e gama cristalino (Fig. 22; Tabelas 8 e 9). Embora elas sejam as mais abundantes, outros estudos relataram a caracterização de outras proteínas (Srivastana et al., 2004 e Su et al., 2011). Essa diferença talvez possa ser atribuída ao fato de que os cristalinos aqui examinados são de estágios bastante avançados de catarata. Em nossas análises detectamos muitas das modificações já descritas para as cadeias da alfa, beta e gama cristalino, como oxidação de Met e deamidações (Tabelas 8 e 9) (Wilmarth et al., 2006, Hains et al., 2007). Observamos também modificações em resíduos de Trp mas a baixa detecção dos íons impediu suas identificações.

A identificação exclusiva de constituintes da alfa, beta e gama cristalino e a enorme dispersão da banda na região do dímero no gel 2D (Fig. 22), nos motivaram a tentar caracterizar as proteínas presentes nas bandas da região do monômero (15-25 kDa) e do dímero (região de 50 kDa) separadas por gel 1 D (Fig. 21). Essa estrategia compensou, essencialmente ao corrobarar os dados obtidos na região de monômeros utilizando o gel 2D e ao permitir caracterizar várias modificações oxidativas em resíduos de Trp (Tabela 10).

Na região de monômeros, a fração solúvel apresentou 4 peptídeos trípticos contendo resíduos de Trp oxidados a *N*-formilquinurenina, enquanto a fração insolúvel apresentou 11 peptídeos oxidados a quinurenina e *N*-formilquinurenina (Tabela 10). Infelizmente, não obtivemos cristalino de pacientes sem catarata para experimentos controles, mas já foi relatado que o número de resíduos oxidados de Trp aumenta 50% em cristalinos com catarata (Hains & Truscott, 2007). Na região de dímeros, as frações solúvel e insolúvel mostraram a presença de dois dímeros ligados por ligação ditriptofano caracterizados como βB1-Trp<sup>127</sup>-Trp<sup>127</sup>-βB1 e βB1-Trp<sup>193</sup>-Trp<sup>193</sup>-βB1 (Figs. 23-26). Portanto, mostramos pela primeira vez que ligações cruzadas de ditriptofano podem ser produzidas *in vivo*.

Como muitas modificações protêicas já foram descritas para o cristalino com catarata e como múltiplos processos podem ser responsáveis pela agregação protêica característica da patologia, não possuímos dados para discutir a relevância das modificações oxidativas aqui relatadas. Todavia, deve-se notar que análises estruturais da cadeia B1 da beta cristalino humana mostram que ela se comporta como um dímero em solução. Esse dímero pode interagir com outras cadeias, formando oligômeros de alta massa molecular, os quais são essenciais para a transparência das lentes. Dentre os resíduos que contribuem para estabelecer estas

interações intermoleculares os resíduos Trp<sup>127</sup>, Trp<sup>175</sup> e Trp<sup>237</sup> são os principais resíduos hidrofóbicos envolvidos (Van Montfort et al., 2003). A oxidação desses resíduos aqui relatada tanto à quinurenina e *N*-formilquinurenina como ao dímero covalente  $\beta$ B1-Trp<sup>127</sup>-Trp<sup>127</sup>- $\beta$ B1 prejudicará as interações hidrofóbicas nativas e poderá contribuir para o processo de agregação protêica.

Conclusões

### 6 CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou que ligações cruzadas C3-N1 de ditriptofano, formadas pela recombinação de radicais proteína-Trp<sup>•</sup>, são formadas em diferentes proteínas pela ação do radical carbonato ou da luz UV. Pudemos concluir que a detecção de ligações cruzadas de triptofano em células e tecidos não expostos à luz pode revelar a produção de radicais carbonato, abrindo a possibilidade de explorar a formação dessas ligações como um biomarcador deste radical. Ao confirmar que o radical carbonato é propenso a promover ligações cruzadas entre biomoléculas (Crean et al., 2008; Medinas et. al, 2010; Queiroz et al., 2013; Coelho et al, 2014 e lqbal et al., 2014), as quais são lesões resistentes ao reparo celular, nosso estudo enfatizou o possível papel do radical carbonato em mecanismos patogênicos associados a condições oxidativas.

Também concluímos que o radical carbonato (forte oxidante de um elétron) e a luz UVC (alta energia) oxida os mesmos resíduos de Trp da lisozima e da beta cristalino e tal comportamento poderá se extender a outras proteínas. Já a luz de menor energia do simulador solar (UVA e UVB) levou a um menor número de resíduos Trp oxidados na beta cristalino. Também, o dímero formado (βA2-Trp<sup>150</sup>-Trp<sup>150</sup>-βA2) foi diferente daquele obtido pela ação do radical carbonato ou da luz UVC. Nesse ponto, não podemos equacionar essa diferença. De qualquer forma, os resultados apoiaram a visão de que a contínua exposição à luz solar resulta na formação de ligações cruzadas de ditriptofano.

De fato, demonstramos pela primeira vez a presença de ligações cruzadas C3-N1 de ditriptofano (βB1-Trp<sup>127</sup>-Trp<sup>127</sup>-βB1 e βB1-Trp<sup>193</sup>-Trp<sup>193</sup>-βB1) no cristalino de pacientes com cataratas em estágio avançado. Consideramos que a

Conclusões

caracterização dessas ligações cruzadas poderá futuramente contribuir para a compreensão em nível molecular dos eventos que levam à opacidade do cristalino com o decorrer dos anos. Tal compreensão poderá levar ao desenho de novas estratégias preventivas para a catarata. Embora a cirurgia de remoção de catarata seja segura e eficaz, o envelhecimento geral da população tenderá a dobrar o número de cirurgias necessárias nos próximos 20 anos (Taylor, 2000). Portanto, estratégias preventivas, como a recentemente descoberta para casos de catarata congênita (Zhao et. al, 2015) serão bem-vindas.

### 7 REFERÊNCIAS

ALVAREZ, M. N.; PELUFFO, G.; FOLKES, L.; WARDMAN, P.; RADI, R. Reaction of the carbonate radical with the spin-trap 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide in chemical and cellular systems: pulse radiolysis, electron paramagnetic resonance, and kinetic-competition studies. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 43, p. 1523-1533, 2007.

ARENAS, A.; LÓPES-ALARCÓN, C.; KOGAN, M.; LISSI, E.; DAVIES, M. J.; SILVA, E. Chemical modification of lysozyme, glucose 6-phosphate dehydrogenase, and bovine eye lens proteins induced by peroxyl radicals: role of oxidizable amino acid residues. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 26, p. 67-77, 2013.

AUGUSTO, O.; BONINI, M. G.; AMANSO, A. M.; LINARES, E.; SANTOS, C. C. X.; DE MENEZES, S. L. Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 32, p. 841-859, 2002.

AUGUSTO, O.; MIYAMOTO, S. Oxygen Radicals and Related Species. **Principles of Free Radical Biomedicine** New York, NY: Nova Science Publishers, p. 19-41, 2012.

AUGUSTO, O.; MUNTZ VAZ, S. EPR spin-trapping of protein radicals to investigate biological oxidative mechanisms. **Amino Acids**, v. 32, p. 535-542, 2007.

AUST, S. D.; CHIGNELL, C. F.; BRAY, T. M.; KALYANARAMAN, B.; MASON, R. P. Free radicals in toxicology. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 120, p. 168-178, 1993.

BONINI, M.G.; FERNANDES, D.C.; AUGUSTO, O. Albumin oxidation to diverse radicals by the peroxidase activity of Cu,Zn-superoxide dismutase in the presence of bicarbonate or nitrite: diffusible radicals produce cysteinyl and solvent-exposed and -unexposed tyrosyl radicals. **Biochem.**, v. 43(2), p. 344-351, 2004.

BONINI, M.G.; RADI, R.; FERRER-SUETA, G.; FERREIRA, A.M. AUGUSTO, O. Direct EPR detection of the carbonate radical anion produced from peroxynitrite and carbon dioxide. **J Biol Chem.**, v. 274(16), p. 10802-10806, 1999.

BLOEMENDAL H.; DE JONG, W.; JAENICKE R.; LUBSEN, N.H.; SLINGSBY, C.; TARDIEU, A. Ageing and vision: structure, stability and function of lens crystallins. **Prog Biophys Mol Biol.**, v. 86(3), p.407–85, 2004.

BHATTACHARJEE, S.; DETERDING, L. J.; JIANG, J.; BONINI, M. G.; TOMER, K. B.; RAMIREZ, D. C.; MASON, R. P. Electron transfer between a tyrosyl radical and a cysteine residue in hemoproteins: spin trapping analysis. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 129, p. 13493-13501, 2007.

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

BREGERE, C.; REBRIN, I.; SOHAL, R. S. Detection and characterization of in vivo nitration and oxidation of tryptophan residues in proteins. **Meth. Enzymol.**, v. 441, p. 339-349, 2008.

BUTLER, J.; LAND, E. J.; PRUTZ, W. A.; SWALLOW, A. J. Reversibility of charge transfer between tryptophan and tyrosine. **J. Chem. Soc., Chem. Commun.**, p. 348-349, 1986.

CANDEIAS, L. P.; WARDMAN, P.; MASON, R. P. The reaction of oxygen with radicals from oxidation of tryptophan and indole-3-acetic acid. **Biophysical Chemistry**, v. 67, p. 229-237, 1997.

CARTER, D.S.; VAN VRANKEN, D.L. Photooxidation of 2,2'- Indolylindolines to 2,2'-Biindoles: Mild formation of ditryptophan crosslinks. **Tetrahedron Letters**, v. 37(2), p. 5629-5632, 1996.

CASTELHANO, A. L.; PERKINS, M. J.; GRILLER, D. Spin trapping of hydroxyl in water: decay kinetics for the 'OH and adducts to 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide. **Can. J. Chem.**, v. 61, p. 298-299, 1983.

CHAUDHURI, A.R.; WAAL, E.M.; PIERCE, A.; VAN REMMEN, H.; WARD, F.W.; RICHARDSON A. Detection of protein carbonyls in aging liver tissue: A fluorescence-based proteomic approach. **Mechan. Ageing and Develop.**, v. 127, p. 849-861, 2006.

CHEN, S. N.; HOFFMAN, M. Z. Rate constants for the reaction of the carbonate radical with compounds of biochemical interest in neutral aqueous solution. **Radiat. Res.**, v. 56, p. 40-47, 1973.

CHENG, Z.; LI, Y. What Is Responsible for the Initiating Chemistry of Iron-Mediated Lipid Peroxidation: An Update. **Chem. Rev.**, v. 107, p. 748-766, 2007.

CHYLACK, L.T.; LESKE, M.C.; KHU, P.M.; KASHIWAG, T.; SPERDUTO, R. The lens opacities classification system II (LOCS II). **Arch. Of Ophthalmol.**, v. 107 (7), p. 991-997, 1989.

COELHO, F. R.; IQBAL, A.; LINARES, E.; SILVA, D. F.; LIMA, F. S.; CUCCOVIA, I. M.; AUGUSTO, O. Oxidation of the Tryptophan 32 Residue of Human Superoxide Dismutase 1 Caused by Its Bicarbonate-dependent Peroxidase Activity Triggers the Non-amyloid Aggregation of the Enzyme. **J. Biol. Chem.**, v. 289, p. 30690-30701, 2014.

CREAN, C.; LEE, Y. A.; YUN, B. H.; GEACINTOV, N. E.; SHAFIROVICH, V. Oxidation of guanine by carbonate radicals derived from photolysis of carbonatotetramminecobalt(III) complexes and the pH dependence of intrastrand DNA cross-links mediated by guanine radical reactions. **Chembiochem.**, v. 9, p. 1985-1991, 2008.

CREAN, C.; UVAYDOV, Y.; GEACINTOV, N. E.; SHAFIROVICH, V. Oxidation of single-stranded oligonucleotides by carbonate radical anions: generating intrastrand

cross-links between guanine and thymine bases separated by cytosines. **Nucleic Acids Res.**, v. 36, p. 742-755, 2008.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; COLOMBO, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. **Clin. Chem**., v. 52, p.601-623, 2006.

DASGUPTA, T. P.; HARRIS, G. M. Kinetics and mechanism of aquation of carbonato complexes of cobalt(III). II. The acid-catalyzed aquation of carbonatotetraaminecobalt(III) ion. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 91, p. 3207-3211, 1969.

DAVIES, M. J.; FU, S.; WANG, H.; DEAN, R. T. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 27, p.1151-1163, 1999.

DAVIES, M.J.; DEAN R,T. Radical-mediated protein oxidation: from chemistry to medicine. Oxford University. Press: Oxford, New York.

DAVIES, M.J.; HAWKINS, C.L. EPR spin trapping of protein radicals. **Free Radic. Biol. Med.**, v.39 (9), 1072-1086, 2004.

DINH, T. D.; VAN VRANKEN, D. L. Control of ditryptophan cross-linking: dihydrotryptophan as a tryptophan precursor in peptide synthesis. **J. Pept. Res.**, v. 53, p. 465-474, 1999.

DRECHSEL D.A.; ESTÉVEZ, A.G.; BARBEITO, L.; BECKMAN, J.S. Nitric oxidemediated oxidative damage and the progressive demise of motor neurons in ALS. **Neurotox Res.**, v. 22(4), p. 251-264, 2012.

EHRENSHAFT, M.; Silva, S. O.; PERDIVARA, I.; BILSKI, P.; SIK, R. H.; CHIGNELL, C. F.; TOMER, K. B.; MASON, R. P. Immunological detection of N-formylkynurenine in oxidized proteins. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 46, p. 1260-1266, 2009.

FERNÁNDEZ-VIDAL, M.; JAYASINGHE, S.; LADOKHIN, A.S. WHITE, S.H. Folding amphipathic helices into membranes. **J. Mol. Biol.**, v. 370(3), p.459-470, 2007.

FINKEL, T. Oxidant signals and oxidative stress. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 15, p. 247-254, 2003.

FORMAN, H. J., MAIORINO, M., URSINI, F. Signaling functions of reactive oxygen species. **Biochemistry.**, v. 49, p. 835-842, 2010.

GE, C.; GEORGIEV, A.; OHMAN, A.; WIESLANDER, A.; KELLY, A.A. Tryptophan residues promote membrane association for a plant lipid glycosyltransferase envolved in phosphate stress. **J. Biol. Chem.**, v. 286(8), p.6669-6684, 2011.

GRACANIN, M.; HAWKINS, C. L.; PATTISON, D. I.; DAVIES, M. J. Singlet-oxygenmediated amino acid and protein oxidation: formation of tryptophan peroxides and decomposition products. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 47, p. 92-102, 2009. GRUNE, T. Protein oxidation. In: Principles of Free radical biomedicine. **Nova Science Publishers**, v. 1, p. 14-133, 2012.

GRUZMAN, A.; WOOD, W. L.; ALPERT, E.; PRASAD, M. D.; MILLER, R. G.; ROTHSTEIN, J. D.; BOWSER, R.; HAMILTON, R.; WOOD, T.D.; CLEVELAND, D. W.; LINGAPPA, V. R.; LIU, J. Common molecular signature in SOD1 for both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 104, p. 12524-12529, 2007.

HAINS, P.; TRUSCOTT, R.T.W. Post-Translational modifications in the nuclear region of young, aged, and cataract human lenses. **J. Proteome Res**., v. 6, p.3935-3943, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.C. Free radicals in biology and medicine, 4 edition, Oxford University Press, 1998.

HAWKINS, C.L.; DAVIES, M.J. Inactivation of proteases inhibitors and lysozyme by hypocholrous acid: Role of side chain oxidation and protein unfolding and loss biologic function. **Chem. Res. Toxicol.**, v.18, p. 1600-1610, 2005.

HODGSON, S.; FRIDOVICH, I. The mechanism of the activity dependent luminescence of xanthine oxidase. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 172, p.202-205, 1976.

IQBAL, A.; PAVIANI, V.; MORETTI, A. I.; LAURINDO, F. R. M.; AUGUSTO, O. Oxidation, inactivation and aggregation of protein disulfide isomerase promoted by the bicarbonate-dependent peroxidase activity of human superoxide dismutase. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 557, p. 72-81, 2014.

JANTSCHKO, W.; FURTMULLER, P. G.; ALLEGRA, M.; LIVREA, M. A.; JAKOPITSCH, C.; REGELSBERGER, G.; OBINGER, C. Redox intermediates of plant and mammalian peroxidases: a comparative transient-kinetic study of their reactivity toward indole derivatives. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 398, p. 12-22, 2002.

JOHNSTON, J. A.; DALTON, M. J.; GURNEY, M. E.; KOPITO, R. R. Formation of high molecular weight complexes of mutant Cu, Zn-superoxide dismutase in a mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p.12571-12576, 2000.

KALYANARAMAN, B.; PEREZ-REYES, E.; MASON, R. P. The reduction of nitrosospin traps in chemical and biological systems. A cautionary note. **Tetrahedron Letters**, v. 20, p. 4809-4812, 1979.

KARUNAKARAN, C.; ZHANG, H.; CROW, J. P.; ANTHOLINE, W. E.; KALYANARAMAN, B. Direct probing of copper active site and free radical formed during bicarbonate-dependent peroxidase activity of bovine and human copper, zinc-superoxide dismutases. Low-temperature electron paramagnetic resonance and electron nuclear double resonance studies. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 32534-32540, 2004.

KAUR, H.; LEUNG, K. H. W.; PERKINS, M. J. A water soluble nitroso aromatic spin trap. J. Chem. Soc., Chem. Commun., v. 3, p. 142-143, 1981.

KERKAERT, B.; MESTDAGH, F.; OBANDO, M.; CUCU, T.; DE MEULENAER, B. Identification of Modified Lysozyme Peptides upon Photo-oxidation by LC-TOF-MS. **J. Agric. Food Chem.**, v. 61, p. 12727-12736, 2013.

KORLIMBINIS, A.; HAIN, P.G.; TRUSCOTT, R.J.W.; AQUILINA, A. 3-Hydroxykynurenine oxidizes  $\alpha$ -crystallin: Potencial role in cataractogenesis. **Biochemistry**, v.45, p: 1852-1860, 2006.

KURODA, M.; SAKIYAMA, F.; NARITA, K. Oxidation of Tryptophan in Lysozyme by Ozone in Aqueous Solution. **J. Biochem.**, v.78, p. 641-651, 1975.

LAMPI, K.J.; WILMARTH, P.A.; MURRAY, M.R.; DAVID, L.L. Lens  $\beta$ -crystallins: The role of deamination and related modifications in aging and cataract. **Progres. Biophys. Mol. Biolog.**, v. 114, p: 21-31, 2014.

LEO, G.; ALTUCCI, C.; BOURGOIN-VOILLARD, S.; GRAVAGNUOLO, A. M.; ESPOSITO, R.; MARINO, G.; COSTELLO, C. E.; VELOTTA, R.; BIROLO, L. Ultraviolet laser-induced cross-linking in peptides. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 27, p. 1660-1668, 2013.

LIMA, D.B.; DE LIMA, T.B.; BALBUENA, T.S.; NEVES-FERREIRA, A.G.C.; BARBOSA, V.C.; GOZZO, F.C. SIM-XL: A powerful and user-friendly tool for peptide cross-linking analysis. **J Proteom.**, v. 129, p.51–55, 2015.

MCCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **J. Biol. Chem.**, v. 244 (22), p. 66049-66055, 1969.

MEDINAS, D. B., GOZZO, F. C., SANTOS, L. F., IGLESIAS, A. H., AUGUSTO, O. A ditryptophan cross-link is responsible for the covalent dimerization of human superoxide dismutase 1 during its bicarbonate-dependent peroxidase activity. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 49, p. 1046-1053, 2010.

MEDINAS, D. B.; CERCHIARO, G.; TRINDADE, D. F.; AUGUSTO, O. The carbonate radical and related oxidants derived from bicarbonate buffer. **IUBMB Life**, v. 59, p. 255-262, 2007.

MEDINAS, D. B.; TOLEDO, J. C., Jr; CERCHIARO, G.; DO-AMARAL, A. T.; de-REZENDE, L.; MALVEZZI, A.; AUGUSTO, O. Peroxymonocarbonate and carbonate radical displace the hydroxyl-like oxidant in the Sod1 peroxidase activity under physiological conditions. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 22, p. 639-648, 2009.

MOREAU, K.; KING, J. Protein misfolding and aggregation in cataract disease and prospects for prevention. **Cell**, v.18, p. 273-282, 2012.

PATTISON, D. I.; RAHMANTO, A. S.; DAVIES, M. J. Photo-oxidation of proteins. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 11, p. 38-53, 2011.

PAVIANI, V.; QUEIROZ, R. F.; MARQUEZ, F.E.; DI MASCIO, P.; AUGUSTO, O. Production of lysozyme and lysozyme-superoxide dismutase dimers bound by a ditryptophan cross-link in carbonate radical-treated lysozyme. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 89, p. 72-82, 2015.

PICHORNER, H.; METODIEWA, D.; WINTERBOURN. Generation of superoxide and tyrosine peroxide as a result of tyrosyl radical scavenging by glutathione. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 323 (2), p. 429-437, 1995.

PLOWMAN, J. E.; DEB-CHOUDHURY, S.; GROSVENOR, A. J.; DYER, J. M. Protein oxidation: identification and utilization of molecular markers to differentiate singlet oxygen and hydroxyl radical-mediated oxidative pathways. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 12, p. 1960-1967, 2013.

PORTER, N. A.; LEHMAN, L. S.; WEBER, B. A.; SMITH, K. J. Unified mechanism for polyunsaturated fatty acid autoxidation. Competition of peroxy radical hydrogen atom abstraction, .beta.-scission, and cyclization. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 103, p. 6447-6455; 1981.

PRUTZ, W. A.; BUTLER, J.; LAND, E. J.; SWALLOW, A. J. Direct demonstration of electron transfer between tryptophan and tyrosine in proteins. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 96, p. 408-414, 1980.

QUEIROZ, R. F.; PAVIANI, V.; COELHO, F. R.; MARQUES, E. F.; DI MASCIO, P.; AUGUSTO, O. The carbonylation and covalent dimerization of human superoxide dismutase 1 caused by its bicarbonate-dependent peroxidase activity is inhibited by the radical scavenger tempol. **Biochem. J.**, v. 455, p. 37-46, 2013.

REDDY, G.B.; KUMAR, P.A.; KUMAR M.S. Chaperone like activity and hydrophobicity of alpha crystallin. **IUBMB Life**, v. 11, p. 632-641, 2006.

RHEE, S.G.; CHAE, H. Z.; KIM, K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 38, p.1543-1552, 2005.

SANTOS, C. X.; BONINI, M. G.; AUGUSTO, O. Role of the carbonate radical anion in tyrosine nitration and hydroxylation by peroxynitrite. **Arch Biochem Biophys.**, v. 377, p. 146-152, 2000.

SHARMA, K.K; SANTH, O.S.; HKUMAR, P. Lens aging: Effects of crystallins. **Bioch. Biophys. Act.**, v. 1970, p. 1095-1108, 2009.

SILVA, E.; UGARTE, R.; ANDRADE, A.; EDWARDS, A. M. Riboflavin-sensitized photoprocesses of tryptophan. **J. Photochem. Photobiol.**, v. 23, p. 43-48, 1994.

SIMAT, T. J.; STEINHART, H. Oxidation of Free Tryptophan and Tryptophan Residues in Peptides and Proteins. J. Agric. Food Chem., v. 46, p. 490-498, 1998.

SRIVASTANA, O.P.; KIRK, M.C.; SRIVASTANA, K. Characterization of covalent multimers of crystallins in aging human lenses. **J.Biol.Chem.**, v. 279 (2), p. 10901-10909, 2004.

STACHEL, S. J.; HABBEB, R. L.; VAN VRANKEN, D. L. Formation of Constrained, Fluorescent Peptides via Tryptophan Dimerization and Oxidation. J. Am. Chem. Soc., v.118, p.1225-1226,1996.

STADTMAN, E.R Protein oxidation in aging and age diseases. **Ann N Y Acad Sci.**, v.28, p.22-38, 2001.

STROHALM, M.; ŠANTRUCEK, J.; HYNEK, R.; KODICEK, M. Analysis of tryptophan surface accessibility in proteins by MALDI-TOF mass spectrometry. **Biochem. and Biophys. Res. Commun.**, v. 323, p. 1134-1138, 2004.

STUART-AUDETTE, M.; BLOUQUIT, Y.; FARAGGI, M.; SICARD-ROSELLI, C.; HOUÉE-LEVIN, C.; JOLLES, P. Re-evaluation of intramolecular long-range electron transfer between tyrosine and tryptophan in lysozymes. **European J. Biochem.**, v. 270, p. 3565-3571, 2003.

SU, S.; ZHANG, H.; LI, Z.; SONG, Z. ZHANG, L.; CBEN, S. Proteomic analysis of human age related nuclear cataracts and normal lens nuclei. **IOVS**, v. 52 (7), p. 4182-4191, 2011.

SYMONYAN, M.; NALBANDYA, R. Interation of hydrogen peroxide with superoxide dismutase from erythrocytes. **FEBS Letters**, v. 28, p. 22-24, 1972.

TAYLOR, H. R. Cataract: how much surgery do we have to do? **Br J Ophthalmol.**, v. 84, p.1-2, 2000.

TOLEDO, J. C.; AUDI, R., OGUSUCU, R.; MONTEIRO, G.; NETTO, L. E.; AUGUSTO, O. Horseradish peroxidase compound I as a tool to investigate reactive protein-cysteine residues: from quantification to kinetics. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 50, p. 1032-1038, 2011.

VAN MONTFORT, R.L.; BATEMAN, O.A.; LUBSEN, N.H.; SLINGSBY, C. Crystal structure of truncated human beta B1-crystallin. **Protein Science**. v.12, p. 2606-2612, 2003.

VAZ, S.M.; PRADO, F.M.; Di MASCIO, P.; AUGUSTO, O. Oxidation and nitration of ribonuclease and lysozyme by peroxynitrite and myeloperoxidase. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 484, p.127-133, 2009.

VINSON, J.A. Oxidative stress in cataract. **Pathophysiology**, v.13, p. 151-162, 2006.

WILMARTH, P.A.; TANNER, S.; DASARI, S.; NAGALLA, S. R.; RIVIERE, M. A.; BAFNA, V.; PEVZNER, P. A.; DAVID, L. L. Age-Related Changes in Human Crystallins Determined from Comparative Analysis of Post-Translational Modifications in Young and Aged Lens: Does Deamidation Contribute to Crystallin Insolubility? **J. Proteome Res.** v. 5, p. 2554-2566, 2006.

WINTERBOURN, C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. **Nat. Chem. Biol.**, v. 4, p. 278-286, 2008.

WINTERBOURN, C. C.; HAMPTON, M. B. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 45, p. 549-561, 2008.

YAMAKURA, F.; IKEDA, K. Modification of tryptophan and tryptophan residues in proteins by reactive nitrogen species. **Nitric Oxide**, v.14, p. 152-161, 2006.

YAMAKURA, F.; KAWASAKI, H. Post translational modifications of superoxide dismutase. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 1804(2), p.318-325, 2010.

ZHANG, H.; ANDREKOPOULOS, C.; JOSEPH, J.; CHANDRAN, K.; KAROUI, H.; CROW, J. P.; KALYANARAMAN, B. Bicarbonate-dependent peroxidase activity of human Cu,Zn-superoxide dismutase induces covalent aggregation of protein: intermediacy of tryptophan-derived oxidation products. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 24078-24089, 2003.

ZHANG, H.; JOSEPH, J.; CROW, J.; KALYANARAMAN, B. Mass spectral evidence for carbonate-anion-radical-induced posttranslational modification of tryptophan to kynurenine in human Cu, Zn superoxide dismutase. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 37, p. 201-2026, 2004.

ZHANG, H.; JOSEPH, J.; GURNEY, M.; BECKER, D.; KALYANARAMAN, B. Bicarbonate enhances peroxidase activity of Cu,Zn-superoxide dismutase. Role of carbonate anion radical and scavenging of carbonate anion radical by metalloporphyrin antioxidant enzyme mimetics. **J Biol Chem.**, v. 277, p. 1013-1020, 2002.

ZHANG, H.; XU, Y.; JOSEPH, J.; KALYANARAMAN, B. Intramolecular electron transfer between tyrosyl radical and cysteine residue inhibits tyrosine nitration and induces thiyl radical formation in model peptides treated with myeloperoxidase, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and NO<sub>2</sub><sup>-</sup>: EPR SPIN trapping studies. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 40684-40698, 2005.

ZHANG, Z.; SMITH, D.L.; SMITH, J.B. Human  $\beta$  crystallin modified by backbone cleaveage, deamination and oxidation are prone to associate. **Exp. Eye. Res.**, v. 77, p. 259-272, 2003.

ZHAO, L.; CHEN, X. J.; ZHU, J.; XI, Y. B.; YANG, X.; HU, L.D.; OUYANG, H.; PATEL, S.H.; JIN, X.; DANNI, L.; WU, F.; CAI, H.; LI, G.; CAO, G.; LIN, Y.; CHEN, D.; WEN, C.; CHUNG, C.; WANG, Y.; QUI, A.; YEH, E.; WANG, W.; HU, X.; GROB, S.; ABAGYAN, R.; SU, Z.; TJONDRO, H.; ZHAO, X.J.; LUO, H.; HOU, R.; PERRY, J.P.; GOA, W.; KOZAK, I.; GRANET, D.; LI, Y.; SUN, X.; WANG, J.; ZHANG, L.; LIU,Y.; BIN-YAN, Y.; ZHANG, K. Lanosterol reverses protein aggregation in cataracts. **Nature**. v. 523: p.607-611; 2015.

### 8 APÊNDICES





Figura A1. Análises por nano-ESI-Q-TOF-MS/MS do peptídeo tríptico correspondente ao resíduo 22-33 encontrado no monômero da lisozima oxidado pelo radical carbonato produzido fotoliticamente. (A) Espectro de MS do peptídeo tríptico oxidado a hidroxi-triptofano <sup>22</sup>GYSLGNW(OH)VCAAK<sup>33</sup> (massa monoisotópica de 1341,63) com 2 cargas (m/z 671,31). (B) Espectro de MS do peptídeo tríptico oxidado a *N*-formilquinurenina <sup>22</sup>GYSLGNNFKVCAAK<sup>33</sup> (massa monoisotópica de 1357,62) com 2 cargas (m/z 679,30). (C) Análise de MS/MS do pico com m/z 671,31. (D) Análise de MS/MS do pico com m/z 679,30. As condições experimentais são as mesmas descritas na tabela 1.


Figura A2. Análises por nano-ESI-Q-TOF-MS/MS do peptídeo tríptico correspondente ao resíduo 62-68 encontrado no monômero da lisozima oxidado pelo radical carbonato produzido fotoliticamente. (A) Espectros de MS do peptídeo tríptico <sup>62</sup>NFKWCNDGR<sup>68</sup> oxidado a *N*-formilquinurenina (NFK) (massa monoisotópica de 1025,36) com duas cargas (m/z 513,18). (B) Análise de MS/MS do pico com m/z 513,18. As condições experimentais são as mesmas descritas na tabela 1.



Figura A3. Análises por nano-ESI-Q-TOF-MS/MS do peptídeo tríptico correspondente ao resíduo 117-125 encontrado no monômero da lisozima oxidado pelo radical carbonato produzido fotoliticamente. (A) Espectro de MS do peptídeo tríptico <sup>117</sup>GTDVQAW(OH)IR<sup>125</sup> oxidado a hidroxi-triptofano (massa monoisotópica de 1061,54) com duas cargas (m/z 531,27). (B) Espectro de MS do peptídeo tríptico <sup>117</sup>GTDVQAW(OH)IR<sup>125</sup> oxidado cargas (m/z 539,27). (C) Análise de MS/MS do pico com m/z 531,27. (D) Análise de MS/MS do pico com m/z 539,27. As condições experimentais são as mesmas descritas na tabela 1.



Apêndice B – Espectros de MS e MS/MS dos produtos de oxidação da beta cristalino

Figura B1. Análises por nano-ESI-Q-TOF-MS/MS do peptídeo tríptico correspondente ao resíduo 49-76 da cadeia B2 encontrado no monômero oxidado pelo radical carbonato. (A) Espectro de MS do peptídeo tríptico <sup>49</sup>AGSVLVQAGP**W(OH)**VGYEQANCKGEQFVFEK<sup>76</sup> oxidado a hidroxi-triptofano (massa monoisotópica de 3113,570) com três cargas (m/z 1038,83). (B) Espectro de MS do peptídeo tríptico <sup>49</sup>AGSVLVQAGP**NFK**VGYEQANCKGEQFVFEK<sup>76</sup> oxidado a *N*-formilquinurenina (massa monoisotópica de 3072,510) com três cargas (m/z 1025,170). (C) Análise de MS/MS do pico com m/z 1038,186. (D) Análise de MS/MS do pico com m/z 1025,170. As condições experimentais são as mesmas descritas na tabela 5.



Figura B2. Análises por nano-ESI-Q-TOF-MS/MS do peptídeo tríptico correspondente ao resíduo 77-89 e 146-168 da cadeia B2 encontrado no monômero oxidado pelo radical carbonato. (A) Espectro de MS do peptídeo tríptico <sup>77</sup>GEYPRWDSNFKTSSR<sup>89</sup> oxidado *N*-formilquinurenina (massa monoisotópica de 1657,730) com três cargas (m/z 553,576). (B) Espectro de MS do peptídeo tríptico <sup>146</sup>VQSGTNFKVGYQYPGYRGLQYLLEK<sup>168</sup> (massa monoisotópica de 2736,300) com três cargas (m/z 913,101). (C) Análise de MS/MS do pico com m/z 553,576. (D) Análise de MS/MS do pico com m/z 913,101. As condições experimentais são as mesmas descritas na tabela 5.



Figura B3. Análises por nano-ESI-Q-TOF-MS/MS do peptídeo tríptico correspondente ao resíduo 161-188 da cadeia B2 e do resíduo 56-71 da cadeia B3 encontrado no monômero oxidado radical carbonato. (A) Espectro peptídeo pelo de MS do tríptico <sup>161</sup>GLQY(OH)LLEKGDYKDSGDFGAPQPQVQSVR<sup>188</sup> oxidado a DOPA (massa monoisotópica de 3110,538) com quatro cargas (m/z 778,640). (B) Espectro de MS do peptídeo tríptico <sup>56</sup>VQSIQVESGP**W(OH)**LAFER<sup>71</sup> oxidado a *N*-formilguinurenina (massa monoisotópica de 1789,907) com duas cargas (m/z 895,958). (C) Análise de MS/MS do pico com m/z 778,640. (D) Análise de MS/MS do pico com m/z 895,958. As condições experimentais são as mesmas descritas na tabela 5.



Figura B4. Análises por nano-ESI-Q-TOF-MS/MS do peptídeo tríptico correspondente ao resíduo 197-211 da cadeia A3 encontrado no monômero oxidado por radical carbonato. (A) Espectro de MS do peptídeo tríptico <sup>197</sup>ENFKGSHATQSQIQSIR<sup>211</sup> oxidado a *N*-formilquinurenina (massa monoisotópica de 1759,846) com três cargas (m/z 587,282). (B) Análise de MS/MS do pico com *m*/z 587,282. As condições experimentais são as mesmas descritas na tabela 5.

Apêndice C – Espectros de MS e MS/MS dos principais produtos de oxidação identificados no cristalino humano com catarata.



Figura C1. Análises por nano-ESI-Q-TOF-MS/MS do peptídeo tríptico correspondente ao resíduo 124-132 da cadeia B1 encontrado no monômero insolúvel. (A) Espectro de MS do peptídeo tríptico <sup>124</sup>WNT**W(+4)**SSSYR<sup>132</sup> oxidado a quinurenina (massa monoisotópica de 1189,531) com duas cargas (m/z 595,765). (B) Espectro de MS do peptídeo tríptico <sup>124</sup>WNT**NFK**SSSYR<sup>132</sup> oxidado a *N*-formilquinurenina (massa monoisotópica de 1217,526) com duas cargas (m/z 609,763). (C) Análise de MS/MS do pico com m/z 595,765. (D) Espectro de MS/MS do pico com m/z 609,763. As condições experimentais são as mesmas descritas na tabela 9.



Figura C2. Análises por nano-ESI-Q-TOF-MS/MS do peptídeo tríptico correspondente ao resíduo 161-182 da cadeia B1 encontrado no monômero insolúvel. (A) Espectro de MS do peptídeo tríptico <sup>161</sup>GNTIEIQGDDAPSLNFKVYGFSDR<sup>182</sup> oxidado a *N*-formilquinurenina (massa monoisotópica de 2471,138) com duas cargas (m/z 1236,569). (B) Análise de MS/MS do pico com m/z 1236,569. As condições experimentais são as mesmas descritas na tabela 9.



Figura C3. Análises por nano-ESI-Q-TOF-MS/MS do peptídeo tríptico correspondente ao resíduo 188-202 da cadeia B1 encontrado no monômero insolúvel. (A) Espectro de MS do peptídeo tríptico <sup>188</sup>VSSGTW(+4)VGYQYPGYR<sup>202</sup> oxidado a quinurenina (massa monoisotópica de 1722,816) com duas cargas (m/z 862,408). (B) Espectro de MS do peptídeo tríptico <sup>188</sup>VSSGTNFKVGYQYPGYR<sup>202</sup> oxidado a *N*-formilquinurenina (massa monoisotópica de 1750,810) com duas cargas (m/z 876,405). (C) Análise de MS/MS do pico com m/z 862,408. (D) Espectro de MS/MS do pico com m/z 876,405. As condições experimentais são as mesmas descritas na tabela 9.



Figura C4. Análises por nano-ESI-Q-TOF-MS/MS do peptídeo tríptico correspondente ao resíduo 236-252 da cadeia B1 encontrado no monômero insolúvel. (A) Espectro de MS do peptídeo tríptico <sup>236</sup>QW(+4)HLEGSFPVLATEPPK<sup>252</sup> oxidado a quinurenina (massa monoisotópica de 1938,008) com três cargas (m/z 647,336). (B) Espectro de MS do peptídeo tríptico <sup>236</sup>QNFKHLEGSFPVLATEPPK<sup>252</sup> oxidado a *N*-formilquinurenina (massa monoisotópica de 1967,003) com três cargas (m/z 656,667). (C) Análise de MS/MS do pico com m/z 647,336. (D) Espectro de MS/MS do pico com m/z 656,667. As condições experimentais são as mesmas descritas na tabela 9.



Figura C5. Análises por nano-ESI-Q-TOF-MS/MS do peptídeo tríptico correspondente ao resíduo 96-109 e resíduo 163-177 da cadeia A3 encontrado no monômero insolúvel. (A) Espectro de MS do peptídeo tríptico <sup>96</sup>WDANFKSGSNAYHIER<sup>109</sup> oxidado *N*-formilquinurenina (massa monoisotópica de 1722,762) com três cargas (m/z 575,254). (B) Espectro de MS do peptídeo tríptico <sup>163</sup>IQSGANKFVCYQYPGYR<sup>177</sup> oxidado a *N*-formilquinurenina (massa monoisotópica de 172,762). (C) Análise de MS/MS do pico com m/z 575,254. (D) Espectro de MS/MS do pico com m/z 940,423. As condições experimentais são as mesmas descritas na tabela 9.



**Figura C6.** Análises por nano-ESI-Q-TOF-MS/MS do peptídeo tríptico correspondente ao resíduo e resíduo 197-211 da cadeia A3 e resíduo 49-71 da cadeia A4 encontrado no monômero insolúvel. (A) Espectro de MS do peptídeo tríptico <sup>197</sup>ENFKGSHATQSQIQSIR<sup>211</sup> oxidado *N*-formilquinurenina (massa monoisotópica de 1758,852) com três cargas (*m/z* 587,284). (B) Espectro de MS do peptídeo tríptico <sup>49</sup>VLSGANFKVGFEHAGFQGQQYILER<sup>71</sup> oxidado a *N*-formilquinurenina (massa monoisotópica de 2624,299) com três cargas (*m/z* 875,433). (C) Análise de MS/MS do pico com *m/z* 587,284. (D) Espectro de MS/MS do pico com *m/z* 875,433. As condições experimentais são as mesmas descritas na tabela 9.



Figura C7. Análises por nano-ESI-Q-TOF-MS/MS do peptídeo tríptico correspondente ao resíduo e resíduo 132-146 e resíduo 159-174 da cadeia gama S encontrado no monômero insolúvel. (A) Espectro de MS do peptídeo tríptico <sup>132</sup>VLEGVNFKIFYELPNYR<sup>146</sup> oxidado *N*-formilquinurenina (massa monoisotópica de 1928,978) com duas cargas (m/z 965,489). (B) Espectro de MS do peptídeo tríptico <sup>159</sup>KPIDNFKGAASPAVQSFR<sup>174</sup> oxidado a *N*-formilquinurenina (massa monoisotópica de 1760,899) com três cargas (m/z 587,966). (C) Análise de MS/MS do pico com m/z 965,489. (D) Espectro de MS/MS do pico com m/z 587,966. As condições experimentais são as mesmas descritas na tabela 9.

# 9 SUMÚLA CURRÍCULAR

## **Dados Pessoais:**

Veronica Paviani, Taquaritinga-SP, 09 de Fevereiro de 1984

## Educação:

- Fundamental: Escola Estadual Prof. Francisco Silveira Coelho, Taquaritinga - SP, 1991-1998.

- Médio: Escola Estadual Nove de Julho, Taquaritinga - SP, 1999-2001.

- Superior: Faculdade Santa Giulia, Taquaritinga - SP, 2002-2006. Farmácia.

- Formação complementar: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-SP, 2008-2010. Mestrado em Ciências, área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos. "Efeito do extrato de Azadirachta indica (nim) sobre resposta de hipersensibilidade mediada por ácido salicílico em células de Rubus fruticosus".

## Ocupação:

 Bolsista de Doutorado CAPES, 2011-2014, para desenvolvimento do projeto intitulado: "Oxidação de resíduos de triptofano em proteínas: formação da ligação cruzada ditriptofano e implicações patofisiológicas", sob orientação da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ohara Augusto.

## Publicações:

## Resumos em congressos:

**Paviani, V.**; Avakin, A.; Augusto, O. (2015), Production of ditryptophan cross-links in beta crystallin submitted to carbonate radical or to UV light. In: 44<sup>th</sup> Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil.

**Paviani, V.**; Queiroz, R. F.; Marquez, F.E.; Di Mascio, P.; Augusto, O. (2014), MS characterization of ditryptophan cross-links in lysozyme submitted to enzymatically and photolytically-generated carbonate radicals. In: 21<sup>st</sup> Annual Meeting of the Society for Free Radicals Biology and Medicine, Seattle, WA, USA.

Dos Santos, V.; Nascimento, V.; **Paviani, V.**; Augusto, O.; Vettorazzo, L.C.; Dianov, G.; Souza-Pinto, N. (2014), Double strand break repair is required for maintenance

Sumúla currícular

of mitochondrial DNA integrity in human cells. In: 21<sup>st</sup> Annual Meeting of the Society for Free Radicals Biology and Medicine, Seattle, WA, USA.

**Paviani, V.**; Queiroz, R. F.; Marquez, F.E.; Di Mascio, P.; Augusto, O. (2013), Characterization of a ditryptophan cross-links in hen lysozyme oxidized by the carbonate radical. In: VIII Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine - South American Group, Buenos Aires, Argentina.

**Paviani, V.**; Dos Prazeres, J.N.; Queiroz, R.F.; Augusto, O. (2011). Oxidative posttranslational modifications of lysozyme treated with carbonate radical generator system. In: VII Meeting of South American Group of the SFRBM, São Pedro, Brasil.

## Artigos completos:

**Paviani, V.**; Queiroz, R. F.; Marquez, F.E.; Di Mascio, P.; Augusto, O. Production of lysozyme and lysozyme-superoxide dismutase dimers bound by a ditryptophan cross-link in carbonate radical-treated lysozyme. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 89, p. 72-82, 2015.

Iqbal, A.; **Paviani, V.**; Moretti, A. I.; Laurindo, F. R. M.; Augusto, O. Oxidation, inactivation and aggregation of protein disulfide isomerase promoted by the bicarbonate-dependent peroxidase activity of human superoxide dismutase. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 557: 72-81; 2014.

Queiroz, R. F.; **Paviani, V.**; Coelho, F. R.; Marques, E. F.; Di Mascio, P.; Augusto, O. The carbonylation and covalent dimerization of human superoxide dismutase 1 caused by its bicarbonate-dependent peroxidase activity is inhibited by the radical scavenger tempol. **Biochem. J.**, v. 455, p. 37-46; 2013.

## Artigos em preparação:

**Paviani, V.**; De Mello, P.; Avakin, A.; Augusto, O. Identification of ditryptophan crosslinks in bovine beta crystallin submitted to UV Light and in human lenses of patients with cataract, (2016).

## Prêmio recebido:

2013: Prêmio viagem da Society for Free Radical Biology and Medicine South American Group para apresentar o trabalho Characterization of a ditryptophan cross-link in hen lysozyme oxidized by the carbonate radical