

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

MARCELA FRANCO MINEIRO

**Oxidação da proteína dissulfeto isomerase pelo
hidroperóxido de urato e as implicações sobre o
endotélio vascular**

Versão corrigida da Tese

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

19/02/2019

MARCELA FRANCO MINEIRO

**Oxidação da proteína dissulfeto isomerase pelo
hidroperóxido de urato e as implicações sobre o
endotélio vascular**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Flavia Carla Meotti

São Paulo

2019

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

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

M664o Mineiro, Marcela Franco
Oxidação da proteína dissulfeto isomerase pelo hidróperóxido de urato e as implicações sobre o endotélio vascular / Marcela Franco Mineiro. - São Paulo, 2019.
132 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador: Meotti, Flavia Carla

1. Hidróperóxido de urato. 2. Proteína dissulfeto isomerase de superfície. 3. Oxidação. 4. HUVEC. I. T. II. Meotti, Flavia Carla, orientador.

Ao querido vovô, Vicente Augusto Santa Cecília Franco

AGRADECIMENTOS

À querida Professora Flávia, por acreditar e confiar em mim. Sua orientação foi muito além da academia, foi um bonito aprendizado para toda a vida;

Aos meus pais Ada e Arthur, pelo amor e apoio incondicionais. Por me permitirem criar asas e voar longe de casa;

Ao Otávio, meu irmão. Tão igual e tão diferente de mim;

Ao Tiago, conforme outrora já dito, meu melhor encontro. Obrigada por estar ao meu lado todos os dias, por me fazer rir e me inspirar (com muita música, livros, cinema e inutilidades) a ser mais leve.

À toda minha família, que me recebe de braços abertos nos retornos a Minas Gerais;

À Railmara, por ser uma luz no lab. Obrigada pela linda amizade, carinho e força diários. Essa jornada não seria a mesma sem você.

Ao Albert, por ser uma luz no lab ao lado. Essa jornada também não seria a mesma sem você.

À Laura Farkuh, com quem eu sempre pude ser eu mesma, sem censuras.

Aos colegas e amigos do laboratório, alguns não mais ali presentes: Greice, Catarina, Filipe, Eliziane, Amanda, Lorena, Carol, Peter, Gustavo, Laura Mortara, Bianca e Márcia, pela “simples” presença, apoio e pelos cafés (fortes demais pro meu gosto) em meio a conversas normais em dias (a)normais;

Aos amigos do “lab lipídios” Lucas, Izabela e Adriano pela amizade e generosidade (que foi desde o espectrômetro de massas até um colchão na Califórnia);

Aos colegas e amigos de laboratórios vizinhos, que me emprestaram reagentes e/ou muito carinho: Antônio, Celinha e Samantha (Lab do Alexandre e da Julia); Luiza e Sandro (Lab da Daniela); Ancély, Leticia e Vinicius (Lab da Leticia); Fenny e Carlos (Lab do Ricardo); Victor Debbas, Ana Moretti e Thais (Lab do Chico); Fernando, Edlaine e Janaina (Lab Ohara);

Aos funcionários da Secretaria de Bioquímica e da Pós-Graduação, especialmente Fábio, Viviane e Milton, sempre tão prestativos;

À Thais, também pela ajuda com os experimentos de biotinylation, discussão e apoio;

À Ana Moretti, também por sempre ter tirado todas as minhas dúvidas com muita paciência;

À Profa Iolanda pelo carinho e experiência transmitida;

Ao Prof. Dr. Francisco Laurindo, por me receber nas inúmeras idas ao seu lab, por me emprestar reagentes e também pelas contribuições no artigo do qual muitos dos resultados aqui apresentados fazem parte;

Ao Prof. Dr. Alexandre, pelo microscópio e orientações na captura e análise das imagens. Foi um respiro de biologia tão bom!

Aos Prof. Dr. Bazito pelo HPLC preparativo, ao Prof. Dr. Mauricio pelo gerador UV e ao Prof. Dr. Claudimir, pela bomba de vácuo. Sem esses equipamentos sintetizar o HOOU seria impossível (mas eu suei!);

Aos Prof. Drs. que compõem o CEPID Redoxoma, pelas contribuições científicas ao longo das reuniões.

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado e à FAPESP e CEPID-Redoxoma pelo apoio financeiro.

*“Como já te disse, ó nobre príncipe, há dois caminhos que vão à Perfeição. O primeiro é o caminho do Conhecimento, e o segundo o da Ação. Uns preferem o primeiro, e outros, o segundo desses dois caminhos; sabe, porém, que considerados do alto, ambos são um só caminho. Escuta!
(Trecho extraído do Bhagavad Gîtâ)*

*“Are we human?
Or are we dancer?”
(The Killers)*

RESUMO

Mineiro, M.F. **Oxidação da proteína dissulfeto isomerase pelo hidroperóxido de urato e as implicações sobre o endotélio vascular.** 2019. 132p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Em condições inflamatórias do sistema vascular, altas concentrações de mieloperoxidase somada à presença do ácido úrico, sugerem a formação local do oxidante hidroperóxido de urato. A ação desse peróxido já foi demonstrada sobre glutatona e peroxirredoxinas, tornando plausível a possibilidade de que outras proteínas tiólicas também pudessem ser alvo de oxidação. A proteína dissulfeto isomerase é uma ditiol-dissulfeto oxidoreductase e chaperona, localizada principalmente no retículo endoplasmático, onde participa do enovelamento de proteínas nascentes. Além disso, um *pool* dessas enzimas foi identificado na superfície da célula e no meio extracelular (secretada) e parece ser especialmente importante em eventos vasculares como ativação e agregação de plaquetas, trombose e remodelamento vascular. Primeiramente, foi investigado se o hidroperóxido de urato era capaz de oxidar a PDI. Pelo ensaio do DTNB foi verificado que os tióis livres da proteína eram consumidos após reação com o peróxido e, em seguida, por nLC-MS/MS os resíduos de cisteínas dos sítios catalíticos foram identificados como os principais alvos de oxidação. Embora não tenham sido verificadas outras modificações além de dissulfetos, foi observado que o tratamento com hidroperóxido promoveu agregação e inativação da proteína. Os estudos subsequentes envolveram uma linhagem de células endoteliais (HUVECs). Análises preliminares de citotoxicidade (detecção da atividade da enzima lactato desidrogenase no sobrenadante e incorporação de sondas fluorescentes ao DNA) mostraram que tratamentos com concentrações de até 400 μ M de hidroperóxido de urato não são letais às células em cultura. Usando alquilantes impermeáveis à membrana celular foi mostrado que o hidroperóxido de urato oxida não só a proteína dissulfeto isomerase, mas também proteínas tiólicas totais expressas na superfície das HUVECs. Experimentos de *wound healing* foram feitos para avaliação da capacidade de migração das células mediante o tratamento com hidroperóxido de urato, mas nenhuma diferença foi observada. Contudo, a incubação das células com os agentes oxidantes hidroperóxido de urato e diamida, inibidores de PDI e integrina e um alquilante de tiol, resultaram, pelo menos nos trinta primeiros minutos, em menor capacidade de adesão das células à fibronectina. Além disso, as células tratadas com hidroperóxido de urato se tornaram mais sensíveis ao destacamento da placa de cultura e apresentaram alteração na morfologia. O tratamento com o peróxido também afetou a homeostase redox das HUVECs, observado pela diminuição da razão GSH/GSSG. Finalmente foram apresentadas evidências

indiretas de que o ácido úrico é substrato da peroxidase, uma heme peroxidase abundantemente expressa no sistema vascular. Primeiro, pelo ensaio do *Amplex Red* foi observado que a presença de ácido úrico na mistura reacional resultou em menor taxa de oxidação do reagente. Depois, por LC-MS/MS, também em amostra na qual o ácido úrico estava presente, foi identificado o hidroxisourato, álcool resultante da decomposição do hidroperóxido de urato. Todo o conjunto de dados deverá contribuir para o maior entendimento da participação do hidroperóxido de urato em processos oxidativos vasculares – especialmente a oxidação de proteínas – que pode ser um dos mecanismos responsáveis pela alteração da função endotelial e da homeostase vascular.

Palavras-chave: hidroperóxido de urato, proteína dissulfeto isomerase de superfície, oxidação, HUVEC.

ABSTRACT

Mineiro, M.F. **Oxidation of protein disulfide isomerase by urate hydroperoxide and implications in vascular endothelium.** 2019. 132p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

During vascular inflammatory conditions, high amounts of myeloperoxidase added to the presence of uric acid, suggest the local formation of urate hydroperoxide. Its oxidative action has already been demonstrated on glutathione and peroxiredoxins, making plausible the possibility that other thiol proteins could also be a target for oxidation. The protein disulfide isomerase is a dithiol-disulfide oxidoreductase and chaperone, located mainly in the endoplasmic reticulum, where it is involved in the correct folding of nascent proteins. Also, a pool of these enzymes has been identified in cell surface and the extracellular (secreted) milieu and appears to be important in vascular events, such as platelet activation and aggregation, thrombosis and vascular remodeling. First, it was investigated whether urate hydroperoxide was capable of oxidizing PDI. By the DTNB assay, it was found that the free thiols of the protein were consumed after reaction with the peroxide and then, by nLC-MS / MS, the active redox cysteine residues were identified as the main oxidation targets. Although no modifications other than disulfides have been found, hydroperoxide treatment has been shown to promote protein aggregation and inactivation. Subsequent studies involved an endothelial cell line (HUVECs). Preliminary cytotoxicity analyzes (detection of lactate dehydrogenase enzyme activity in the supernatant and incorporation of fluorescent probes into DNA) have shown that treatments with concentrations up to 400 μ M are not lethal to cells in culture. Then, using alkylating agents impermeable to the cell membrane, urate hydroperoxide was shown to oxidize not only PDI but also total thiol proteins expressed on HUVECs surface. Wound healing experiments were performed to evaluate cell migration after treatment with urate hydroperoxide, but no difference was observed. However, incubation of the cells with the oxidizing agents urate hydroperoxide and diamide, inhibitors of both PDI and integrin and a thiol alkylator, resulted, at least for the first thirty minutes, in reduced cell adhesion to fibronectin. In addition, cells treated with urate hydroperoxide became more sensitive to detachment from the culture dish and exhibited alterations in morphology. Treatment with the peroxide also affected the redox homeostasis of the HUVECs, observed by a decrease in the GSH / GSSG ratio. Finally, indirect evidence was presented that uric acid is a substrate of peroxidase, a heme peroxidase abundantly expressed in the vascular system. First, with the Amplex Red assay it was observed that the presence of uric acid in the reaction mixture resulted in lower oxidation rates of the reagent. Then, by LC-MS / MS, hydroxyisourate, which is the alcohol derived from urate hydroperoxide decomposition, was also identified in samples containing uric acid. Taken together, the data presented should contribute to a better understanding of the

involvement of urate hydroperoxide in vascular oxidative processes - especially protein oxidation - that may be one mechanism associated to disturbances in endothelial function and vascular homeostasis.

Key words: urate hydroperoxide, cell surface protein disulfide isomerase, oxidation, HUVEC.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Concentração de hidroperóxido de urato na amostra tamponada e não-tamponada	68
Tabela 2 -	nLC-MS/MS dos peptídeos modificados encontrados em amostras de PDI incubadas com veículo	71
Tabela 3 -	nLC-MS/MS dos peptídeos modificados encontrados em amostras de PDI tratadas com HOOU (40 μ M)	74
Tabela A1 -	nLC-MS/MS de todos os peptídeos encontrados em amostras de PDI incubadas com veículo	122
Tabela A2 -	nLC-MS/MS de todos os peptídeos encontrados em amostras de PDI tratadas com HOOU (40 μ M)	125

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Metabolismo de purinas e geração do ácido úrico	23
Figura 2.	Mecanismos de oxidação do ácido úrico	28
Figura 3.	Ciclo catalítico clorinante e peroxidásico da mieloperoxidase	29
Figura 4.	Modificações oxidativas em cisteínas após reação com hidroperóxidos	35
Figura 5.	Estrutura esquemática da PDI	37
Figura 6.	Estrutura terciária da PDI	38
Figura 7.	Reações de troca ditiol-dissulfeto catalisadas pela PDI	39
Figura 8.	Reação com hidroperóxido de urato promove oxidação dos tióis livres da proteína dissulfeto isomerase.....	69
Figura 9.	Identificação dos peptídeos contendo cisteínas catalíticas alquiladas da proteína dissulfeto isomerase incubada com veículo	72
Figura 10.	Identificação dos peptídeos contendo cisteínas catalíticas oxidadas da proteína dissulfeto isomerase incubada com hidroperóxido de urato	75
Figura 11.	Quantificação relativa dos peptídeos alquilados e oxidados da proteína dissulfeto isomerase incubada com veículo e hidroperóxido de urato	76
Figura 12.	Reação com hidroperóxido de urato promove agregação e inativação da proteína dissulfeto isomerase	79
Figura 13.	Viabilidade celular após tratamento com hidroperóxido de urato	83
Figura 14.	Viabilidade celular após tratamento com ácido úrico	84
Figura 15.	Hidroperóxido de urato promove oxidação da proteína dissulfeto isomerase da superfície celular	86
Figura 16.	Hidroperóxido de urato não promove oxidação da subunidade β 1 de integrinas	88
Figura 17.	Tióis extracelulares de HUVECs cultivadas por 24 horas estão majoritariamente oxidados	89

Figura 18.	Tióis extracelulares de HUVECs cultivadas por 24 h sobre fibronectina estão majoritariamente oxidados	90
Figura 19.	Hidroperóxido de urato promove oxidação de tióis de superfície em HUVECs	91
Figura 20.	Hidroperóxido de urato promove oxidação de tióis de superfície em HUVECs pré-tratadas com TCEP	93
Figura 21.	Hidroperóxido de urato altera a razão glutatona oxidada/reduzida de HUVECs	96
Figura 22.	Hidroperóxido de urato não interfere na migração de HUVECs	99
Figura 23.	Hidroperóxido de urato inibe a adesão de HUVECs sobre fibronectina	101
Figura 24.	Hidroperóxido de urato favorece o descolamento de HUVECs da placa de cultivo	103
Figura 25.	Ácido úrico compete com <i>Amplex Red</i> como substrato para oxidação pela peroxidase do sobrenadante de cultura de HUVECs	105
Figura 26.	Detecção do hidroxissourato no sobrenadante de HUVECs incubadas com ácido úrico e peróxido de hidrogênio	107
Figura B1.	Caracterização do peptídeo ³⁸⁶ KNVFVEFYAPWCRGHC _R K ⁴⁰¹ contendo cisteínas catalíticas alquiladas	128
Figura B2.	Caracterização do peptídeo ³⁸⁶ KNVFVEFYAPWCGHCK ⁴⁰¹ – 2H contendo cisteínas catalíticas alquiladas	129

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AU	Ácido úrico
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
DCV	Doença cardiovascular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	5,5-ditiobis(ácido 2-nitrobenzóico)
DTPA	Ácido dietilenotriamina penta acético
DTT	Ditiotreitol
FOX	<i>Ferrous Oxidation Xylenol Orange</i>
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GPX	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
HO	<i>Hoechst</i>
HOU	Hidroxiisourato
HOOU	Hidroperóxido de urato
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cell</i>
IAM	Iodoacetamida
IMF	Intensidade média de fluorescência
LDH	Lactato desidrogenase
LDL	lipoproteína de baixa densidade
LPO	Lactoperoxidase
MEC	Matriz extracelular
MPB	N-(3-maleimidilpropionil) biocitina
MPO	Mieloperoxidase
NAC	N-acetil-cisteína
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
PBS	Tampão fosfato salino
pCMBS	p-cloromercurobenzenosulfonato
PDI	Proteína dissulfeto isomerase
PDI _{oxi}	Proteína dissulfeto isomerase oxidada
PDI _{red}	Proteína dissulfeto isomerase reduzida
PDI _{sc}	Proteína dissulfeto isomerase da superfície celular
PI	Iodeto de propídio
PRX	Peroxirredoxina

PXDN	Peroxidasina
RE	Retículo endoplasmático
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
TCEP	<i>Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride</i>
TIC	<i>Total Ion Chromatogram</i>
XIC	<i>Extracted Ion Chromatogram</i>
XO	Xantina oxidase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Doenças cardiovasculares: fatores de risco, inflamação e estresse oxidativo	19
1.2	O ácido úrico	21
1.2.1	<i>Dualidade do ácido úrico</i>	24
1.2.2	<i>Oxidação do ácido úrico</i>	26
1.2.3	<i>O ácido úrico como substrato para heme peroxidases</i>	28
1.3	Importância fisiológica do hidroperóxido de urato	31
1.4	Reação de hidroperóxidos com resíduos de cisteína	33
1.5	Proteína dissulfeto isomerase	36
1.5.1	<i>Propriedades estruturais e bioquímicas</i>	36
1.5.2	<i>A PDI como uma enzima e uma chaperona</i>	38
1.5.3	<i>A PDI fora do retículo endoplasmático</i>	41
1.6	Hipótese	45
2	OBJETIVOS	46
2.1	Objetivo geral	46
2.1	Objetivos específicos	46
3	MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1	Reagentes e anticorpos	47
3.2	Obtenção do hidroperóxido de urato	47
3.2.2	<i>Síntese química</i>	47
3.2.3	<i>Separação cromatográfica</i>	48
3.2.4	<i>Quantificação</i>	48
3.3	Avaliação da estabilidade do hidroperóxido de urato	49
3.4	Obtenção da proteína dissulfeto isomerase recombinante	49
3.4.1	<i>Expressão e purificação</i>	49
3.4.2	<i>Quantificação</i>	50
3.4.3	<i>Redução</i>	50
3.5	Reação entre proteína dissulfeto isomerase recombinante e hidroperóxido de urato	51
3.6	Análise de modificações oxidativas da proteína dissulfeto isomerase por nLC-MS/MS	51
3.6.1	<i>Preparo das amostras</i>	52
3.6.2	<i>Metodologia nLC-MS/MS</i>	53

3.6.3	<i>Aquisição, processamento e análise dos dados</i>	53
3.7	Avaliação da agregação da proteína dissulfeto isomerase	54
3.8	Avaliação da atividade redutase da proteína dissulfeto isomerase	54
3.9	Cultura de células	55
3.10	Avaliação da viabilidade celular	55
3.10.1	<i>Atividade da enzima lactato desidrogenase</i>	55
3.10.2	<i>Marcação nuclear com sondas fluorescentes</i>	56
3.11	Deteção de tióis reduzidos da proteína dissulfeto isomerase e subunidade β1 de integrina presentes na superfície celular	56
3.12	Análise do estado redox de tióis de superfície por microscopia de fluorescência	58
3.13	Quantificação simultânea da glutatona reduzida e oxidada	59
3.13.1	<i>Preparo das amostras</i>	60
3.13.2	<i>Metodologia LC-MS/MS</i>	60
3.14	Ensaio funcionais	61
3.14.1	<i>Avaliação da migração celular</i>	61
3.14.2	<i>Avaliação da capacidade de adesão das HUVECs sobre a fibronectina</i>	62
3.14.3	<i>Avaliação do descolamento de HUVECs</i>	63
3.15	Avaliação do ácido úrico como substrato para peroxidases do sobrenadante de HUVECs	63
3.15.1	<i>Ensaio de atividade enzimática</i>	63
3.15.2	<i>Deteção do hidroxissourato</i>	64
3.16	Análises estatísticas	65
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
4.1	Avaliação da estabilidade do hidroperóxido de urato gerado pela síntese química	67
4.2	Oxidação da proteína dissulfeto isomerase recombinante após tratamento com hidroperóxido de urato	68
4.3	Agregação e inativação da proteína dissulfeto isomerase recombinante após tratamento com hidroperóxido de urato	78
4.4	Tratamento com hidroperóxido de urato não é citotóxico para HUVECs	81
4.5	Oxidação da proteína dissulfeto isomerase de superfície pelo hidroperóxido de urato	85
4.6	Oxidação de tióis de superfície totais pelo hidroperóxido de urato	89

4.7	Avaliação da razão GSH/GSSG de HUVECs tratadas com hidroperóxido de urato	95
4.8	Avaliação de propriedades funcionais de HUVECs expostas ao hidroperóxido de urato	97
<i>4.8.1</i>	<i>Avaliação da capacidade de migração</i>	<i>97</i>
<i>4.8.2</i>	<i>Avaliação das propriedades adesivas</i>	<i>100</i>
4.9	Investigação do ácido úrico como substrato da peroxidase	105
5	CONCLUSÃO	108
	REFERÊNCIAS	111
	APÊNDICES	122

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças cardiovasculares: fatores de risco, inflamação e estresse oxidativo

As doenças cardiovasculares (DCVs) são um grupo de desordens do coração e dos vasos sanguíneos e incluem a doença arterial coronariana, doenças cerebrovasculares, doença arterial periférica e aneurisma da aorta abdominal, dentre algumas outras condições. Segundo os dados mais recentes da Organização Mundial de Saúde, quase 18 milhões de pessoas morrem a cada ano em decorrência de DCVs – esse número representa expressivos 31% do total de óbito. Dessa totalidade, aproximadamente três quartos ocorrem em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, como o Brasil (WHO, 2019). É indiscutível, portanto, que juntamente com medidas preventivas, sejam realizadas intensas pesquisas na área a fim de contribuir para a elucidação dos mecanismos biológicos de gênese e progressão dessas doenças, descoberta de novos alvos terapêuticos e desenvolvimento de drogas mais eficazes.

Tabagismo, obesidade, hipertensão, diabetes e hipercolesterolemia são reconhecidos como fatores de risco clássicos para o desenvolvimento de DCVs (WHO, 2019). A associação causal entre ácido úrico (AU) e DCV, embora sinalizada já no final do século 19 (DAVIS, 1897), permaneceu ignorada por mais de cinquenta anos, quando duas publicações retomaram essa importante questão (CANNON et al., 1966; GERTLER; GARN; LEVINE, 1951). Ainda é controverso se a hiperuricemia pode ser considerada um fator de risco independente, ou se meramente reforça os outros já referidos, mas, de qualquer forma, inúmeros estudos epidemiológicos reportaram a relação entre os níveis de ácido úrico plasmáticos e diversas condições cardiovasculares. Muitos desses dados foram revisados de forma bastante completa

por Feig e colaboradores (2008) e outros estudos posteriores a essa compilação também já foram publicados (KUWABARA et al., 2017; LI et al., 2014; TAMARIZ et al., 2011). É importante ressaltar também que a relação entre AU e DCV foi observada não somente em situações de hiperuricemia (concentração de AU superior a 360 μM e 420 μM em mulheres e homens, respectivamente) mas também naquelas em que os níveis de AU se enquadravam dentro da normalidade (200 - 400 μM) (FEIG; JOHNSON, 2003; NAKAGAWA et al., 2005; NISKANEN et al., 2004; SANTANA et al., 2018).

Sob um ponto de vista mais mecanístico, sabe-se que o estado inflamado da vasculatura é um importante componente da patofisiologia de DCVs, especialmente por favorecer processos aterogênicos. Explicações mais detalhadas iriam além do proposto pelo presente trabalho, mas de forma bastante sucinta, sabe-se que a aterosclerose é um evento complexo, cujo início, progressão e complicações envolvem lipoproteínas modificadas, componentes da parede vascular e células e mediadores do sistema imune (HANSSON; ROBERTSON; SODERBERG-NAUCLÉR, 2006). A relação entre inflamação e aterosclerose é intensamente documentada na literatura e as evidências passam por modelos experimentais, análises histopatológicas de tecidos humanos e de biomarcadores sistêmicos, até investigações epidemiológicas (GOLIA et al., 2014).

Além da inflamação, também tem sido extensamente investigado o papel causal do estresse oxidativo no desenvolvimento de DCVs. Diversos sistemas enzimáticos, como nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, óxido nítrico sintase endotelial, enzimas da cadeia respiratória, monooxigenases e xantina oxidase (XO), são diferencialmente localizados e expressos e contribuem para a geração de oxidantes em células da parede dos vasos, como as células

endoteliais e as células musculares lisas. A geração fisiológica principalmente de radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico (NO) é fundamental para a homeostase vascular, pois através da sinalização redox modulam a função e diferenciação de células vasculares e, em última instância, processos de sobrevivência e morte (IRANI, 2000; SIES; BERNDT; JONES, 2017). No entanto, a produção excessiva de oxidantes pode culminar em significativa alteração redox e estresse oxidativo, os quais resultam em dano celular e disfunção vascular (GUZIK; TOUYZ, 2017). Espécies oxidantes podem contribuir para aterogênese de diversas formas, incluindo a promoção da peroxidação lipídica, a ativação de fatores de transcrição redox sensíveis, o estímulo da expressão de genes pró-inflamatórios, a oxidação de proteínas e danos ao DNA mitocondrial e nuclear (ELAHI; KONG; MATATA, 2009; MADAMANCHI; RUNGE, 2013; NIKI, 2011; STOCKER; KEANEY, 2004).

Na verdade, os aspectos retratados até aqui – estresse metabólico, estresse oxidativo e inflamação estão inter-relacionados e compõem um *loop* causa-efeito, cuja consequência maior é o estabelecimento de patologias vasculares.

1.2 O ácido úrico

O AU é produto da degradação dos nucleosídeos de purina adenosina e guanosina, que após fosforólise e desaminação são convertidos a xantina e hipoxantina, que por sua vez, são oxidadas ao AU pela catálise da xantina oxidoreductase (figura 1). A xantina oxidoreductase atua como uma desidrogenase quando o acceptor final dos elétrons é a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) (NELSON; MICHAEL, 2011). Alterações estruturais na enzima, como a oxidação de dois resíduos de cisteína e/ou proteólise sítio específica, convertem-na em uma

oxidase. Como o aceptor final de elétrons da XO é o oxigênio, a catálise gera como subproduto o $O_2^{\bullet-}$ (figura 1 B). Dessa forma, em situações em que há um aumento do estado oxidado dos tecidos, a biossíntese do AU está associada à formação de superóxido (KUWABARA et al., 2003).

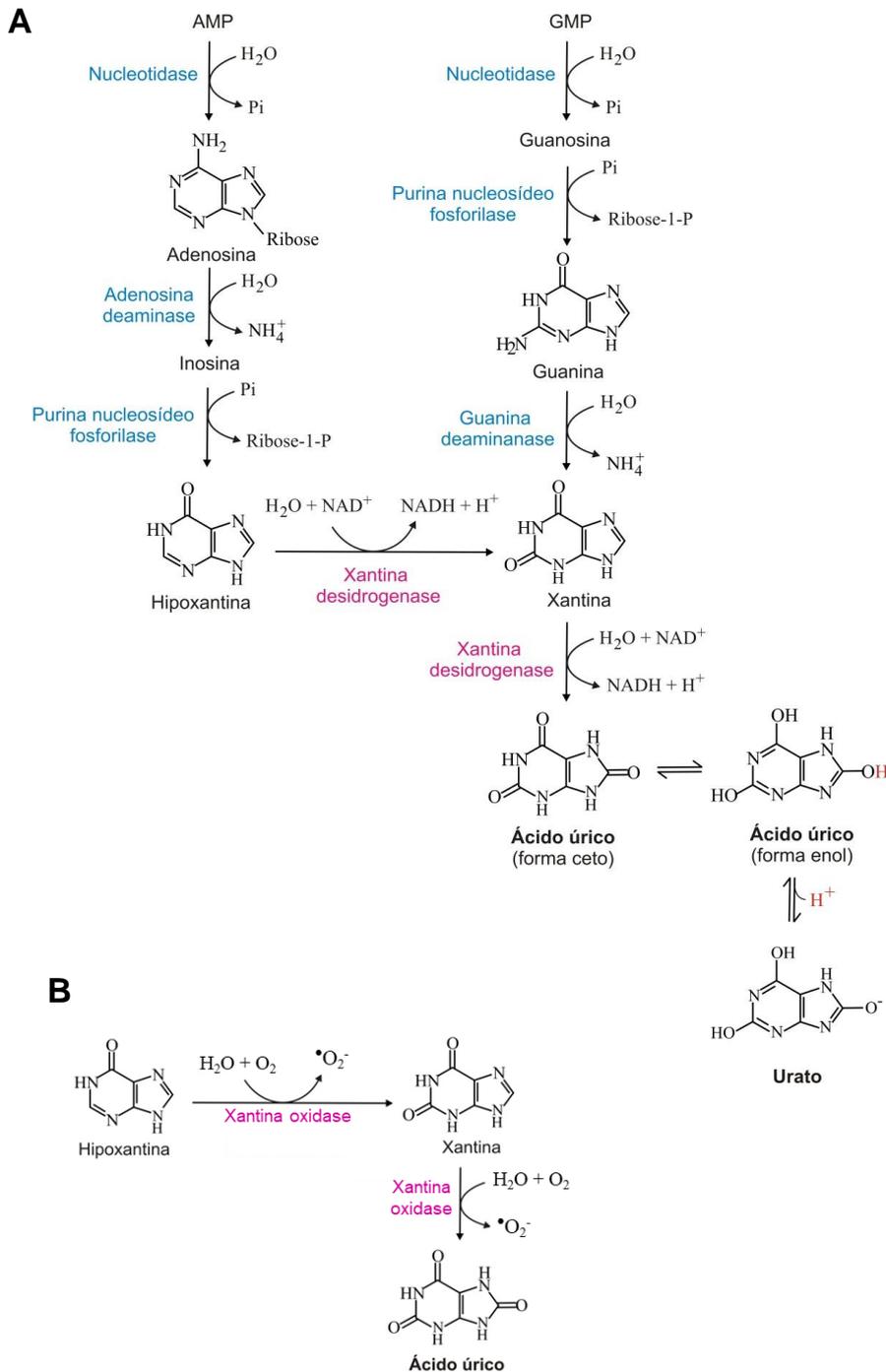


Figura 1. Metabolismo de purinas e geração do ácido úrico. (A) O AU é formado enzimaticamente a partir de purinas provenientes do ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA), guanosina trifosfato (GTP) e adenina trifosfato (ATP). AMP: adenosina monofosfato; GMP: guanosina monofosfato; NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo; NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido. (B) Catálise da xantina oxidase. (Modificado de PATRICIO, 2014).

Por ser um ácido orgânico fraco (pKa 5,4), tanto em fluidos biológicos como no citoplasma celular, o AU apresenta-se majoritariamente na forma de ânion urato (figura 1) (SIMIC; JOVANOVIC, 1989). A homeostase do urato depende do balanço entre ingestão de purinas, biossíntese, secreção e reabsorção de urato nos túbulos renais e sua excreção no intestino. Todos esses eventos dependem de transportadores especializados (*organic anion transportes*: URAT1, OAT1, OAT3, OAT4, OAT10, MRP4 e ABCG2) codificados pela família de genes SLC22A (SO; THORENS, 2010). Concentrações plasmáticas de AU superiores a 420 µM configuram hiperuricemia, condição que pode ser decorrente da ingestão excessiva de alimentos ricos em purinas e álcool (CHOI et al., 2004). Ainda assim, diferenças genéticas em *loci* que contém os genes da família SLC22A que resultam, portanto, em alteração da regulação da síntese e excreção renal do AU parecem ser mais relevantes na modulação dos níveis plasmáticos desse metabólito (MANDAL; MOUNT, 2015; SO; THORENS, 2010). Alterações em enzimas da via do metabolismo das purinas como hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPRT, da via de salvamento das purinas) e 5-fosforibosil-1-pirofosfato (PRPP) sintetase (da síntese *de novo* das purinas) também foram associadas à hiperuricemia (AHMED et al., 1999; CHOI et al., 2005).

Em humanos e primatas superiores o AU é o produto final do metabolismo de purinas, contudo, em outros mamíferos, ele é ainda degradado a alantoína pela enzima uricase (NELSON; MICHAEL, 2011). Durante a evolução dos hominídeos, o gene que codifica a uricase foi silenciado e a consequência direta desse evento foi o

acúmulo de AU. Em humanos, os níveis plasmáticos variam entre 200 e 400 μM , muito superiores àqueles encontrados, por exemplo, em camundongos (30 – 50 μM). Em virtude da ação antioxidante, as concentrações plasmáticas elevadas de AU devem ter representado vantagem seletiva no processo evolutivo (ODA et al., 2002). Por outro lado, evidências na literatura, também associam o AU a eventos biológicos deletérios, dando fundamentação aos achados epidemiológicos apresentados anteriormente.

1.2.1 Dualidade do ácido úrico

O carácter antioxidante do urato advém do seu baixo potencial de redução ($E^\circ = 0,59 \text{ V}$, pH 7, $\text{HU}^{\bullet-}$, $\text{H}^+/\text{UH}^{2-}$) e consequente facilidade em doar de elétrons. Sua capacidade antioxidante é, inclusive, comparável àquela do ácido ascórbico (AMES et al., 1981; BECKER, 1993; SIMIC; JOVANOVIC, 1989). De fato, já foi observado que o AU reage com o oxigênio singlete, radicais peroxila (ROO^\bullet) e hidroxila ($^\bullet\text{OH}$), radicais livres de proteínas, peroxinitrito (ONOOH e ONOO^-) e ácido hipocloroso (HOCl), sendo também capaz de quelar metais de transição (AMES et al., 1981; DOMAZOU; ZHU; KOPPENOL, 2012; GROOTVELD; HALLIWEL; MOORHOUSE, 1987; WAYNER et al., 1987). Essas reações têm consequências biológicas importantes. A neutralização do ONOO^- , por exemplo, inibe a nitrosação de proteínas, a peroxidação de proteínas e lipídios e o bloqueio de tetraidrobiopterina (BH_4), que é um cofator necessário à atividade da oxido nítrico sintase (NOS). Além disso, a presença do AU previne a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) pelo cobre II, reação que tem implicações no desenvolvimento da aterosclerose (AMES et al., 1981; KUZKAYA et al., 2005; MURAOKA; MIURA, 2003; WHITEMAN; KETSAWATSAKUL; HALLIWELL, 2002).

A ação antioxidante do urato parece ser particularmente importante no sistema nervoso central (KUTZING; FIRESTEIN, 2007). Estudos epidemiológicos sugerem a relação entre baixos níveis de urato e esclerose múltipla, sendo que o tratamento com AU melhora o quadro de camundongos com encefalomielite autoimune (HOOPER et al., 2000; PENG et al., 2008; TONCEV et al., 2002). O AU também parece ter efeito neuroprotetor em outras patologias neurodegenerativas, tais como Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson e esclerose lateral amiotrófica, em que baixos níveis de urato foram associados a maior estresse oxidativo e pior prognóstico (PAGANONI; SCHWARZSCHILD, 2017).

Há que se observar, todavia, que dependendo do microambiente, o AU pode se tornar um agente pro-oxidante. A reação do AU com o ONOO^- gera o radical aminocarbonila, capaz de amplificar a peroxidação lipídica em partículas de LDL (SANTOS; ANJOS; AUGUSTO, 1999). Adutos de radicais livres oriundos da oxidação do AU pelo ONOO^- foram detectados no plasma (FERRER-SUETA et al., 2011). Também foi observado que o AU favorece reações de quebra do DNA ao promover a redução do cobre II a cobre I, além de potencializar a inativação oxidativa das enzimas alfa-1-antiproteínase e álcool desidrogenase (ARUOMA; HALLIWELL, 1989; KITTRIDGE; WILLSON, 1984; SHAMSI; HADI, 1995).

O AU é considerado um padrão molecular associado ao dano (DAMP) (SCHAEFER, 2014; SHI; EVANS; ROCK, 2003). Além dos efeitos pro-oxidantes supracitados, concentrações elevadas de AU estão associadas ao desenvolvimento de patologias como a gota, em que há deposição de cristais de urato monossódico nas articulações (CHOI et al., 2005). Os mecanismos moleculares por trás dessa condição envolvem a ativação do complexo de inflamassoma *Nod Like Receptor* (NLR) P3 por cristais de urato e a consequente maturação da interleucina-1 β que

tem caráter pró-inflamatório (MARTINON et al., 2006). É interessante notar que a ativação desse inflamassoma também foi verificada na presença do AU solúvel (BRAGA et al., 2017). Sensibilização de células mononucleares do sangue periférico, recrutamento de neutrófilos, secreção aumentada de $O_2^{\bullet-}$ pela NADPH oxidase e formação de *neutrophil extracellular traps* (NETs) são fenômenos que somam para a constatação de que, mesmo na ausência de cristais, o AU é capaz de induzir inflamação (ARAI et al., 2014; CRISAN et al., 2016; KONO et al., 2010; THOMAS, 1992).

Além dos efeitos pró-oxidantes e pró-inflamatórios já citados, expõem mais claramente o envolvimento do AU na perturbação da homeostase vascular: a associação desse metabólito com disfunção endotelial (provocada, dentre outros motivos, pela menor biodisponibilidade de NO), ativação de plaquetas circulantes, indução da proliferação e produção da quimiocina MCP-1 em células musculares lisas vasculares e produção de quimiocinas e moléculas de adesão em células endoteliais (CORRY et al., 2008; KANELLIS et al., 2003; KHOSLA et al., 2005; LIANG et al., 2015; MUSTARD et al., 1963).

1.2.2 Oxidação do ácido úrico

O aumento do estresse oxidativo e exacerbação da inflamação causado pelo AU podem explicar o dano tecidual e, em última instância, a correlação clínica positiva entre o aumento nos níveis de AU e risco de desenvolvimento de DCVs. A interpretação do mecanismo de reação do AU (figura 2) é, portanto, importante e fornece boas pistas dos mecanismos moleculares pelos quais ele exerce seus efeitos.

A abstração de dois elétrons do urato por oxidantes como o HOCl e o oxigênio singlete produz desidrourato, que é hidratado a hidroxisourato, que, por sua vez, é decomposto ao longo de quatro reações sequenciais até alantoína. Nessa via de oxidação não há formação de radicais livres intermediários e a alantoína é considerada inerte (IIDA et al., 2017; KAUR; HALLIWELL, 1990; VOLK; YOST; BRAJTER-TOTH, 1989). O AU pode também ser oxidado por um elétron em reação com radicais livres, como o $\cdot\text{OH}$, e em oxidação por heme peroxidases (CANELLAKIS; TUTTLE; COHEN, 1955; MAPLES; MASON, 1988). Nesses casos, é gerado o radical livre de urato, altamente reativo. Se altas taxas desse radical são formadas, é possível a reação de dois deles entre si e, por dismutação, o urato é formado novamente. Por outro lado, o radical de urato pode abstrair um elétron do ascorbato, regenerando AU e formando radical ascorbila, que se decompõe a desidroascorbato. A abstração de um elétron de outras biomoléculas pelo radical de urato pode desencadear reações em cadeia de radicais livres. Na presença de outros radicais livres pode acontecer tanto a transferência de elétrons como reações de adição. Por exemplo, já foi observado que a reação com o NO e o radical dióxido de nitrogênio gera produtos nitrados de AU (SKINNER et al., 1998; SUZUKI; YAMAMOTO; PFLEIDERER, 2010). O radical de urato pode ainda reagir muito rapidamente com o $\text{O}_2^{\cdot-}$ ($k = 8 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), sendo que a transferência de elétrons deste para aquele, restaura o oxigênio molecular e o AU (SANTUS et al., 2001). Alternativamente, a combinação desses radicais é possível e, nesse caso, há a formação do hidroperóxido urato (HOOU) (MEOTTI et al., 2011).

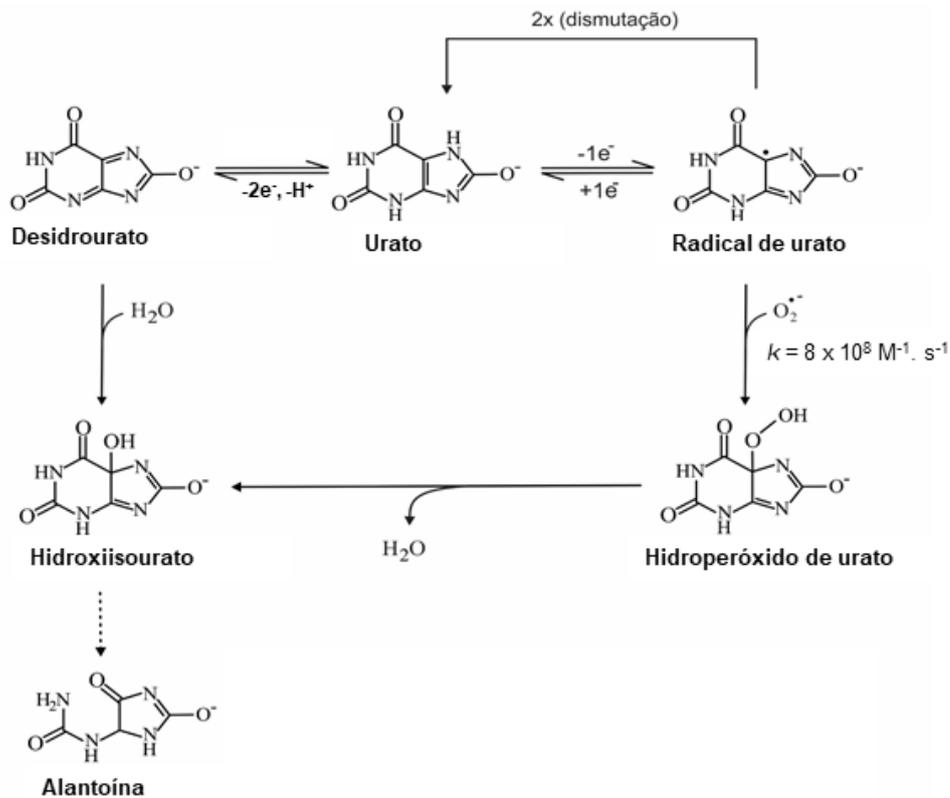


Figura 2. Mecanismos de oxidação do ácido úrico. As setas contínuas representam reações diretas e a seta pontilhada via de degradação indireta. (Modificado de PATRICIO, 2014).

1.2.3 O ácido úrico como substrato para heme peroxidases

A mieloperoxidase (MPO) é uma heme proteína abundante em grânulos azurofílicos de neutrófilos e durante o *burst* oxidativo catalisa a produção HOCl, um potente bactericida. Trata-se da atividade clorinante da MPO e envolve a reação da enzima nativa (Fe^{III}) com o H_2O_2 para formar um intermediário radicalar oxiferrila ($^+\text{Fe}^{\text{IV}}\text{O}$), denominado Composto I, que por sua vez, pode reagir com cloreto (Cl^-). Dessa forma, é gerado o HOCl e a enzima é regenerada à sua forma férrica (Fe^{III}) (figura 3). A MPO também tem atividade peroxidásica e, nesse caso, o composto I é reduzido por um outro substrato a Composto II ($\text{Fe}^{\text{IV}}\text{O}$), que precisa ainda abstrair um segundo elétron de um segundo substrato para regenerar a forma nativa da enzima (figura 3) (KLEBANOFF et al., 2013). Substratos endógenos alternativos ao

Cl⁻ incluem o ascorbato, serotonina, tirosina e também o AU (CANELLAKIS; TUTTLE; COHEN, 1955; MARQUEZ; DUNFORD, 1995; MARQUEZ; DUNFORD; VAN WART, 1990; XIMENES et al., 2009).

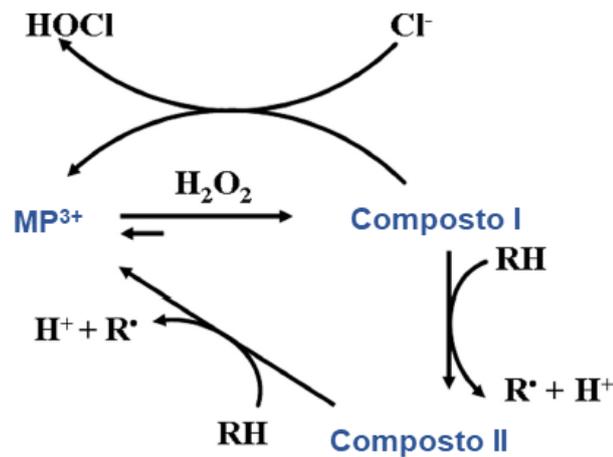


Figura 3. Ciclo catalítico clorinante e peroxidásico da mieloperoxidase. MP³⁺ é MPO férrica. RH representa substratos orgânicos como tirosina, ascorbato e urato. R• é o radical gerado após oxidação do substrato RH. Modificado de Meotti et al., 2011

A atividade da MPO está, usualmente, restrita ao microambiente de fagossomas, em que a toxicidade do HOCl é refletida apenas nas bactérias fagocitadas, sem atingir células do hospedeiro. Contudo, em situações de fagocitose frustrada, de estimulação dos neutrófilos por citocinas inflamatórias ou morte necrótica dessas células, a MPO vaza para o meio extracelular. Uma vez fora dos neutrófilos, essa heme peroxidase pode se ligar a moléculas carregadas negativamente, como as presentes em células endoteliais, e os produtos reativos da catálise podem causar dano oxidativo às proteínas e células do leito vascular (JERKE et al., 2013).

Embora a reação *in vitro* entre AU e MPO tenha sido demonstrada já em meados da década de cinquenta apenas recentemente a relevância fisiológica dessa

reação foi documentada (CANELLAKIS; TUTTLE; COHEN, 1955). Meotti e colaboradores (2011) mostraram, então, que o AU é oxidado pelo Composto I e Composto II da enzima com constantes de velocidade de $4,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e $1,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, respectivamente. Ainda que essas constantes sejam similares às observadas na oxidação do ascorbato, tirosina e serotonina, a abundância do AU em relação aos outros substratos sugerem-no como substrato preferencial da MPO no leite vascular. A oxidação do AU promovida pela enzima gera radical livre de urato e, na presença de um sistema gerador de $\text{O}_2^{\bullet-}$ é formado também o oxidante HOOU (MEOTTI et al., 2011). Considerando que $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , MPO e AU estão abundantemente presentes em ambientes inflamatórios, como por exemplo o verificado ao longo do desenvolvimento da aterosclerose, é provável que tanto radical livre de urato como HOOU sejam produzidos de forma relevante nesse microambiente.

O AU é também substrato da lactoperoxidase (LPO), expressa em fluidos como saliva, lágrimas e leite (IHALIN; LOIMARANTA; TENOVUO, 2006). Sua função fisiológica principal é a oxidação do tiocianato (SCN^-) ao composto bactericida hipotiocianito ($^-\text{OSCN}$), de forma que essa enzima, à semelhança da MPO, tem importante papel na defesa inata (FURTMÜLLER et al., 2002). Embora o AU seja um substrato relevante (constantes de velocidade de $1,1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e $8,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para o Composto I e Composto II, respectivamente) (SEIDEL et al., 2014), a formação de radical de urato e HOOU por essa via certamente tem pouco impacto no contexto vascular.

1.3 Importância fisiológica do hidroperóxido de urato

É plausível que a atividade biológica do HOOU seja um dos mecanismos de lesão tecidual provocados pela presença do AU, mas, ainda assim, essa questão permanece pouco explorada.

Patricio e colaboradores (2015) avaliaram a reatividade do HOOU frente a diferentes aminoácidos e detectaram reação preferencial com aqueles que contêm enxofre - metionina e cisteína. Nesses casos, foi observado tanto o consumo do oxidante quanto a formação dos produtos sulfóxido de metionina e cistina.

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo abundante no meio intracelular (5-10 mM), sendo a principal responsável pela manutenção do ambiente redutor. Foi mostrado que o HOOU reage diretamente com GSH, resultando na formação do dímero de glutathiona oxidada (GSSG), sendo a constante de velocidade dessa reação ($13,7 \pm 0,8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) superior à observada na reação com H_2O_2 ($0,87 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) (PATRICIO et al., 2015; WINTERBOURN; METODIEWA, 1999).

Considerando que tióis em algumas proteínas apresentam maior reatividade que aqueles da GSH, estas proteínas certamente estão mais sujeitas à oxidação por esse peróxido orgânico do que a própria GSH. Nesse sentido, já foi observado que o HOOU reage com a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), enzima que catalisa umas das reações da glicólise e que também está envolvida em muitos outros processos celulares. A incubação da enzima com um sistema enzimático gerador de HOOU - contendo LPO, XO e hipoxantina - resultou em menor detecção de tióis livres (a GAPDH tem quatro subunidades, cada uma contendo 4 resíduos de cisteína) e também em perda de atividade enzimática (TURNER et al., 2018).

Além da GAPDH, foi observado que as peroxirredoxinas (PRXs) 1 e 2 também são alvos do HOOU. Tratam-se de tiól-peroxidases expressas em grandes

quantidades no citosol, capazes de reduzir o H_2O_2 a água com velocidade limitada apenas pela difusão (RHEE, 2016). Carvalho *et al.* (2017) observaram que o HOOU reage com as PRXs 1 e 2 com constantes de velocidade de $4,9 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e $2,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, respectivamente, de forma que a produção desse peróxido em situações inflamatórias não apenas poderia afetar o balanço redox da célula, mas também a própria sinalização redox em que estão envolvidas as enzimas (WINTERBOURN; HAMPTON, 2015). A incubação de eritrócitos com HOOU promoveu a oxidação da PRX 2 em níveis muito similares ao observado para o H_2O_2 , sugerindo que essa proteína é mesmo um alvo celular (CARVALHO *et al.*, 2017).

No contexto extracelular, é importante destacar a ação do HOOU sobre a albumina humana, a proteína mais abundante do plasma (0,6 mM) e que está envolvida em processos de manutenção da pressão osmótica e transporte de hormônios e ácidos graxos. Além disso, também é atribuído a ela um papel antioxidante, já que reage com $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$, ONOO^- e hidroperóxidos lipídicos (ALVAREZ *et al.*, 1999; CARBALLAL *et al.*, 2003). Dos 35 resíduos de cisteínas presentes na albumina, apenas 1 (Cys³⁴) encontra-se na forma livre, sendo todos os outros envolvidos em pontes dissulfeto estruturais (BONANATA *et al.*, 2017; CARBALLAL *et al.*, 2003). Estudos feitos com albumina bovina, que tem grande similaridade estrutural com a humana, mostraram que a incubação do HOOU com a proteína, tanto na forma nativa como na forma reduzida, resultou em consumo de tióis livres. A constante de segunda ordem da reação foi calculada em $20 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, sendo superior à observada na reação da albumina humana com o H_2O_2 ($2,2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) (CARVALHO, 2017). Ainda que resíduos tiólicos sejam alvos preferenciais, foi observado que aminas também podem ser oxidadas pelo HOOU. Em publicação

recente, foi verificada a formação de adutos entre esse peróxido e resíduos de lisina, não só na albumina isolada, mas também em amostras de plasma humano. Esse achado é notório e sugere a albumina como um biomarcador em processos oxidativos vasculares que envolvem o AU (TURNER et al., 2018).

Também já foi verificado que HOOU reage com a proteína dissulfeto isomerase (PDI) com uma constante de segunda ordem igual a $6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (PATRICIO, 2014). Embora essa proteína seja abundante no retículo endoplasmático (RE), a oxidação da fração extracelular deve ter mais relevância devido à formação extracelular do hidroperóxido de urato. Em seção subsequente aspectos relacionados às propriedades estruturais e biológicas dessas proteínas serão melhor detalhados, já que a caracterização da reação entre PDI e HOOU e alguns efeitos biológicos decorrentes disso foram alvo de estudo do presente trabalho.

Finalmente, em recente publicação, Silva *et. al.* (2018) verificaram de forma pioneira a presença do HOOU em células de linhagem HL-60 diferenciadas e também em neutrófilos purificados do sangue periférico após ativação com forbol-miristato-acetato (PMA). Também nessas células foi verificado um decréscimo na razão glutatona reduzida/oxidada (GSH/GSSG), indicando que a produção do HOOU resulta, de fato, em desbalanço redox.

1.4 Reação de hidroperóxidos com resíduos de cisteína

Em cisteínas, o átomo de enxofre está completamente reduzido (estado de oxidação de -2). Em virtude do baixo potencial de redução em proteínas ($E^{o'}$ -0,27 a -0,125 V) o -S^- reage facilmente com uma ampla variedade de oxidantes, condição que tem implicações químicas e biológicas importantes (REDDIE; CARROLL, 2008).

A reação com uma espécie oxidante radicalar ocorre com transferência de um elétron e formação do radical tiila ($\cdot\text{S}$). Por outro lado, na presença de H_2O_2 , algum peróxido orgânico ou mesmo peroxinitrito, a reação de oxidação ocorre por dois elétrons e é formado o ácido sulfênico ($-\text{SOH}$) (Figura 4, reação A). Ainda que já tenha sido verificado em proteínas, o ácido sulfênico é usualmente considerado um intermediário transiente na oxidação de tióis devido à sua instabilidade e alta reatividade (REDDIE; CARROLL, 2008).

A estabilidade do ácido sulfênico é influenciada pela disponibilidade de um grupo $-\text{SH}$ proximal ou pela presença de peróxido em excesso. No primeiro caso, o átomo de enxofre nucleofílico do $-\text{SOH}$ se condensa com o tiól para formar uma ponte dissulfeto (Figura 4, reação B). Essa reação pode ocorrer na mesma proteína, formando um dissulfeto intramolecular, ou entre proteínas distintas, e, nesse caso, forma-se um dissulfeto misto (intermolecular). A formação de pontes dissulfeto usualmente modula estrutura e função de proteínas, mas pode ser revertida por redutores celulares como a tioredoxina e a GSH. Por outro lado, quando há excesso de peróxido, o ácido sulfênico é oxidado sequencialmente às formas de ácido sulfínico ($-\text{SO}_2\text{H}$) e sulfônico ($-\text{SO}_3\text{H}$) (Figura 4, reação C) (REDDIE; CARROLL, 2008). Estima-se que aproximadamente 5 % dos resíduos de cisteína celulares estejam nas formas ditas hiperoxidadas e, assim como a formação de pontes dissulfeto, esses estados oxidativos também têm significância biológica (HAMANN et al., 2002; REDDIE; CARROLL, 2008). É importante notar, contudo, que a oxidação de tióis às formas $-\text{SO}_2\text{H}$ e $-\text{SO}_3\text{H}$ é irreversível (REDDIE; CARROLL, 2008). A única exceção documentada até o momento envolve a redução de ácidos sulfínicos de algumas PRXs pela sulfirredoxina (WOO et al., 2005).

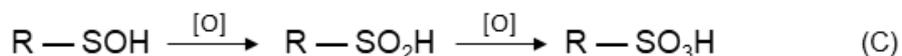
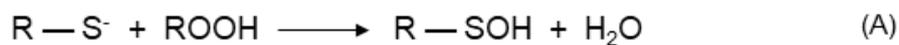


Figura 4. Modificações oxidativas em cisteínas após reação com hidroperóxidos. (A) Tióis em sua forma dissociada (ânion tiolato, S⁻) podem reagir com hidroperóxidos e formar o ácido sulfênico (-SOH). (B) O ácido sulfênico pode reagir com um tiól proximal gerando ponte dissulfeto (RS — SR). (C) Na presença de peróxido em excesso, o ácido sulfênico é oxidado sequencialmente às formas de ácido sulfínico (-SO₂H) e sulfônico (-SO₃H). (Modificado de REDDIE; CARROLL, 2008)

A velocidade de reação do tiolato com hidroperóxidos orgânicos ou H₂O₂ pode variar entre 10 e 10⁸ M⁻¹. s⁻¹ (REDDIE; CARROLL, 2008). De modo geral, a ocorrência da reação depende de vários fatores, entre eles: (i) a natureza química e tamanho do hidroperóxido, (ii) a acessibilidade do grupo tiol e a natureza química dos aminoácidos vizinhos, (iii) a concentração do tiól/proteína alvo em relação à concentração do hidroperóxido e (iv) a localização do oxidante em relação ao alvo (DAVIES, 2005; GUPTA; CARROLL, 2014; REDDIE; CARROLL, 2008). Por exemplo, o HOOU foco desse trabalho, reage com as PRXs com constantes da ordem de 10⁵ e 10⁶, já com a PDI a reação ocorre com velocidade duas ordens de magnitude menor (CARVALHO et al., 2017; PATRICIO, 2014). No entanto, esses valores não podem ser analisados isoladamente já que o contexto biológico de ocorrência das reações é particular para cada caso.

A oxidação dos resíduos de cisteína constitui um mecanismo importante de controle da estrutura e da função de várias proteínas. Por outro lado, essas mesmas modificações podem ocasionar perda de função, resultando em disfunção celular e tecidual (DAVIES, 2005, 2016).

1.5 Proteína dissulfeto isomerase

Em 1963, Goldberger e colaboradores (1963) observaram que a fração microsomal de fígado de rato era capaz de reativar a ribonuclease A reduzida. A enzima que catalisa essa reação foi, posteriormente, identificada como proteína dissulfeto isomerase (PDIA1) (HAWKINS; FREEDMAN, 1975). A PDIA1 (doravante referida como PDI) é o membro fundador de uma família de proteínas composta por mais de 20 membros que compartilham entre si pelo menos um domínio semelhante à tioredoxina ($\beta\alpha\beta\alpha\beta\beta\alpha$), mas que diferem no tamanho e arranjo dos domínios (KOZLOV et al., 2010).

1.5.1 Propriedades estruturais e bioquímicas

A PDI é uma ditiol-dissulfeto oxidoreductase e chaperona, codificada pelo gene *P4HB*. Possui 55 kDa e 508 resíduos de aminoácidos distribuídos ao longo de quatro domínios semelhantes à tioredoxina sequenciais, a saber, *a-b-b'-a'*. Além deles, também compõem a estrutura da proteína uma região de conexão *x* (entre os domínios *b'* e *a'*) e uma extensão C-terminal acídica (*c*), a qual contém a sequência de retenção ao retículo endoplasmático KDEL (figura 5) (KOZLOV et al., 2010; LAURINDO; PESCATORE; CASTRO FERNANDES, 2012; WILKINSON; GILBERT, 2004).

Os domínios *a* e *a'* contêm, cada um, um motivo redox ativo (CGHC) que está envolvido nas reações de oxidação, redução e isomerização promovidas pela enzima (figura 5). As cisteínas N-terminais de cada sítio ativo (Cys⁵³ e Cys³⁹⁷) apresentam pKa estimado em 5,6, estando desprotonadas em pH fisiológico. Por isso, são as responsáveis pelo ataque nucleofílico ao dissulfeto do substrato. As cisteínas C-terminais (Cys⁵⁶ e Cys⁴⁰⁰) são menos expostas e têm valores de pKa

maiores (possivelmente maiores que 10), sendo, portanto, cisteínas de resolução. Os domínios *b* e *b'* têm um caráter mais hidrofóbico e constituem o principal sítio de ligação de substratos [(HATAHET; RUDDOCK, 2009; KOZLOV et al., 2010; LAURINDO; PESCATORE; DE CASTRO FERNANDES, 2012; WILKINSON; GILBERT, 2004).



Figura 5. Estrutura esquemática da PDI. Organização dos domínios da PDI (*a*, *b*, *b'*, *a'* e *c*), além da região de conexão *x*. Os motivos redox ativos (CGHC) contidos nos domínios *a* e *a'* estão destacados. (Modificado de WANG et al., 2013).

A análise da estrutura cristalográfica da PDI sugere uma organização dos domínios em formato de “U” retorcido, com *b* e *b'* na base e *a* e *a'* nas duas extremidades (figura 6), sendo os motivos CGHC voltados um para o outro. Além disso, foi observado que a proteína sofre modificações conformacionais dependendo do estado redox. Na PDI reduzida (PDIred) os domínios *a*, *b* e *b'* estão no mesmo plano e o domínio *a'* faz um giro de 45° para fora desse plano principal. Trata-se de uma conformação mais compacta, em que os sítios ativos estão 27,6 Å distantes um do outro (figura 6 A). A oxidação do sítio ativo do domínio *a'* desencadeia um afastamento entre *a'* e *b'*, assim como uma rotação de aproximadamente 45° da metade C-terminal da região de conexão *x*, resultando numa conformação mais “aberta” da proteína, com os sítios ativos distanciando-se em 40,3 Å (figura 6 B). Essas alterações conformacionais redox-moduladas influenciam na capacidade da PDI em se ligar a substratos. Na PDIred estima-se que o volume do bolsão hidrofóbico tenha 6.816 Å³, sendo capaz de acomodar proteínas menores (até 50 resíduos de aminoácidos) já razoavelmente bem enoveladas. Por outro lado, a PDI

oxidada (PDloxi) apresenta uma fenda muito mais larga (14.453 \AA^3), podendo se ligar a substratos maiores e mal enovelados. As conformações compacta e aberta, observadas, respectivamente, na PDired e na PDloxi, não apenas expõem as propriedades estruturais dinâmicas redox-reguladas da proteína, como também fornecem uma explicação para a diversidade de substratos com os quais a PDI é capaz de se associar (WANG et al., 2012, 2013).

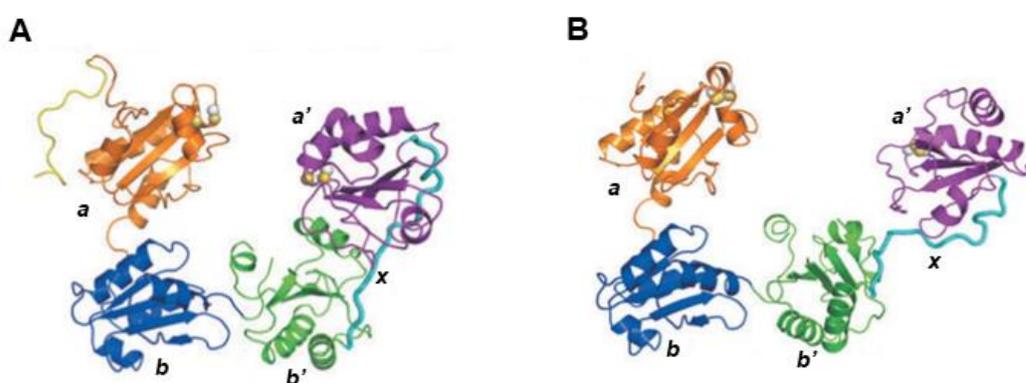


Figura 6. Estrutura terciária da PDI. Organização dos domínios da PDI em formato de “U” retorcido. (A) PDI reduzida com conformação mais compacta. (B) PDI oxidada com conformação mais aberta. As cadeias laterais dos resíduos de cisteína dos sítios ativos estão representadas como esferas: em branco, os carbonos beta e em amarelo os átomos de enxofre. (Modificado de WANG et al., 2013)

1.5.2 A PDI como uma enzima e uma chaperona

A PDI é ubiquamente expressa em diferentes tecidos e tipos celulares e, em virtude da sequência KDEL, é encontrada em concentrações que variam entre 0,2 e 0,5 mM no RE. A abundância da PDI somada ao seu maior potencial de redução em relação ao de outros componentes do RE, explicam a predominância de reações de oxidação e isomerização durante o enovelamento de proteínas nascentes. A geração de novas pontes dissulfeto catalisada pela PDI ocorre pela transferência de equivalentes oxidantes da PDloxi a substratos reduzidos. Como consequência, além da PDI PDired, é formado um dissulfeto nativo ou não-nativo no substrato. Para

resolução desse último caso, a PDI catalisa reações de isomerização, que podem ocorrer de duas formas distintas: a primeira é baseada em ciclos de redução – reoxidação do substrato; alternativamente, é possível que a PDI_{red} promova diretamente o rearranjo intramolecular do dissulfeto não-nativo. É importante enfatizar que em todas as reações de troca ditiol-dissulfeto, é formado um dissulfeto misto entre a cisteína N-terminal do sítio ativo da PDI e a cisteína do substrato (Figura 7) (LAURINDO; PESCATORE; DE CASTRO FERNANDES, 2012; WANG; WANG; WANG, 2015).

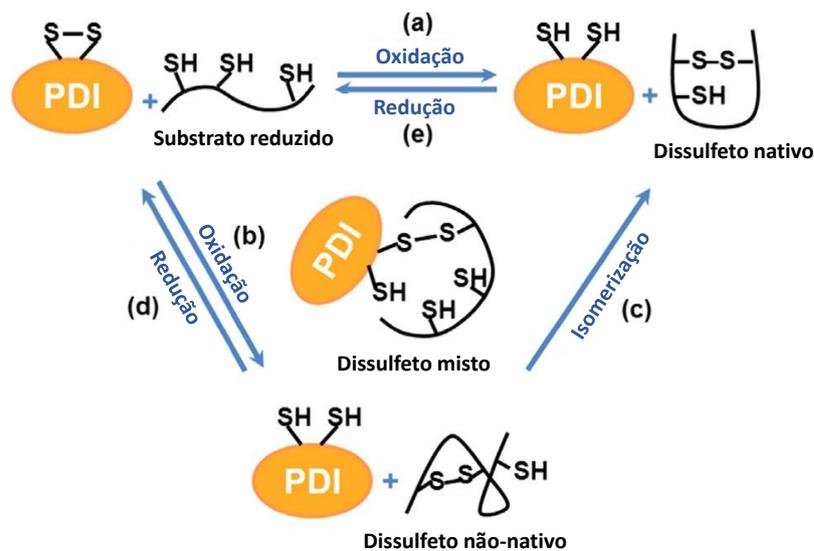


Figura 7. Reações de troca ditiol-dissulfeto catalisadas pela PDI. A PDI catalisa a formação de dissulfetos com a transferência de equivalentes oxidantes para substratos reduzidos, resultando na formação de uma ponte dissulfeto nativa (a) ou não nativa (b). O dissulfeto mal pareado pode ser isomerizado por rearranjo direto (c) ou por ciclos de redução (d) e reoxidação (a). A PDI também catalisa a redução de pontes dissulfeto de substratos reduzidos (e). Em todas as reações foram-se um dissulfeto misto, intermediário, entre PDI e substrato. (Modificado de WANG; WANG; WANG, 2015).

O envelhecimento oxidativo promovido pela PDI depende da sua oxidação e regeneração, eventos que envolvem, classicamente, a ação de flavoenzimas da família Ero 1 (*endoplasmic reticulum oxidoreductin*). A reoxidação de Ero 1 ocorre

pela transferência de dois elétrons, via flavina adenina dinucleotídeo (FAD), para o oxigênio molecular, produzindo H_2O_2 . GSSG, PRX 4 e glutationa peroxidases (GPX) 7 e 8 estão envolvidas em rotas adicionais de reoxidação da PDI, sendo que H_2O_2 - gerado pela Ero 1 ou por outras vias não identificadas – é consumido nas reações catalisadas por PRX 4 e GPX 7/8 (HATAHET; RUDDOCK, 2009; LAURINDO; PESCATORE; DE CASTRO FERNANDES, 2012; SEVIER; KAISER, 2002; WILKINSON; GILBERT, 2004).

O fato de a PDI ser tanto uma enzima como uma chaperona foi originalmente proposto como uma hipótese, mas atualmente essa premissa é suportada por inúmeras evidências experimentais (ELLIS, 2013; WANG; TSOU, 1993; WANG; WANG; WANG, 2015). A independência da atividade de chaperona com relação à atividade catalítica redox foi mostrada em substratos sem pontes dissulfeto: a presença da PDI no meio reacional favoreceu a reativação de GAPDH e rodanase desnaturadas, além de ter prevenido a agregação dessas proteínas durante o enovelamento (CAI; WANG; TSOU, 1994; SONG; WANG, 1995). Além disso, é sabido que a PDI é subunidade permanente de duas enzimas do RE, prolil-4-hidroxilase (P4H) e proteína de transferência de triglicerídeos microsomal (MTP), sendo unicamente a atividade chaperona responsável pela estabilização e funcionalidade dessas moléculas (LAMBERG et al., 1996; VUORI et al., 1992). A atividade chaperona da PDI também foi caracterizada em substratos que contêm pontes dissulfeto, tendo sido observado, por exemplo, correto enovelamento da lisozima mesmo na presença de PDI mutada nos sítios ativos (substituição da cisteína N-terminal por serina) (HAYANO; HIROSE; KIKUCHI, 1995).

Ainda que a atividade chaperona da PDI possa ser, de fato, independente da sua função oxidoreductase, em casos como o da fosfolipase ácida A_2 e da pró-

insulina ambas as funções são necessárias para o enovelamento eficiente do substrato (WINTER et al., 2002; YAO; ZHOU; WANG, 1997). Além disso, vale retomar a noção de que a oxidação do domínio *a'* desencadeia alterações conformacionais na PDI que favorecem a ligação de substratos, expondo, portanto, uma importante regulação redox da funcionalidade da proteína (WANG et al., 2012).

1.5.3 A PDI fora do retículo endoplasmático

Apesar de ser canonicamente uma proteína do RE, a expressão da PDI em compartimentos intracelulares - mitocôndrias, núcleo e citosol - foi documentada (TURANO et al., 2002). Além disso, uma fração dessa proteína pode ser também externalizada, evento observado em diversos tipos celulares, como linfócitos T, neutrófilos, hepatócitos, plaquetas, células musculares lisas e células endoteliais (AKAGI et al., 1988; ARAUJO et al., 2017; ARAUJO; FERNANDES; LAURINDO, 2017; BI et al., 2011; ESSEX; CHEN; SWIATKOWSKA, 1995; HAHM et al., 2013). Esse *pool* extracelular é composto tanto de proteínas secretadas como de proteínas que permanecem aderidas à membrana plasmática (PDI da superfície celular, PDIs_c). Ainda que os mecanismos de translocação e de ancoragem à membrana não estejam totalmente esclarecidos e pareçam variar dependendo do tipo celular, inúmeras funções biológicas importantes foram atribuídas à PDI extracelular (LAURINDO; PESCATORE; CASTRO FERNANDES, 2012; MORETTI; LAURINDO, 2017)

Uma das primeiras evidências da funcionalidade da PDIs_c foi obtida ainda no início da década de 90. A presença de bloqueadores de tiól impermeáveis à membrana plasmática (5,5-ditiobis(ácido 2-nitrobenzóico [DTNB] e p-cloromercurobenzenosulfônico [pCMBS]) inibiu a clivagem do conjugado poli D-

lisina/[I¹²⁵]tiramina ligado inespecificamente à membrana plasmática das células CHO (*chinese hamster ovary*) (FEENER; SHEN; RYSER, 1990). Efeito similar foi observado sobre o efeito citotóxico da toxina diftérica, um heterodímero que se liga a receptor específico na membrana e deve ser clivado para tornar-se ativo (RYSER; MANDEL; GHANI, 1991). As reações de redução responsáveis pela clivagem de ambas as moléculas foram posteriormente atribuídas à PDI em experimentos usando o inibidor bacitracina e anticorpos neutralizantes (MANDEL et al., 1993).

O ambiente extracelular parece mesmo favorecer a atividade redutase da PDI. Em células de fibrosarcoma (HT1080) a maior ou menor detecção de grupos tiólicos na superfície (marcados com os alquilantes impermeáveis DTNB ou N-(3-maleimidilpropionil) biocitina [MBP]) foi fortemente correlacionada com o respectivo aumento ou diminuição da expressão da PDI nesse local (JIANG et al., 1999). A redução de pontes dissulfeto atribuída à PDI já foi verificada em diversos alvos celulares, a saber: integrinas, receptor de tirotropina (TSH), plasmina, fator tecidual e glicoproteína gp120 (COUËT et al., 1996; GALLINA et al., 2002; MORETTI; LAURINDO, 2017; STATHAKIS et al., 1997). Ainda assim, também já foi verificada atividade isomerase da PDI sobre dissulfetos regulatórios do sítio não-catalítico da metaloprotease disintegrina ADAM17, integrinas e trombospondina (HAHM et al., 2013; HOTCHKISS; CHESTERMAN; HOGG, 1996; WILLEMS et al., 2010).

Uma vez expressa em diversos tipos celulares e com uma diversidade de substratos, não surpreende que a PDI extracelular esteja envolvida em inúmeros eventos (pato) fisiológicos (LAURINDO; PESCATORE; DE CASTRO FERNANDES, 2012; MORETTI; LAURINDO, 2017; TURANO et al., 2002). Por exemplo, já foi atribuído à PDI um importante papel na internalização de vírus. A PDI parece interagir e modificar diretamente a proteína gp120 do envelope do vírus da

imunodeficiência humana (HIV); a redução de pontes dissulfeto promovida por PDI resulta em alterações conformacionais na gp120 complexada ao receptor CD4 de linfócitos T e favorece a fusão vírus-célula (GALLINA et al., 2002). Por outro lado, a entrada do vírus da dengue em células endoteliais depende da ativação das integrinas β_1 e β_3 mediada por PDI (WAN et al., 2011). Em ambos os casos, a inibição da proteína preveniu a internalização dos patógenos. Outro processo que explora a atividade redutase da PDI é a liberação do ectodomínio (subunidade α) do receptor de TSH de tireócitos para o meio extracelular ou corrente sanguínea (COUËT et al., 1996). Mecanismo semelhante foi observado em células endoteliais durante a liberação da proteína TEM 5 (*tumor endothelial cell marker 5*) induzida por trombina (VALLON et al., 2012).

O envolvimento da PDI extracelular em eventos vasculares certamente é o melhor estudado até o momento. Hahm e colaboradores (2013) exploraram o papel da PDI no recrutamento de neutrófilos durante a inflamação vascular. Em um modelo animal em que a PDI dessas células foi depletada, verificou-se menor adesão de neutrófilos ao endotélio inflamado, condição recuperada com a infusão da proteína selvagem recombinante. Estudos com anticorpos neutralizantes e camundongos $\alpha_M\beta_2$ *null* sugeriram que a regulação da adesão mediada por PDI envolve a participação dessa integrina. Realmente, com ensaios de co-imunoprecipitação e ressonância plasmônica de superfície foi mostrada a interação entre a integrina $\alpha_M\beta_2$ e PDI.

Estima-se que plaquetas ativadas tenham quatro vezes mais tióis reduzidos na sua superfície do que as não ativadas, sendo a ação da PDI uma importante fonte desses tióis livres (BURGESS et al., 2000; FLAUMENHAFT; FURIE, 2016). Além da PDIs, é sabido que a ativação de plaquetas também resulta em secreção

de PDI para o meio extracelular (CHEN; DETWILER; ESSEX, 1995). Substratos da PDI extracelular de plaquetas incluem as integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$ e $\alpha_2\beta_1$ (receptores de fibrinogênio e colágeno, respectivamente), glicoproteína 1ba (GP1ba, receptor do fator de Von Willebrand), trombospondina e vitronectina (CHO et al., 2012; ESSEX et al., 1999, 2001; HOTCHKISS; CHESTERMAN; HOGG, 1996; HOTCHKISS; MATTHIAS; HOGG, 1998; LAHAV et al., 2003; MOR-COHEN, 2016). A modulação redox promovida por PDI nesses casos tem implicações na agregação e adesão plaquetárias (ESSEX, 2009). Além disso, estudos *in vivo* reforçaram substancialmente a importância da PDI extracelular no controle da trombose. Diversos grupos, usando diferentes modelos animais de trombose, verificaram a presença dessa proteína nos locais de injúria, sendo que a infusão de inibidores ou anticorpos neutralizantes na circulação foi capaz de inibir a formação do trombo e a geração de fibrina (BEKENDAM; FLAUMENHAFT, 2016; FLAUMENHAFT; FURIE, 2016). Na verdade, a geração de fibrina parece ser suportada pela PDI secretada por células endoteliais já em momentos muito precoces após injúria do vaso (JASUJA; FURIE; FURIE, 2010).

Recentemente, a PDI extracelular foi relacionada à reconstrução e regulação fina da arquitetura da parede vascular. Usando um modelo de super-distensão da artéria ilíaca de coelhos, os autores mostraram que a imuno-inibição da PDI resultou em perda sustentada do calibre vascular sem espessamento da parede arterial, associada a remodelamento constritivo e desorganização do citoesqueleto. Além disso, a expressão da integrina β_1 total e associada à PDI, bem como os níveis de integrina β_1 da superfície reduzida, foram menores após o tratamento com anticorpos anti-PDI, sugerindo esse receptor como um possível alvo da PDI durante o reparo do vaso (TANAKA et al., 2016)

Finalmente, é valioso evidenciar a participação da PDI na regulação do tônus vascular ao mediar a transferência do NO de proteínas S-nitrosiladas extracelulares, para o compartimento citosólico (RAMACHANDRAN et al., 2001; ZAI et al., 1999).

1.6 Hipótese

Sob condições de inflamação vascular, nas quais existam em abundância MPO, $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , a oxidação do AU e geração do oxidante HOOU é provável. Por ser descrito muito recentemente, estudos envolvendo os efeitos biológicos do HOOU ainda são escassos na literatura. Ainda assim, já foi mostrada alta reatividade com proteínas redox moduladas e, nesse sentido, a PDI expressa na superfície de células endoteliais se apresenta como alvo potencial. Considerando a relevância dessa proteína em eventos vasculares, o estudo da oxidação promovida pelo HOOU e os efeitos celulares decorrentes disso contribui para o entendimento de como o AU altera a função endotelial, interfere na homeostase vascular e, conseqüentemente, sustenta patologias cardiovasculares.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho buscou contribuir para uma melhor compreensão da ação oxidante H₂O₂ sobre proteínas totais, mas principalmente, sobre a PDI. Além disso, procurou investigar consequências biológicas da exposição de células endoteliais ao H₂O₂ como um dos possíveis mecanismos de alteração da função endotelial e alteração da homeostase vascular.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar o potencial oxidante do H₂O₂ sobre a PDI recombinante e caracterizar as modificações oxidativas decorrentes dessa oxidação;
- Investigar o potencial oxidante do H₂O₂ sobre a PDI de superfície de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs);
- Investigar o potencial oxidante do H₂O₂ sobre tióis de proteínas totais da superfície de HUVECs;
- Verificar o efeito tóxico inespecífico do H₂O₂ sobre HUVECs;
- Verificar alterações na funcionalidade e no estado redox de HUVECs mediante exposição ao H₂O₂;
- Investigar a possibilidade do ácido úrico ser substrato de peroxidases secretadas pelas HUVECs.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes e anticorpos

Meio RPMI, meio RPMI modificado (sem glutatona, metionina e cisteína) e soro fetal bovino (SFB) foram adquiridos da Vitrocell (Campinas, Brasil). N-(3-maleimidilpropionil) biocitina (MPB), anticorpos primários anti-PDI (clone RL90) e anti-vinculina, anticorpo secundário conjugado a Alexa Fluor 488 (anti-mouse IgG/IgM) e Alexa Fluor™ 647 C2 Maleimida foram adquiridos da Thermo Fisher Scientific (Waltham, EUA). Anticorpo primário anti-integrina β_1 (clone LM609) foi adquirido da Millipore (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). Anticorpos secundários fluorescentes donkey anti-Mouse IRDye® 800 CW e donkey anti-Rabbit IRDye® 680RD foram adquiridos da LI-COR Biosciences (Lincoln, EUA). Peptídeo RGDS foi adquirido da Chinese Peptide Company. Tripsina (grau espectrometria de massas) e partículas magnéticas recobertas com estreptavidina (Streptavidin MagneSphere® Paramagnetic Particles) foram adquiridas da Promega (Madison, EUA). Todos os outros sais e reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). Todos os solventes foram adquiridos da JTBaker® (Thermo Fisher Scientific). Todas as soluções e tampões foram agitados com resina Chelex® 100 (Sigma-Aldrich) por pelo menos 1 h.

3.2 Obtenção do hidroperóxido de urato

3.2.2 Síntese química

A síntese química do HOOU foi realizada por foto-oxidação conforme publicado anteriormente padronizado em nosso laboratório (CLAUSEN et al., 2010; PATRICIO et al., 2015). Primeiro, foram preparadas soluções-estoque de urato (20 mM em hidróxido de sódio 40 mM) e riboflavina (500 μ M em tampão fosfato 20 mM,

pH 6). Em seguida, em um poço de uma placa de 6 poços, urato e riboflavina foram adicionados junto com tampão fosfato (20 mM, pH 6) até as concentrações finais de 1,5 mM e 100 μ M, respectivamente, em volume final de 4 ml. Essa mistura foi, então, exposta à radiação UV-A (365 nm; irradiador equipado com 6 lâmpadas de 15 mW e 2,2 mW/cm² [GE Healthcare]; Novatecnica, Campinas, Brasil) por 10 min, sob agitação contínua e temperatura controlada (20 °C). Após esse tempo, a solução foi coletada e imediatamente submetida à separação cromatográfica.

3.2.3 Separação cromatográfica

O HOUU foi separado em um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE; Shimadzu, Tóquio, Japão) composto por duas bombas (modelo LC-6AD), injetor manual (CTO-10A), detector de absorvância UV (SPD-20A) e controlador de sistema (CBM-20A) conectado a um computador com o programa *LC Solution*. Como fase estacionária foi usada uma coluna TSK-Gel amida (10 μ m; 21,5 mm x 30 cm; Tosoh Bioscience, Tóquio, Japão), sendo a fase móvel 40% de acetato de amônio (10 mM, pH 6,8) e 60% de acetonitrila. A eluição dos compostos foi realizada em modo isocrático, com fluxo de 4 ml/min ao longo de 30 minutos. O excesso de acetonitrila da amostra de HOUU foi evaporado com gás inerte. Para garantir a máxima remoção do solvente orgânico, um sistema montado com um kitassato conectado a uma bomba de vácuo também foi usado. Nessa condição, menos de 0,1% de acetonitrila permanece na solução (CARVALHO, 2017).

3.2.4 Quantificação

A concentração de HOUU obtida após evaporação do solvente foi determinada usando o coeficiente de absorvância molar em 308 nm ($\epsilon_{308} = 6.537 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (PATRICIO et al., 2015). Uma vez que o hidroxissourato (HOU) também

pode absorver na região do espectro em torno de 308 nm, a quantificação do HOOU também foi feita pelo ensaio de *Ferrous Oxidation Xylenol Orange* (FOX) modificado (WINTERBOURN et al., 2004), específico para hidroperóxidos. O método envolve uma etapa inicial de oxidação, em meio ácido, do Fe^{2+} (presente no sulfato ferroso amoniacal que compõe o reagente) a Fe^{3+} por hidroperóxidos. Em seguida, o íon férrico forma um complexo com o alaranjado de xilenol, de coloração violeta, cuja absorção pode ser lida entre 540-600 nm. O HOOU obtido foi diluído no reagente de FOX e, após 40 min de reação ao abrigo da luz, foi feita leitura em 540 nm. Os valores de absorbância obtidos foram plotados contra uma curva padrão de peróxido de hidrogênio, pois HOOU e peróxido de hidrogênio são equivalentes na reação de FOX (PATRICIO et al., 2015). Finalmente, as concentrações de HOOU calculadas pelo coeficiente de absorvidade molar foram corrigidas pelos valores obtidos no ensaio de FOX.

3.3 Avaliação da estabilidade do hidroperóxido de urato

HOOU foi sintetizado e o excesso de acetonitrila foi evaporado conforme descrito no item 3.2.3. Em seguida, a amostra obtida foi diluída em tampão fosfato salino (PBS, 10 mM, pH 7,4) ou água em volume equivalente, sempre mantido a 4°C. A concentração de HOOU foi calculada no tempo inicial e depois a cada 10 min, até 30 min, usando o coeficiente de absorvidade molar.

3.4 Obtenção da proteína dissulfeto isomerase recombinante

3.4.1 Expressão e purificação

A proteína dissulfeto isomerase (PDI) A1 recombinante foi expressa em bactérias *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS transformadas com o plasmídeo

pET28a contendo cDNA para PDI-6x His *tag* humana. Uma primeira etapa de purificação foi conduzida em resina de cobalto imobilizado (TALON®; GE Healthcare) e gradiente de imidazol (10 – 200 mM) (IQBAL et al., 2014). As frações contendo PDI foram reunidas e purificadas adicionalmente utilizando uma coluna de troca aniônica (Q Sepharose) (KARALA et al., 2007). Após diálise, as alíquotas contendo a enzima pura foram armazenadas a -80 °C.

3.4.2 Quantificação

A quantificação da proteína foi realizada em espectrofotômetro, usando o coeficiente de absorvidade molar em 280 nm ($\epsilon_{280} = 45.380 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) calculado pelo programa *ProtParam* Tool (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>).

3.4.3 Redução

A redução da PDI purificada foi feita pela incubação com ditioneitol (DTT, 10 mM), por 1 h e 30 min, 37 °C e agitação contínua (300 rpm). O excesso do agente redutor e de outros produtos foi removido por gel filtração (coluna HiTrap™ Desalting 5 mL; GE Healthcare) utilizando tampão fosfato (10 mM, pH 7, contendo ácido dietilenotriamina penta acético [DTPA] 100 µM) como fase móvel em um sistema de cromatografia líquida rápida de proteína (FPLC, Akta Purifier, GE Healthcare). A eluição da proteína foi monitorada pela absorbância a 280 nm e a eluição do DTT pelo aumento da condutividade. A proteína reduzida foi ainda concentrada por ultrafiltração (Amicon® Ultra, 30 kDa, Millipore) a 3000 rpm, 4 °C e 20 min. Para garantir a eficiência do protocolo, o conteúdo de tióis foi verificado pela reação com 5,5-ditiobis(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB). O ensaio consiste na reação do dímero DTNB (amarelo muito claro) com grupos sulfidrilas livres, formando um dissulfeto

misto entre um tiól da proteína e o monômero TNB. Ao mesmo tempo, a outra molécula de TNB é liberada e sua coloração amarela mais intensa permite que seja quantificado pelo coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{412\text{nm}} = 14.150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Então, a PDI reduzida (10 μM) foi incubada com DTNB (800 μM preparado em tampão fosfato 50 mM, pH 7,4) em solução de glicina (100 mM, pH 8,5) contendo dodecil sulfato de sódio (SDS, 1%), por 10 min, em temperatura ambiente e abrigo da luz. A absorbância a 412 nm foi medida em leitor de microplacas (Synergy H1 Hybrid, BioTek) e a quantificação dos tióis feita pelo coeficiente de extinção molar do TNB (RIDDLES; BLAKELEY; ZERNER, 1979)

3.5 Reação entre proteína dissulfeto isomerase recombinante e hidroperóxido de urato

PDI recém reduzida (10 μM) foi incubada com acetato de amônio (veículo) ou diferentes concentrações de H₂O₂, em tampão fosfato (100 mM, pH 7,4, contendo DTPA 100 μM) por 10 min, em temperatura ambiente. Concentrações de H₂O₂ variando entre 2 e 80 μM foram usadas em análises de tióis livres remanescentes pelo ensaio do DTNB (conforme descrito no item 3.4.3). Concentrações de 20, 40 e 200 μM de H₂O₂ foram usadas nas análises de modificações oxidativas, atividade e agregação descritas nos itens subsequentes.

3.6 Análise de modificações oxidativas da proteína dissulfeto isomerase por nLC-MS/MS

O procedimento experimental para essa análise foi feito conforme publicado por Peixoto, et al. (2018) como segue:

3.6.1 Preparo das amostras

Após reação da PDI com HOUU nas condições descritas no item 3.5, alíquotas das misturas reacionais foram diluídas (1:10) em tampão Tris-HCl (10 mM, pH 8,0) contendo iodoacetamida (IAM, 55 mM) e cloreto de guanidina (6 M) e incubadas durante 2 h, a 25 °C, sob agitação contínua (900 rpm). Os excessos de alquilante e desnaturante, além de outros compostos de baixo peso molecular foram removidos por filtração em coluna de exclusão de 10 kDa (PD10). Em seguida, após completa secagem em concentrador à vácuo, as amostras foram ressuspensas em tampão bicarbonato de amônio (50 mM, pH 8) e digeridas com tripsina (razão proteína:tripsina de 50:1) a 37 °C e 1000 rpm, durante 12 horas, período após o qual foi adicionada uma segunda alíquota de tripsina para uma nova rodada de digestão. A reação foi inibida pela adição de ácido fórmico (5% em água MilliQ) por 20 min. As amostras contendo os peptídeos foram completamente secas em concentrador à vácuo e mantidas a -20°C até a análise.

Imediatamente antes das análises, os hidrolisados trípticos foram ressuspensos em ácido fórmico (0,1 % em água MilliQ), desalinizados e concentrados com ponteira de pipeta contendo resina C₁₈ (ZipTipC18, Millipore, Bedford, MA) da seguinte forma: 1) a ponteira foi lavada com soluções de acetonitrila (sequencialmente, 100 % e 60 %) contendo ácido fórmico (0,1 %), seguido do equilíbrio da coluna com solução de ácido fórmico (0,1 % em água MilliQ); 2) os peptídeos foram carregados no *ZipTip*, seguindo 5 lavagens com solução de metanol (5 %) contendo ácido fórmico (0,1 %). 3) os peptídeos foram eluídos com solução de acetonitrila (60 %) contendo ácido fórmico (0,1 %). Os hidrolisados isentos de sal foram, então, completamente secos em concentrador à

vácuo, ressuspensos em solução de ácido fórmico (0,1 %) e, finalmente, diluídos duas vezes em solução de ácido fórmico (0,1 %).

3.6.2 Metodologia nLC-MS/MS

As amostras foram carregadas em coluna de nano-HPLC (ACQUITY UPLC BEH-C₁₈, 20 mm x 180 µm, 5 µm, Waters, Milford, EUA) e eluídas a um fluxo de 400 nl/min, usando gradiente linear de 99 % de solvente A (água MilliQ contendo ácido fórmico 0,1 %) e 1 % de solvente B (acetonitrila contendo ácido fórmico 0,1 %), até 35 % de solvente B por 60 min. A análise em espectrômetro de massas foi feita em um triplo quadrupolo (*TripleTOF*® 6600, Sciex, Framingham, EUA), com fonte de ionização por *nanospray*, ajustada para operar em modo positivo, com capilar, 2,4 kV, aquecedor a seco e 100 °C.

3.6.3 Aquisição, processamento e análise dos dados

Os programas Analyst TF e Peak View (versão 1.7.1 e 2.2, respectivamente, ambos Sciex) foram usados na aquisição e processamento de dados. MASCOT (versão 2.5, Matrix Science Ltd., Londres) e MaxQuant (versão 1.2.7.429) foram empregados para a análise das modificações. A tolerância de massa admitida foi sempre ≤ 10 ppm para análise de MS e $\leq 0,05$ Da para análise MS/MS. A taxa de descoberta falsa (FDR) foi ≤ 1 %. Para a quantificação relativa dos íons o programa MultQuant (versão 3.0, Sciex) foi usado. Para isso, primeiramente, foi feita a integração das áreas dos cromatogramas gerados para os íons de interesse (*Extracted Ion Chromatogram* - XIC) e para os íons totais (*Total Ion Chromatogram* - TIC). Depois, a intensidade do MS de peptídeos alquilados e oxidados foi calculada com base na proporção entre os dois valores obtidos (XIC/TIC).

3.7 Avaliação da agregação da proteína dissulfeto isomerase

Para investigação da formação de agregados, alíquotas das reações (descrito no item 3.5) contendo 1,5 μM de PDI foram solubilizadas em tampão de amostra *Laemmli* (Tris-HCl 62 mM, pH 6,8, contendo glicerol 10 %, SDS 2 %, β -mercaptoetanol 100 mM e azul de bromofenol 0,01 %), aquecidas a 100 °C durante 5 min e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (8 %), a 120 V por 1 h. Os géis foram fixados com metanol (45 %) e ácido acético glacial (5 %) por 30 min, corados *overnight* com azul de *Comassie* e, finalmente, descorados com ácido acético (1 %). Os géis foram escaneados e a intensidade relativa das bandas correspondentes à PDI (monômeros de aproximadamente 55 kDa e agregados de mais alto peso molecular) foi quantificada por densitometria usando o programa ImageJ (NIH, EUA). Para cada tratamento, a porcentagem da PDI agregada foi calculada pela razão PDI agregada/PDI total x 100.

3.8 Avaliação da atividade redutase da proteína dissulfeto isomerase

Após reação com H₂O₂ (item 3.5), PDI (1,5 μM) foi incubada com insulina (1 mg/ml), em tampão fosfato (100 mM, pH 7,4 contendo DTPA 100 μM) e na presença de DTT (1,5 mM). O aumento da turbidez do meio devido à precipitação das cadeias β da insulina foi monitorado a 540 nm ao longo de 1 hora, utilizando leitor de microplacas (Synergy H1 Hybrid, BioTek). A capacidade catalítica da PDI foi medida pelo tempo de latência (*lag-time*), ou seja, o período necessário para que a turbidez avaliada atingisse o patamar de 0,1 (WATANABE; LAURINDO; FERNANDES, 2014).

3.9 Cultura de células

Células endoteliais de veia umbilical humana (*Human Umbilical Vein Endothelial Cell* - HUVEC) imortalizadas espontaneamente por passagens sucessivas, foram mantidas em meio RPMI contendo SFB (10 %), sulfato de estreptomicina (100 mg/ml) e penicilina (25 mg/ml) e mantidas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂. Para o subcultivo, células aderentes confluentes foram lavadas com PBS (10 mM, pH 7,4) e destacadas com solução contendo tripsina (0,1 %) e EDTA (0,5 mM) ou apenas EDTA. Após centrifugação e contagem, foram distribuídas em placas de cultura nas concentrações adequadas para os diferentes ensaios. As células foram usadas entre as passagens 5 e 12.

3.10 Avaliação da viabilidade celular

3.10.1 Atividade da enzima lactato desidrogenase

HUVECs (densidade inicial de 5×10^4 células) foram cultivadas em placas de 24 poços por 2 dias. Após esse período, as células foram lavadas com PBS e tratadas com diferentes concentrações de ácido úrico (50 – 400 μ M), H₂O₂ (50 – 400 μ M) ou fase móvel evaporada, preparados em PBS, por 10 min, 37 °C, em estufa com atmosfera úmida e 5 % de CO₂. Uma amostra controle usando apenas PBS também foi feita. O sobrenadante coletado foi empregado na avaliação da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) liberada para o meio extracelular em caso de injúria à membrana plasmática. A presença da LDH foi detectada por ensaio enzimático acoplado, com adição do substrato lactato, que resultou na redução do sal de tetrazólio (INT) a formazan, produto avermelhado cuja absorbância foi lida em 503 nm em leitor de microplaca (Infinite M200; Tecan®). A concentração molar do formazan foi obtida pelo coeficiente de absorvidade molar

($\epsilon_{503\text{nm}} = 19.200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (BABSON; BABSON, 1973). A atividade enzimática foi expressa em miliunidades por milhão (mU/10⁶) de células.

3.10.2 Marcação nuclear com sondas fluorescentes

HUVECs foram cultivadas e tratadas conforme descrito no item acima e, em seguida, meio de cultura contendo Hoechst 33342 (HO, 10 $\mu\text{g/ml}$) e iodeto de propídio (IP, 5 $\mu\text{g/ml}$) foi adicionado aos poços. Para concretização da marcação nuclear, as células foram incubadas em estufa com atmosfera úmida, 37 °C e 5 % de CO₂, por 10 min. A presença de células viáveis e mortas foi determinada em microscópio de fluorescência invertido (Eclipse Ti, Nikon, Tóquio, Japão). Um mínimo de 500 células foi contado em cada condição experimental e os resultados expressos como porcentagem de morte (células marcadas com IP ou HO azul claro e brilhante) em relação ao número total de células (marcadas com HO).

3.11 Detecção de tióis reduzidos da proteína dissulfeto isomerase e subunidade $\beta 1$ de integrina presentes na superfície celular

A quantificação dos tióis reduzidos das proteínas de superfície foi feita conforme publicado por Willems *et al* (2010) com modificações. HUVECs (densidade inicial de 4×10^5 células) foram cultivadas em placas de cultura de 35 mm de diâmetro ao longo de 1 dia. Após esse período, as células foram lavadas com PBS e tratadas com H₂O₂ (75 e 150 μM) ou fase móvel evaporada, ambos preparados em PBS, ou apenas PBS, por 10 min, em estufa com atmosfera úmida a 37 °C e 5 % de CO₂. Após remoção do sobrenadante, foi adicionado 1 ml de MPB (100 μM) por 1 hora, 4°C. A reação foi interrompida pela adição de GSH (200 μM), seguida do acréscimo de IAM (400 μM), ambas as incubações por 15 minutos, em temperatura

ambiente. As células foram, então, rompidas com tampão de lise (Triton X-100 1% e NaCl 150mM em tampão Tris-HCl 50mM, pH 7,4) contendo inibidores de protease (leupeptina 1:100, aprotinina 1:100 e *phenylmethanesulfonylfluoride* [PMSF] 1:50) por 1 h a 4 °C. Em seguida, o conteúdo lisado foi incubado com 80 µL de partículas (*beads*) magnéticas conjugadas à estreptavidina (2 mg/ml) *overnight* a 4 °C. No dia seguinte, as *beads* foram concentradas com imã, lavadas com PBS e incubadas com tampão de amostra *Laemmli* por 30 min em temperatura ambiente, seguido de incubação a 100 °C por 5 min. Paralelamente, o sobrenadante residual da concentração das *beads*, composto por proteínas do lisado que não foram capturadas, foi coletado e incubado com tampão de amostra a 100 °C por 5 minutos. As amostras capturadas pelas *beads* e aquelas obtidas do sobrenadante residual (controle de carregamento) foram aplicadas em gel de poliacrilamida (10 %) e submetidas à eletroforese (30 mA/gel por 1 h e 30 min). As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (100 mA por 1 h) e incubadas com solução de bloqueio por 1 h em temperatura ambiente. Após lavagens com tampão contendo Tween-20 (0,1 %), as membranas foram incubadas com os anticorpos primários anti-PDI (1:1000) e anti-integrina β 1 (1:1000), *overnight* a 4 °C. No dia seguinte, as membranas foram lavadas novamente e incubadas com anticorpos secundários fluorescentes (*donkey anti-Mouse* IRDye® 800 CW e *donkey anti-Rabbit* IRDye® 680RD, LI-COR Biosciences, Lincoln, EUA) por 1 h em temperatura ambiente. Após um último ciclo de lavagens, as bandas de proteínas foram reveladas com o equipamento Odyssey® e quantificadas com o programa Image Studio® (ambos LI-COR). As quantificações das bandas correspondentes às proteínas reduzidas foram normalizadas pelos controles de carregamento e os valores obtidos expressos com relação ao controle.

3.12 Análise do estado redox de tióis de superfície por microscopia de fluorescência

Placas de 24 poços contendo lamínulas redondas de 13 mm de diâmetro foram preparadas previamente com cobertura de fibronectina (10 µg/ml, diluída em PBS), seguida do bloqueio com albumina do soro bovino (*Bovine Serum Albumin* [BSA] 1%) a 37 °C, por 1 hora. No dia do experimento, HUVECs confluentes foram descoladas com EDTA (0,5 mM) e transferidas (5×10^4) para as referidas placas em meio RPMI modificado (sem GSH, metionina e cisteína) contendo BSA (0,2 %). Após cultivo por 2 h, a 37 °C em estufa com atmosfera úmida e 5 % de CO₂, as células foram lavadas para remoção daquelas que, porventura, ainda estivessem em suspensão. As HUVECs foram, então, incubadas com meio de cultura modificado, fase móvel evaporada, H₂O₂ (75 ou 150 µM) ou diamida (200 µM), tudo preparado em RPMI modificado, por 15 min, a 37 °C, em estufa com atmosfera úmida e 5 % de CO₂. Paralelamente, foi feito um grupo experimental com células previamente reduzidas com *tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride* (TCEP, 200 µM), por 15 min, seguido dos tratamentos conforme já descrito. Passado o período de tratamento, os poços foram lavados com PBS Ca²⁺ Mg²⁺ e as células foram incubadas com Alexa-Maleimida (3 µM, Alexa Fluor 647 C2 Maleimida, Thermo Fisher) e Hoechst (5 µg/ml, Hoechst 33342, Sigma-Aldrich). Depois foram submetidas às etapas subsequentes de fixação (paraformaldeído 4 %), permeabilização (Triton X-100 0,2 %) e bloqueio (BSA 1 %), por 20, 10 e 60 min, respectivamente, sempre em temperatura ambiente e abrigo da luz. Em seguida, foi feita incubação com anticorpo primário anti-vinculina (1:500, Thermo Fisher) *overnight*, 4 °C. No dia seguinte, após sucessivas lavagens com PBS, as células foram incubadas com anticorpo secundário fluorescente (Alexa 488, 1:400) por 2 h,

em temperatura ambiente e abrigo da luz. As lâminas marcadas foram, então, preparadas sobre lâminas com meio de montagem específico (*ProLong Diamond Antifade Mountants for Fixed Cells*, Thermo Fisher) e guardadas a 4 °C e abrigo da luz até o momento da análise. As imagens foram adquiridas em microscópio DMi8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha), com filtros Y5-T, FITC e DAPI, objetiva HC PL APO CS2 63x/1.40 OIL UV (Leica Microsystems) e resolução XY = 0.240 µm e Z = 0.426 µm. As quantificações foram feitas usando o programa ImageJ Fiji. Para tal, primeiramente, os limites da membrana plasmática das células foram determinados pela marcação em verde (Alexa 488) e com a ferramenta de seleção à mão livre. Depois, para cada célula selecionada, a intensidade média de fluorescência (IMF) foi obtida segundo a marcação em vermelho (Alexa 647). A IMF apresentada nos resultados é referente ao somatório das IMF individuais, dividido pelo número total de células contadas em cada experimento (80 – 100 células).

O conteúdo de tióis totais também foi avaliado em células cultivadas por 24 horas (densidade inicial de $2,5 \times 10^4$) e, nesse caso, dois grupos experimentais distintos foram feitos. Um deles, com células cultivadas sobre fibronectina (10 µg/ml), incubadas apenas com meio de cultura modificado e marcadas com Alexa-Maleimida, Hoechst e vinculina. No outro, sem fibronectina, as células foram incubadas com meio de cultura modificado, diamida (200 µM) e TCEP (1 mM) e marcadas apenas com Alexa-Maleimida e Hoechst.

3.13 Quantificação simultânea da glutatona reduzida e oxidada

A quantificação de GSH e GSSG foi feita por LC-MS/MS, segundo o descrito por Carrol *et al.* (CARROLL *et al.*, 2016) com algumas modificações.

3.13.1 Preparo das amostras

HUVECs confluentes foram destacadas da placa de cultivo, lavadas, contadas e distribuídas em microtubos (3×10^6 células/microtubo). Em seguida, cada *pellet* de células foi tratado com 180 μ L de PBS-glicose (PBS 10 mM; CaCl_2 1mM; MgCl_2 0,5 mM e glicose 5mM), fase móvel evaporada ou diferentes concentrações de HOOU (20 – 250 μ M) preparados em PBS-glicose, por 10 min, sob agitação suave. Após esse período de incubação, foram adicionados às amostras 18 μ L de tampão de extração (ácido tricloroacético 2 % e DTPA 1 mM) e 2 μ L de padrão interno (N-acetilcisteína, NAC, 2 μ g/ml), seguido de agitação em vórtex por 1 min e incubação a 4 °C por 30 min. Finalmente, 200 μ L de formiato de amônio (0,75 mM) acrescido de ácido fórmico (0,01 %) foram adicionados às amostras e os restos celulares foram removidos por centrifugação a 5000 g, 4 °C e 10 min. A fração sobrenadante de cada amostra foi coletada e injetada em sistema LC-MS/MS.

3.13.2 Metodologia LC-MS/MS

As amostras foram carregadas em um sistema Nexera UPLC (Shimadzu), com coluna analítica C18 Kinetex (100 mm x 2,10 mm; 2,6 μ m, Phenomenex) e eluídas a um fluxo de 0,2 ml/min, com formiato de amônio (0,75 mM) acrescido de ácido fórmico (0,01 %) como fase móvel A e metanol como fase móvel B. O gradiente para eluição dos compostos foi: 0-5 min com 1% de B; 6-10 min com 80% de B; 10-11 min com 1% de B, mantendo 1% de B por 9 min para equilíbrio e preparo da coluna para a eluição da amostra seguinte. A temperatura da coluna foi ajustada em 25 °C e o volume de injeção 10 μ L. A análise em espectrômetro de massas foi feita em um triplo quadrupolo (*Triple-TOF*® 600, Sciex) acoplado à fonte de ionização por *electrospray* (ESI), operando no modo positivo, a 450 °C e tensão de pulverização de 5500 V. A energia de colisão usada para gerar os fragmentos foi

específica para cada analito (22 V para GSH; 32 V para GSSG e 25 V para NAC [padrão interno]), sendo a voltagem do *tune* (*declustering potential*, DP) ajustada em 80 V. Para a quantificação de GSH, GSSG e padrão interno (NAC), foram utilizadas as respectivas transições de massa (MRM): GSH [M-H]⁺ *m/z* 308.0911 → 179.0462; GSSG [M-H]⁺ *m/z* 613.1592 → 355.0741 e [M-H]⁺⁺ (*m/z* 307.0863 → 177.0328) e NAC [M-H]⁺ *m/z* 164.0 → 76.0215. A quantificação das razões GSH/NAC e GSSG/NAC foi feita pela integração dos picos (programa MultQuant, versão 3.0, Sciex). As concentrações de GSH e GSSG foram plotadas sobre uma curva padrão e normalizadas por milhão de células.

3.14 Ensaios funcionais

3.14.1 Avaliação da migração celular

O ensaio de *wound healing* para avaliação da migração celular foi feito de acordo com o descrito por Liang *et al.* (2007) com algumas modificações. HUVECs (densidade inicial de 2×10^5 células) foram cultivadas em placas de cultura de 35 mm de diâmetro por 2 dias, seguido de um dia de cultivo adicional em meio carenciado (RPMI contendo BSA 0,2 %). Posteriormente foi feita uma fenda ao longo da monocamada de células com auxílio de uma ponteira de 200 μ L, sendo os *debris* celulares decorrentes dessa ação removidos por lavagens com PBS. As células foram, então, tratadas com PBS (controle), fase móvel evaporada (FM) ou HOUU (50, 100 e 200 μ M), preparados em PBS, por 10 min, a 37 °C, em estufa com atmosfera úmida e 5 % CO₂. Após remoção dos tratamentos, meio carenciado foi adicionado. A migração das células foi acompanhada em microscópio de contraste de fase invertido (Eclipse Ti, Nikon), com aumento de 4x e a captura de imagens feita em dois momentos - imediatamente após os tratamentos e 18 h depois. Marcas

com caneta permanente foram feitas nas placas e serviram como referência para que as fotos fossem tiradas no mesmo lugar. Para cada imagem, a distância arbitrária entre um lado e outro da fenda foi medida em seis pontos diferentes com auxílio do programa ImageJ. Os dados foram obtidos pela subtração da mensuração feita no início (0 h) pela que foi feita no final do experimento (18 h).

3.14.2 Avaliação da capacidade de adesão das HUVECs sobre a fibronectina

HUVECs confluentes foram descoladas com EDTA (0,5 mM) e distribuídas em microtubos (1×10^6 células/microtubo) contendo RPMI modificado acrescido de BSA (0,2 %). Paralelamente, antes do destacamento da placa, células foram reduzidas com TCEP (200 μ M) por 15 min. Em seguida, as células foram incubadas por 30 min, em temperatura ambiente e agitação suave, com os seguintes tratamentos: quercetina-3-rutinosídeo (10 μ M), bacitracina (100 μ M), miricitrina (100 μ M), peptídeo RGDS (500 μ M) ácido p-cloromercurobenzenosulfônico (pCMBS, 100 μ M), TCEP (200 μ M), diamida (200 μ M) ou HOOU (75 e 100 μ M), todos preparados em meio de cultura modificado suplementado com BSA (0,2 %). Como controle, as células foram incubadas apenas com meio de cultura modificado suplementado ou fase móvel seca. Após esse período, as células foram distribuídas ($2,5 \times 10^4$) em placas de 96 poços previamente recobertas com fibronectina (10 μ g/ml) e incubadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. A adesão foi acompanhada após de 30 e 90 minutos do plaqueamento. Para tal, após cada tempo indicado, o sobrenadante foi removido e os poços foram lavados com PBS gelado, seguido de uma etapa de fixação das células aderentes com metanol, por 10 min a -20 °C. Após remoção do excesso de metanol por lavagens sucessivas com água destilada, as células foram incubadas solução de cristal violeta (0,1 % em metanol 25 %) por

30 min em temperatura ambiente. O excesso do corante foi removido com sucessivas lavagens com água destilada e a fração incorporada pelas células foi solubilizada com SDS (1 %). Finalmente, foi feita a leitura das placas em leitor de microplacas (Synergy H1 Hybrid, BioTek) a 600 nm. Os resultados foram expressos com relação aos valores de absorbância obtidos das células incubadas com meio de cultura modificado.

3.14.3 Avaliação do descolamento de HUVECs

HUVECs (densidade inicial de 5×10^4 células) cultivadas em placas de 24 poços ao longo de 2 dias. Após esse período, o sobrenadante foi removido, os poços foram lavados com PBS e as células foram incubadas com PBS, fase móvel evaporada ou HOOU (50 – 400 μ M em PBS) por 10 min em estufa a 37 °C, com atmosfera úmida contendo 5 % de CO₂. Após remoção dos tratamentos, os poços foram gentilmente lavados com PBS e as células que permaneceram aderidas foram contadas em câmara de Neubauer. Paralelamente, os poços tratados também foram analisados em microscópio invertido (Eclipse TI, Nikon) para avaliação da morfologia celular.

3.15 Avaliação do ácido úrico como substrato para peroxidases do sobrenadante de HUVECs

3.15.1 Ensaio de atividade enzimática

A presença de peroxidases no sobrenadante da cultura de HUVECs e a possibilidade do ácido úrico ser substrato foi primeiramente investigada com o ensaio do *Amplex® Red*. Trata-se de um reagente cuja oxidação por peroxidases, na presença de H₂O₂, gera um produto de cor avermelhada (resorufina) que pode ser avaliado por espectroscopia de fluorescência. A condição experimental testada

envolveu, ainda, a presença de urato, substrato que competiu com o *Amplex* pela oxidação da enzima. Para a realização do ensaio, HUVECs foram cultivadas em placas de 100 mm de diâmetro (densidade inicial de $1,5 \times 10^6$ células) por 4 dias. Após lavagem com PBS, foram adicionados 5 ml de meio RPMI sem suplementação de SFB e sem vermelho de fenol. Após 1 h e 30 min de cultivo, o sobrenadante foi coletado e concentrado por ultrafiltração (Amicon®Ultra, 10 kDa, Millipore) e o conteúdo proteico foi quantificado com o reagente de *Bradford* (BRADFORD, 1976). As reações foram preparadas em placas de 96 poços próprias para leitura de fluorescência pela mistura de sobrenadante (10 µg de proteína), *Amplex Red* (50 µM) e H₂O₂ (50 µM), na ausência ou presença de ácido úrico (200 e 500 µM), sendo o volume final ajustado até 200 µl com PBS. A formação de resorufina foi acompanhada ao longo de 1 h 30 min, a 37 °C, em leitor de microplacas (Em = 560 nm e Ex = 590). Os resultados foram normalizados pela fluorescência basal de um poço contendo apenas sobrenadante e *Amplex Red* e expressos como taxa de consumo de *Amplex Red*/min.

3.15.2 Detecção do hidroxissourato

A obtenção do sobrenadante das culturas de HUVEC foi feita conforme descrito no item anterior. As reações foram preparadas em microtubos pela mistura de sobrenadante (20 µg de proteína), ácido úrico (200 µM) e H₂O₂ (50 µM), sendo o volume final ajustado até 150 µl com PBS. Após 30 min de incubação a 37 °C, sob agitação (600 rpm), às misturas reacionais foi adicionado acetonitrila contendo padrão interno (alantoína ¹³C₂, ¹⁵N₄, 1,66 µM), sendo o volume final composto por 40% do primeiro e 60% do segundo. Após incubação por 10 min a 4°C, as amostras foram centrifugadas por outros 10 min a 15000g e 4°C.

As amostras foram carregadas em um sistema Nexera UPLC (Shimadzu), com coluna UPLC BEH Amida 1,7 μ M (2,1 \times 100 mm, Acquity Waters) e eluídas a um fluxo de 0,2 ml/min, com acetato de amônio (10 mM, pH 6,8) como fase móvel A e acetonitrila como fase móvel B. O gradiente para eluição dos compostos foi: 0-1 min com 90% de B; 1-2 min com 50% de B; 2-8 min com 50 % de B; 9-15 min com 90% de B, mantendo 90% de B por 5 min para equilíbrio e preparo da coluna para a eluição da amostra seguinte. A temperatura da coluna foi ajustada em 25 °C e o volume de injeção 10 μ L. A análise em espectrômetro de massas foi feita em um triplo quadrupolo (*Triple-TOF*® 600, ABSciex) acoplado à fonte de ionização por *electrospray* (ESI), operando no modo negativo, a 350 °C e tensão de pulverização de 4500 V. A energia de colisão usada para gerar os fragmentos foi de 20 V e a voltagem do *tune* (DP) ajustada em 80 V. A detecção do hidroxissourato (HOU) foi realizada com a transição de massa (MRM) m/z 183,0108 \rightarrow 140,0102. A quantificação relativa foi feita pela razão entre a área integrada do pico obtido para o HOU e o pico obtido para o padrão interno (alantoína marcada, m/z 163,0316 \rightarrow 118,0209), em cada condição experimental.

3.16 Análises estatísticas

A tabelas de estabilidade do hidroperóxido de urato e os valores de intensidade média de fluorescência foram expressos como a média \pm desvio padrão de dois e três experimentos independentes, respectivamente. Todas as outras análises foram expressas como a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes. As análises estatísticas foram feitas por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelos pós-testes de *Bonferroni* ou *Newman-*

Keuls (o pós-teste está assinalado nas legendas). Foram consideradas significativas diferenças com $*p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da estabilidade do hidroperóxido de urato gerado pela síntese química

As atividades de pesquisa do nosso laboratório concentram-se, principalmente, na caracterização, detecção e efeitos biológicos do HOOU, um produto da oxidação do AU por heme peroxidases. A padronização da síntese química do HOOU (PATRICIO et al., 2015) foi fundamental para o desenvolvimento dos nossos estudos, uma vez que viabilizou a produção de maiores concentrações do peróxido, bem como o emprego em reações com proteínas recombinantes e tratamento de células não inflamatórias.

A meia vida do HOOU sintetizado artificialmente é curta (PATRICIO et al., 2015) e poderia causar algumas restrições práticas para o desenvolvimento dos experimentos. Os processos de evaporação, com argônio e bomba de vácuo, não só eliminam o remanescente de acetonitrila, mas também parecem evaporar o amônio da fase móvel. Certamente, essa acidificação deve contribuir para a decomposição mais rápida da amostra de HOOU. Diante disso, foi testada sua estabilidade em solução tamponante (PBS 10 mM, pH 7,4) ou água (em volume equivalente ao do tampão), ao longo de 30 min. A quantificação foi feita pelo coeficiente de absorvidade do HOOU ($\epsilon_{308} = 6.537 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Conforme observado na tabela a seguir, o tamponamento foi eficiente na prevenção da degradação do oxidante. Após 30 minutos, a concentração de HOOU da amostra com PBS era apenas 13% menor que a concentração inicial (tabela 1). Por outro lado, na amostra acrescida de água, já com 10 min foi verificada diferença significativa com relação à amostra inicial, sendo que ao final da análise a concentração de HOOU era 30% menor (tabela 1).

Tabela 1 - Concentração de hidroperóxido de urato na amostra tamponada e não-tamponada

Tempo (min)	Concentração de HOOU (μM)	
	Amostra com PBS	Amostra com água
0	1023 \pm 49,5	966 \pm 22,63
10	961,5 \pm 62,93	856,5 \pm 13,43*
20	920,5 \pm 34,64	735 \pm 21,21*
30	896 \pm 52,33	685,5 \pm 17,68*

*Indica diferença significativa pela análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*. * p < 0,05 em relação ao tempo 0.

A verificação da eficiência do tamponamento na estabilidade do HOOU foi fundamental para o andamento de todo o trabalho. Alinhar a síntese com as etapas subsequentes de um experimento, sem dúvida, não é trivial. A estabilização do HOOU pelo tamponamento permitiu que o trabalho pudesse ser executado sempre da melhor forma, por isso foi mantida em todos os experimentos.

4.2 Oxidação da proteína dissulfeto isomerase recombinante após tratamento com hidroperóxido de urato

Patricio *et al.* (2015) mostraram que o HOOU é capaz de oxidar os aminoácidos livres cisteína e metionina e também GSH. Além disso, já foi observado que esse peróxido reage muito rapidamente com as PRXs1 e 2 (CARVALHO *et al.*, 2017). Diante disso, tornou-se bastante plausível a possibilidade de outras proteínas tiólicas serem alvos da ação oxidante do HOOU.

A PDI é uma ditiol-dissulfeto oxidoreductase e chaperona, localizada principalmente no RE, onde participa do enovelamento de proteínas nascentes (LAURINDO; PESCATORE; DE CASTRO FERNANDES, 2012). Além do RE, a PDI também está localizada no citosol, na superfície da célula e no meio extracelular (secretada), sendo esse *pool* muito menos abundante (TURANO *et al.*, 2002). Uma

vez que a atividade catalítica da PDI está relacionada aos motivos conservados CXXC (presentes nos domínios *a* e *a'*), modificações oxidativas causadas pelo HOOU poderiam modular reações que envolvem PDI e proteínas clientes.

Nossas primeiras investigações buscaram verificar se a PDI poderia ser, de fato, alvo do HOOU. Para isso, a proteína recombinante foi incubada com o peróxido ao longo de 10 min e os tióis livres remanescentes foram quantificados pelo ensaio do DTNB. A figura 8 mostra que o tratamento com concentrações crescentes de HOOU resultou em decaimento dose-dependente do conteúdo de grupamentos -SH.

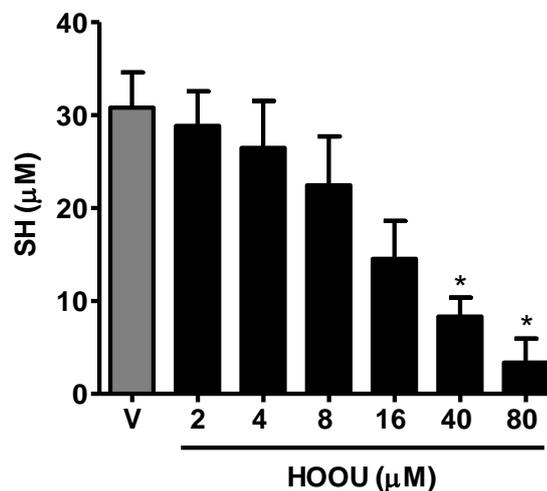


Figura 8. Reação com hidroperóxido de urato promove oxidação dos tióis livres da proteína dissulfeto isomerase. PDI reduzida (10 μM) foi incubada com acetato de amônio (veículo, V) ou diferentes concentrações de HOOU (2 - 80 μM). As reações foram feitas em tampão fosfato (100 mM, pH 7,4) contendo DTPA (0,1 mM) a 25°C, por 10 min. Os tióis remanescentes foram medidos pela reação com o DTNB e análise fotométrica em 412 nm ($\epsilon_{412\text{nm}} = 13,600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes. As análises estatísticas foram feitas por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*. * $p < 0,05$ em relação ao veículo.

Dado esse primeiro indício, uma análise mais detalhada, incluindo a caracterização dos produtos da referida oxidação foi feita. Então, amostras de PDI reduzida incubadas por 10 min com veículo ou HOOU em concentrações estequiométricas (20 μM - estequiométrico em relação às cisteínas reativas e 40 μM

– estequiométrico em relação às cisteínas totais dos sítios reativos) ou excesso (200 μM) foram digeridas com tripsina e submetidas à análise nLC-MS/MS. A cobertura da proteína foi satisfatória, sempre maior que 75%. O apêndice A contém tabelas com todos os peptídeos identificados com maior relevância em amostras controle (tabela A1) e tratadas (tabela A2).

Nas amostras incubadas com veículo foram verificadas algumas metioninas oxidadas e os triptofanos W¹²⁸ e W⁴⁰⁷ hidroxilados, possivelmente em decorrência da preparação da amostra (tabela 2). Além disso, uma vez que tióis livres foram alquilados com IAM, peptídeos contendo os motivos redox ativos puderam ser identificados com adição de massa de 114 kDa. O peptídeo contendo parte do domínio *a*, que se estende do resíduo 43 ao 57, apresentou as cisteínas C⁵³ e C⁵⁶ alquiladas (⁴³YLLVEFYAPWCRGHCRK⁵⁷). Com isso, foi observado um pico com massa monoisotópica igual a 1941,8943 Da e *m/z* 648,3054 (carregado com três cargas) (tabela 2 e figura 9 A). O domínio *a'* carbamidometilado (³⁸⁷NVFVEFYAPWCRGHCRK⁴⁰¹) foi identificado com massa monoisotópica de 1912,8496 Da e *m/z* 638,6238, também com 3 H⁺ (tabela 3 e figura 9 B). Esse último peptídeo ainda foi identificado com massa monoisotópica de 2040,9418 e *m/z* 511,2460 (4 H⁺), caracterizando a presença de um *missed cleavage* (³⁸⁶KNVFVEFYAPWCRGHCRK⁴⁰¹) (tabela 2 e apêndice B, figura B1).

Tabela 2 – nLC-MS/MS dos peptídeos modificados encontrados em amostras de PDI incubadas com veículo^a

Peptídeos ^b	Massa teórica (M + H)	m/z ^c	Massa experimental	<i>Ion</i> <i>score</i> ^d	Aminoácido modificado (modificação e adição de massa)
YLLVEFYAPWCGHCK	1942,8985	648,3054	1941,8943	58	C ⁵³ e C ⁵⁶ (carbamidometilação, + 57)
EADDIVNWLK	1218,6007	609,8057	1217,5967	57	W ¹²⁸ (hidroxilação, + 16)
EECPAVR	860,3937	430,6983	859,3821	39	C ³¹² (carbamidometilação, + 57)
LITLEEEMTK	1222,6241	611,8150	1221,6154	80	M ³²⁴ (oxidação, + 16)
IKPHLMSQELPEDWDKQPVK	2434,2441	609,3168	2433,2381	62	M ³⁵⁶ (oxidação, + 16)
KNVFVEFYAPWCGHCK	2041,9418	511,2460	2040,9418	78	C ³⁹⁷ e C ⁴⁰⁰ (carbamidometilação, + 57)
NVFVEFYAPWCGHCK	1913,8468	638,6238	1912,8496	63	C ³⁹⁷ e C ⁴⁰⁰ (carbamidometilação, + 57)
QLAPIWDK	986,5312	493,7675	985,5205	42	W ⁴⁰⁷ (hidroxilação, + 16)
MDSTANEVEAVK	1309,5946	655,3000	1308,5855	107	M ⁴²⁵ (oxidação, + 16)
FLESGGQDGAGDDDDLEDL EEAEPPDMEEDDDQK	3773,4416	944,1203	3772,4522	90	M ⁴⁹⁵ (oxidação, + 16)

^a PDI reduzida (10 µM) foi incubada com veículo em tampão fosfato (100 mM, pH 7,4) contendo DTPA (0,1 mM), a 25 °C por 10 min. As amostras foram alquiladas em tampão desnaturante, digeridas com tripsina e submetidas a análise nLC-MS/MS conforme descrito nos procedimentos experimentais;

^b Apenas os peptídeos modificados estão mostrados. A porcentagem de cobertura da sequência da proteína foi, em média, 84 %;

^c Todos os peptídeos foram carregados com 3 cargas, exceto KNVFVEFYAPWCGHCK que foi carregado com 4 cargas

^d *Ion score* é $-10 \log(P)$ onde P é a probabilidade de o sinal observado ser um evento aleatório. Em média, para esse experimento, *ion score* individual > 59 indica extensa identidade ou homologia ($p < 0,01$).

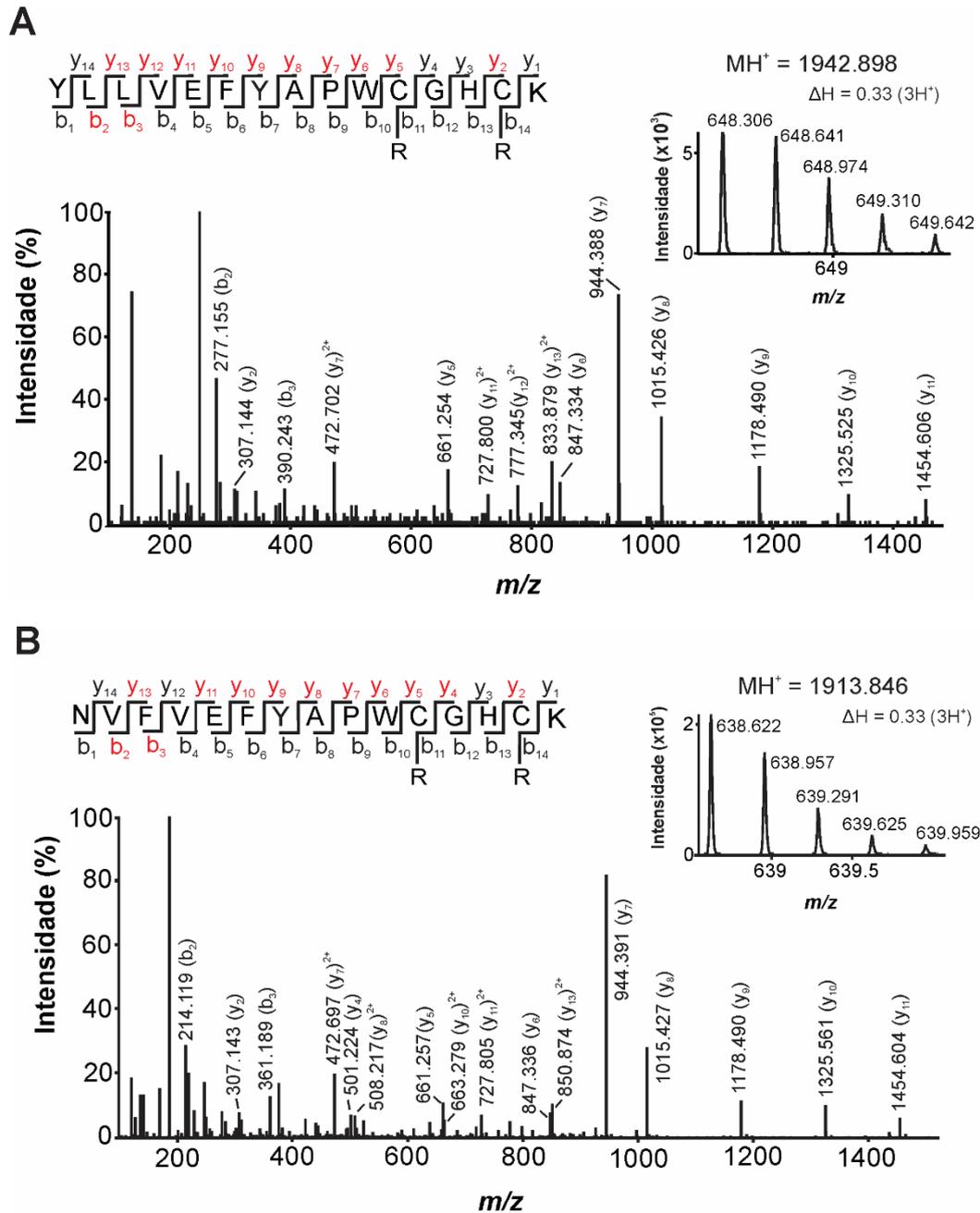


Figura 9. Identificação dos peptídeos contendo cisteínas catalíticas alquiladas da proteína dissulfeto isomerase incubada com veículo. PDI reduzida (10 μ M) foi incubada com veículo (acetato de amônio), em tampão fosfato (100 mM, pH 7,4) contendo DTPA (0,1 mM), a 25°C, por 10 min. Em seguida, as amostras foram submetidas à digestão com tripsina e submetidas à análise por nLC-MS/MS (A). Sequenciamento do pico com m/z igual a 648,3054, correspondente ao peptídeo $^3YLLVEFYAPWCRGHCRK^{57}$ (massa monoisotópica 1941,8943 Da) com 3 cargas, referente ao domínio a alquilado. 100% intensidade = 1×10^3 . (B) Sequenciamento do pico com m/z igual a 638,6238, correspondente ao peptídeo $^3NVFVEFYAPWCRGHCRK^{401}$ (massa monoisotópica 1912,8496 Da) com 3 cargas, referente ao domínio a' alquilado. 100% intensidade = $4,1 \times 10^4$. Os inserts à esquerda representam os fragmentos das series b e y previstos teoricamente; os fragmentos encontrados no espectro experimental estão destacados em vermelho. Os inserts à direita mostram a distribuição monoisotópica do peptídeo com 3 cargas. Os espectros são representativos de triplicatas experimentais.

Em amostras tratadas com H₂O₂, à semelhança daquelas incubadas com veículo, foram identificados resíduos de metionina oxidadas e triptofanos hidroxilados (tabela 3). O tratamento com concentrações equimolares ou excesso de peróxido promoveu de forma generalizada a oxidação e consequente formação de ponte dissulfeto entre cisteínas vicinais dos domínios *a* e *a'*. A figura 3 mostra espectros representativos dos peptídeos oxidados com 40 µM de H₂O₂. O peptídeo ⁴³YLLVEFYAPWCGHCK⁵⁷ – 2H foi identificado com massa monoisotópica de 1825,8305 Da e *m/z* igual a 609,6174 (3 H⁺) (tabela 3 e figura 10 A) e o peptídeo ³⁸⁷NVFVEFYAPWCGHCK⁴⁰¹ – 2H com massa monoisotópica de 1796,7834 Da e *m/z* 599,9351 (3H⁺) (tabela 3 e figura 10 B). O peptídeo com *missed cleaved* ³⁸⁶KNVFVEFYAPWCGHCK⁴⁰¹ – 2H também foi detectado com massa monoisotópica 1924,8760 e *m/z* 482,2255, carregado com 4 cargas (tabela 3 e apêndice B, figura B2).

Em seguida, foi feita quantificação relativa dos peptídeos com os tióis alquilados e oxidados detectados em todas as condições experimentais. Para isso, foi calculada a razão entre a área do cromatograma extraído do peptídeo selecionado (*XIC*) e aquela do cromatograma dos íons totais (*TIC*) de cada amostra individual. Assim, observou-se que a intensidade de peptídeos (relativos aos dois domínios catalíticos) com cisteínas alquiladas foi significativamente menor em amostras de proteína incubadas com H₂O₂ (figura 11 A e C). Nota-se, inclusive, um efeito dose-dependente. Além disso, a redução de cisteínas carbamidometiladas foi acompanhada do incremento da detecção de cisteínas envolvidas em pontes dissulfeto (figura 11 B e D).

Tabela 3 – nLC-MS/MS dos peptídeos modificados encontrados em amostras de PDI tratadas com HOOU (40 µM)^a

Peptídeos ^b	Massa teórica (M + H)	m/z ^c	Massa experimental	<i>Ion</i> <i>score</i> ^d	Aminoácidos modificados (modificação e adição/redução de massa)
YLLVEFYAPWCGHCK	1826,8399	609,6174	1825,8305	82	C ⁵³ - C ⁵⁶ (dissulfeto, -2H)
EADDIVNWLK	1218,6007	609,8002	1217,5859	60	W ¹²⁸ (hidroxilação, + 16)
LITLEEEMTK	1222,6241	611,8121	1221,6096	83	M ³²⁴ (oxidação, + 16)
ITEFCHR	962,4519	321,4858	961,4355	31	C ³⁴³ (carbamidometilação, + 57)
IKPHLMSQELPEDWDK	1981,9694	661,3233	1980,9481	59	M ³⁵⁶ (oxidação, + 16)
IKPHLMSQELPEDWDKQPVK	2434,2441	609,3187	2433,2457	77	M ³⁵⁶ (oxidação, + 16)
KNVFVEFYAPWCGHCK	1925,8832	482,2255	1924,8760	38	C ³⁹⁷ - C ⁴⁰⁰ (dissulfeto, -2H)
NVFVEFYAPWCGHCK	1797,7883	599,9351	1796,7834	62	C ³⁹⁷ - C ⁴⁰⁰ (dissulfeto, -2H)
QLAPIWDK	986,5312	493,7666	985,5187	44	W ⁴⁰⁷ (hidroxilação, + 16)
MDSTANEVEAVK	1309,5946	655,2946	1308,5746	104	M ⁴²⁵ (oxidação, + 16)
KFLESGGQDGAGDDDDLED	3901,5366	976,1421	3900,5393	50	M ⁴⁹⁵ (oxidação, + 16)
LEEAEPPDMEEDDDQK					
FLESGGQDGAGDDDDLEDL	3773,4416	944,1187	3772,4455	95	M ⁴⁹⁵ (oxidação, + 16)
EEAEPPDMEEDDDQK					

^aPDI reduzida (10 µM) foi incubada com HOOU (40 µM) em tampão fosfato (100 mM, pH 7,4) contendo DTPA (0,1 mM), a 25 °C por 10 min. As amostras foram alquiladas em tampão desnaturante, digeridas com tripsina e submetidas a análise nLC-MS/MS conforme descrito nos procedimentos experimentais;

^b Apenas os peptídeos modificados estão mostrados. A porcentagem de cobertura da sequência da proteína foi, em média, 75 %;

^c Todos os peptídeos foram carregados com 3 cargas, exceto KNVFVEFYAPWCGHCK que foi carregado com 4 cargas.

^d *Ion score* é $-10 \log(P)$ onde P é a probabilidade de o sinal observado ser um evento aleatório. Em média, para esse experimento, *ion score* individual > 58 indica extensa identidade ou homologia ($p < 0,01$).

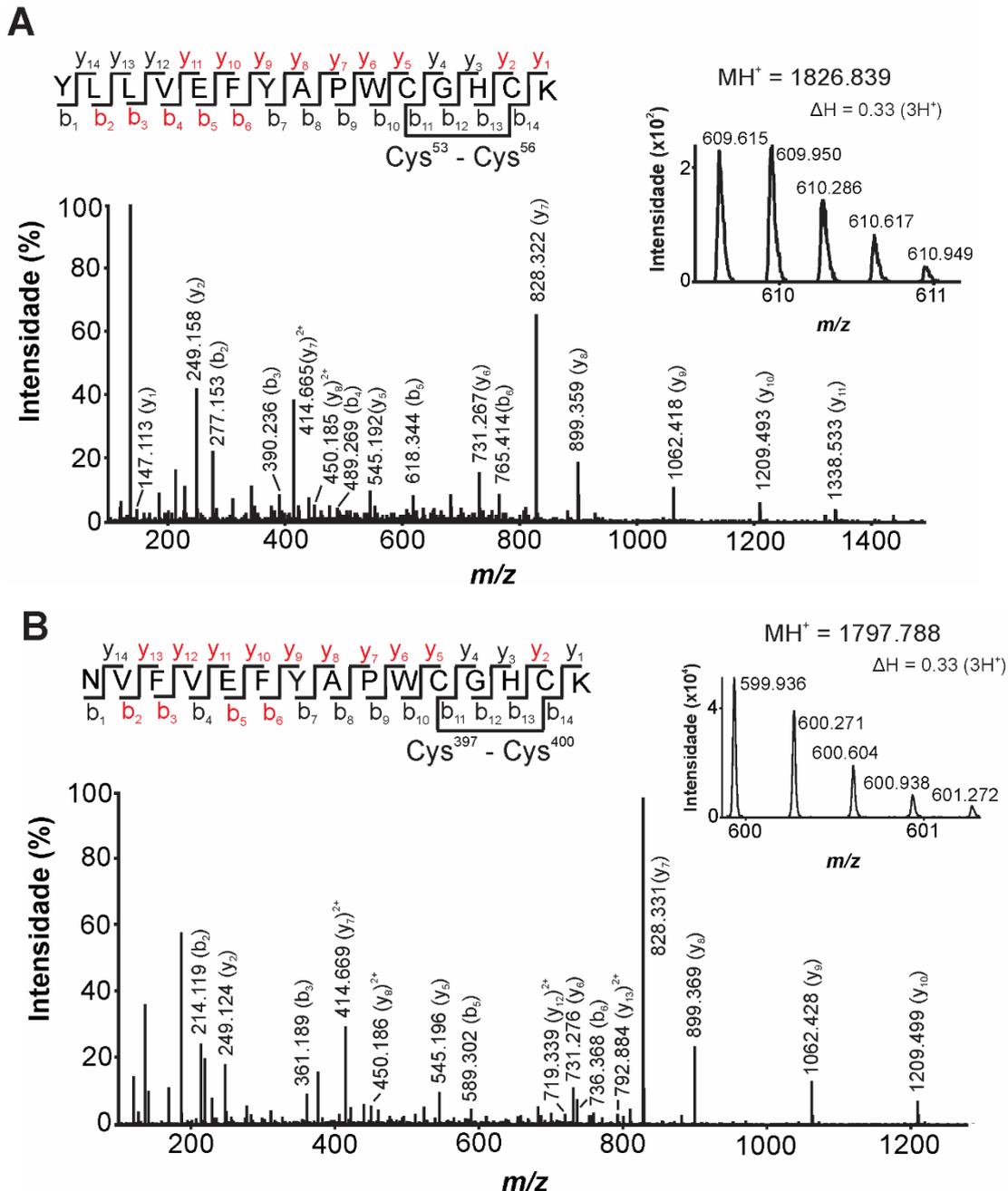


Figura 10. Identificação dos peptídeos contendo cisteínas catalíticas oxidadas da proteína dissulfeto isomerase incubada com hidroperóxido de urato. PDI reduzida (10 μ M) foi incubada com H₂O₂ (40 μ M), em tampão fosfato (100 mM, pH 7,4) contendo DTPA (0,1 mM), a 25°C, por 10 min. Em seguida, as amostras foram digeridas com tripsina e submetidas à análise por nLC-MS/MS (A) Sequenciamento do pico com m/z igual a 609,6174, correspondente ao peptídeo ⁴³YLLVFEFYAPWCGHCK⁵⁷- 2H (massa monoisotópica 1825,8305 Da) com 3 cargas, referente ao domínio a oxidado. 100% intensidade = 1,1 x 10³. (B) Sequenciamento do pico com m/z igual a 599,9351, correspondente ao peptídeo ³⁸⁷NVFVEFYAPWCGHCK⁴⁰¹ - 2H (massa monoisotópica 1796,7834 Da) com 3 cargas, referente ao domínio a' oxidado. 100% intensidade = 1,8 x 10⁴. Os inserts à esquerda representam os fragmentos das series b e y previstos teoricamente; os fragmentos encontrados no espectro experimental estão destacados em vermelho. Os inserts à direita mostram a distribuição monoisotópica do peptídeo com 3 cargas. Os espectros são representativos de triplicatas experimentais.

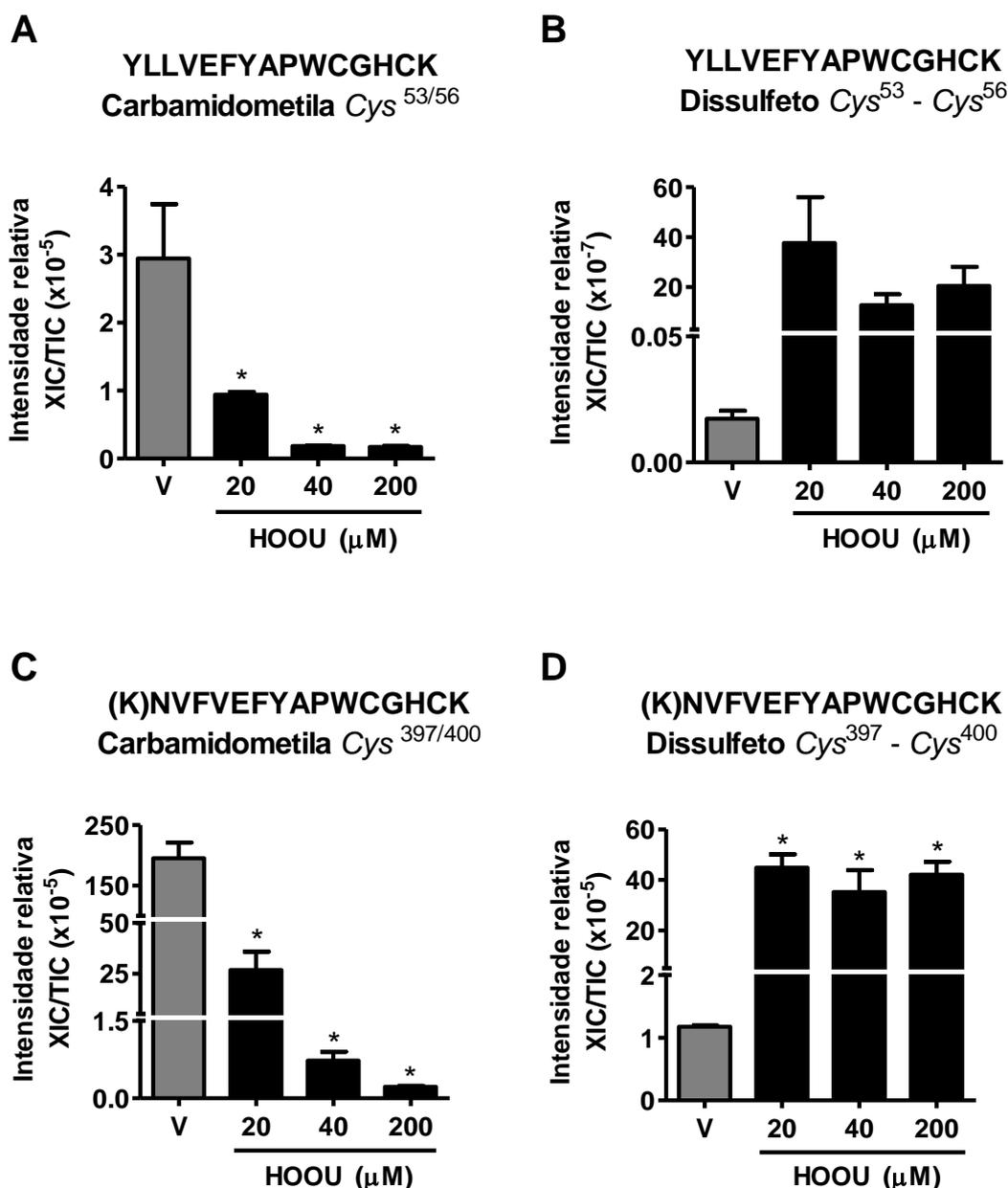


Figura 11. Quantificação relativa dos peptídeos alquilados e oxidados da proteína dissulfeto isomerase incubada com veículo e hidróperóxido de urato. A estimativa dos eventos de alquilação e oxidação para cada condição experimental foi feita pela razão XIC/TIC. Quantificação relativa de peptídeos ⁴³YLLVEFYAPWCGHCK⁵⁷ alquilados (A) e oxidados (B) referentes ao domínio a. Quantificação relativa de peptídeos ³⁸⁷(K)NVFVEFYAPWCGHCK⁴⁰¹ alquilados (C) e oxidados (D) referentes ao domínio a'. Os resultados estão expressos como a média ± erro padrão da média de três experimentos independentes. As análises estatísticas foram feitas por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*. *p < 0,05 em relação à amostra tratada com veículo (V)

O conjunto de evidências apresentadas até aqui apontam a PDI – mais especificamente as cisteínas dos sítios catalíticos - como potencial alvo da ação

oxidante do H₂O₂. Esses resultados complementam estudos anteriores do laboratório que mostraram cinética de reação favorável entre a proteína e o oxidante ($k = 6,0 \pm 0,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (PATRICIO, 2014). O fato das pontes dissulfeto terem sido as modificações mais relevantes, somado à ausência de detecção de adutos entre o H₂O₂ e resíduos de cisteína (dados não mostrados), estão de acordo com a oxidação por dois elétrons usualmente promovida por peróxidos (REDDIE; CARROLL, 2008). Outros possíveis produtos de oxidação dos tióis da PDI, tais como derivados sulfênicos, sulfínicos e sulfônicos, também não foram detectados em nossas condições experimentais (dados não mostrados). Essa noção já era esperada, visto que os pares de cisteínas catalíticas são vicinais e a oxidação do primeiro resíduo implica em rápido ataque nucleofílico e formação de dissulfeto (REDDIE; CARROLL, 2008).

A oxidação dos tióis reativos da PDI e formação de pontes dissulfeto é reversível por redutores biológicos *in vivo*, mas isso não exclui o potencial danoso dessa modificação. O meio biológico é dinâmico e, nesse sentido, é fundamental considerar aspectos como o tempo de ação dos redutores e o fato de que o H₂O₂, provavelmente, é gerado continuamente em situações inflamatórias.

É importante comentar que os espectros de MS obtidos para os peptídeos trípticos relativos ao domínio *a* apresentaram intensidade dez vezes menor quando comparados àqueles obtidos para o domínio *a'*. Essa dificuldade de detecção já foi relatada anteriormente e parece estar relacionada ao caráter hidrofóbico da maioria dos aminoácidos que compõem esse domínio (DOST et al., 2012; KAETZEL et al., 2004; PEIXOTO et al., 2018).

4.3 Agregação e inativação da proteína dissulfeto isomerase recombinante após tratamento com hidroperóxido de urato

Conforme observado anteriormente, as investigações por LC-MS/MS resultaram apenas na detecção de modificações em resíduos de cisteínas dos sítios redox ativos, nos quais a oxidação pelo H₂O₂ promoveu a formação de pontes dissulfeto. Modificações em outros resíduos de aminoácidos, potencialmente irreversíveis, podem alterar a estrutura e função da proteína de forma permanente (DAVIES, 2005, 2016), por isso, os ensaios de verificação de agregação e atividade enzimática mostrados a seguir foram particularmente interessantes.

Primeiramente, a reação da PDI com todas as concentrações de H₂O₂ usadas produziu agregados de alto peso molecular, possivelmente formados por duas (aproximadamente 110 kDa) até cinco proteínas (aproximadamente 275 kDa) (figura 12 A). Esses agregados representaram, aproximadamente, entre 10 e 13% do total de PDI (figura 12 B). É importante ressaltar que as amostras incubadas com acetato de amônio (veículo) apresentaram uma pequena fração de agregados (figura 12 A e B), contudo, isso deve estar mais relacionado à manipulação da amostra do que à algum efeito do acetato de amônio.

Além de formar agregados, as amostras tratadas com H₂O₂ foram menos eficientes em precipitar a insulina. A atividade redutase da enzima foi especialmente prejudicada com 40 e 200 μ M de H₂O₂, sendo o tempo de latência dessas amostras significativamente maior em comparação à amostra controle (figura 12 C).

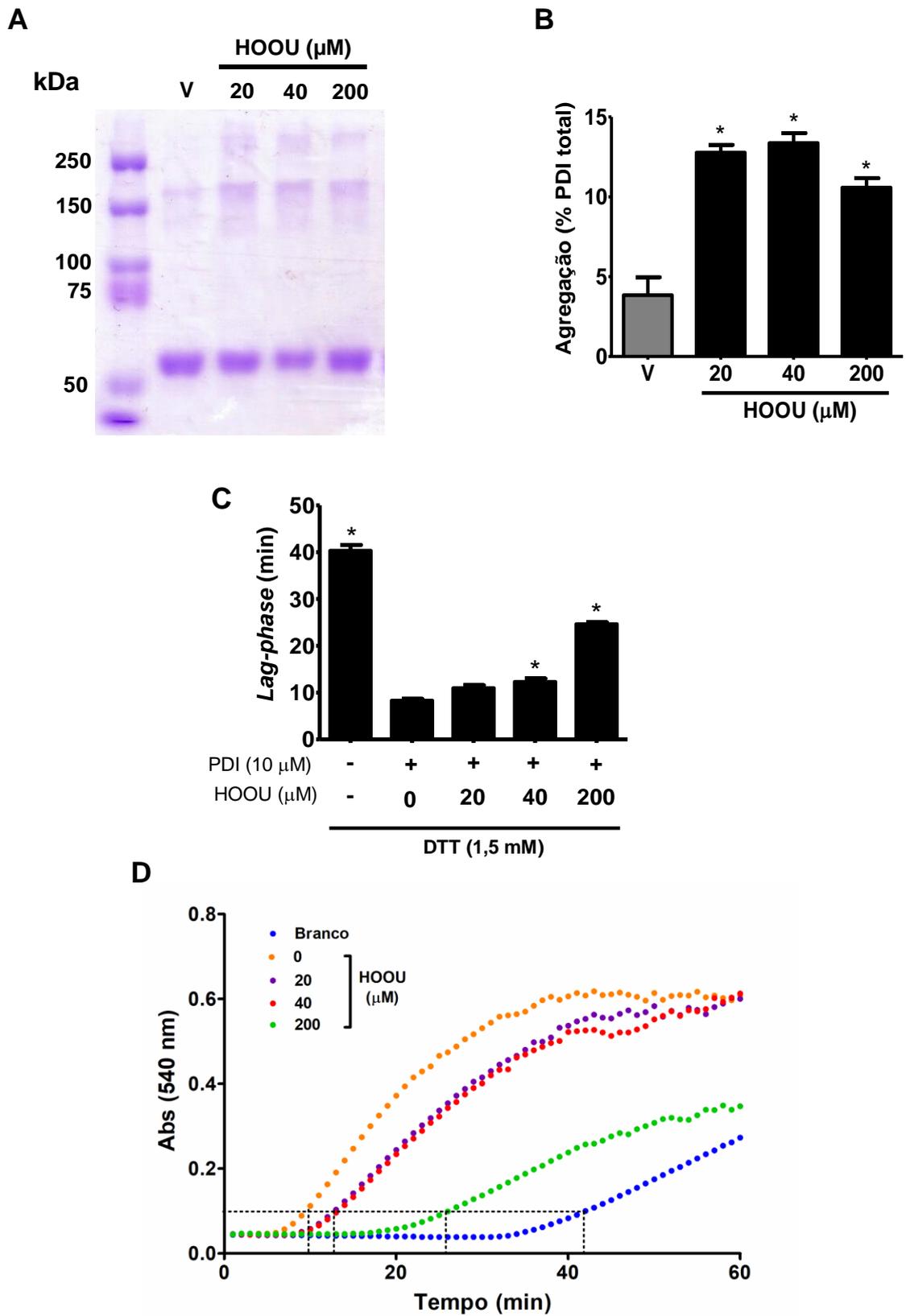


Figura 12. Reação com hidroperóxido de urato promove agregação e inativação da proteína dissulfeto isomerase. PDI reduzida (10 μ M) foi incubada com acetato de amônio (veículo, V) ou diferentes concentrações de HOOU (20, 40 e 200 μ M). As reações foram feitas em tampão fosfato (100 mM, pH 7,4) contendo DTPA (0,1 mM), a 25°C, por 10 min. Alíquotas das reações contendo 1,5 μ M de proteína foram usadas para investigação da agregação e atividade. (A) Amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (8%), sendo possível verificar a presença de monômeros (55 kDa) e agregados de alto peso molecular. (B) Os géis obtidos foram escaneados e a intensidade relativa das bandas correspondentes à PDI (monômeros e agregados de alto peso molecular) foi quantificada por densitometria. Para cada tratamento, a porcentagem da PDI agregada foi calculada pela razão PDI agregada/PDI total x 100. (C) A inativação da PDI foi monitorada pelo aumento do tempo de latência (*Lag-phase*) necessário para que a precipitação da insulina atingisse um valor de 0,1, a 540 nm. (D) Cinética representativa. Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão da média de dois experimentos independentes. As análises estatísticas foram feitas por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*. *p < 0,05 em relação à amostra sem HOOU.

O HOOU é um oxidante descrito e caracterizado recentemente, por isso a literatura ainda é incipiente com relação aos mecanismos químicos e fenômenos biológicos decorrentes da sua ação oxidante. Foi mostrado que a incubação de peptídeos contendo cisteínas com eletrófilos derivados da oxidação do urato, incluindo o HOOU, resulta na formação de dímeros, sendo o *cross-link* presente nos resíduos de cisteína. Nesses estudos não foram observados adutos entre os peptídeos e os produtos de oxidação do urato. Além disso, a incubação de GAPDH com um sistema gerador de HOOU resultou na inativação da enzima, condição parcialmente revertida pela adição de DTT, mas, nenhum aduto foi encontrado. Por outro lado, foram identificados adutos covalentes entre o HOOU (e outros eletrófilos derivados da oxidação do urato) e resíduos de lisina da albumina (TURNER et al., 2018). Essa modificação, contudo, não foi verificada em nossos experimentos com a PDI.

A agregação e inativação da PDI já foram verificadas após o tratamento da proteína com peroxinitrito. Nesse caso, o efeito é decorrente dos radicais derivados da decomposição desse oxidante, que parecem promover hidroxilação e nitração de

resíduos de tirosina e triptofano próximos aos sítios redox ativos da PDI (PEIXOTO et al., 2018). Não seria o caso, claro, do HOOU.

Tendo em vista o percentual de proteínas agregadas em relação ao total (figura 5 A e B), outras modificações, que não dissulfeto, parecem ser mais incomuns, fato que tornaria a detecção mais difícil. Além disso, as poucas informações disponíveis dificultam o direcionamento das buscas e estudos nesse sentido são pioneiros. É claro que qualquer conclusão a respeito da capacidade - ou não - do HOOU em promover outras modificações é prematura e requer suporte experimental adicional.

4.4 Tratamento com hidroperóxido de urato não é citotóxico para HUVECs

Uma vez que o HOOU pode ser gerado extracelularmente, no meio vascular, é plausível que vários tipos celulares entrem em contato com o oxidante. Em nosso laboratório linhas de pesquisa envolvendo neutrófilos e macrófagos já estão em andamento. No caso do presente projeto de doutoramento, as células escolhidas como modelo de estudo foram as células endoteliais, mais especificamente, células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs).

As células endoteliais formam uma monocamada que recobre a face interna dos vasos e artérias. Essa localização única permite integrar sinais físicos e neuro-humorais do sangue e dos tecidos circundantes para regular o tônus vascular, a adesão celular, a inflamação, o fenótipo e proliferação do músculo liso, bem como a tromboresistência. Alterações nessas funções abrem caminho para o desenvolvimento de uma diversidade de patologias vasculares, por exemplo, lesões ateroscleróticas. Portanto, é fundamental compreender os mecanismos moleculares e celulares que compõem e afetam a biologia endotelial.

O fato de o H₂O₂ ser um oxidante ainda pouco conhecido exige que estudos básicos sejam conduzidos, por exemplo com relação à sua citotoxicidade. Para isso, as HUVECs foram tratadas com diferentes concentrações de H₂O₂ por 10 min e, em seguida, o conteúdo de LDH do sobrenadante foi mensurado. A LDH é uma enzima citosólica, liberada para o meio extracelular quando a membrana plasmática sofre injúrias, tornando-se mais permeável. Conforme mostrado na figura 13 A, a atividade dessa enzima em amostras de sobrenadante de culturas tratadas com todas as concentrações de H₂O₂ (50 – 400 μ M) não foi significativamente diferente daquela observada em amostras controle ou tratadas com fase móvel evaporada. Não há dúvida de que uma fração de LDH é liberada mesmo quando as células são incubadas apenas com PBS ou fase móvel, mas a atividade detectada é, pelo menos, 50 vezes menor quando comparada a amostras incubadas com Triton X-100 (controle positivo, dado não mostrado). A citotoxicidade também foi avaliada pelo emprego das sondas nucleares fluorescentes HO e IP. A metodologia baseia-se no fato de que HO é permeável à membrana e marca, portanto, núcleos totais. Por outro lado, IP é impermeável e só acessa o núcleo celular em caso de alguma perturbação na membrana plasmática. Os resultados obtidos corroboraram com os anteriores, mostrando percentuais de morte muito baixos, sempre menores que 4% do total de células (figura 13 B e C).

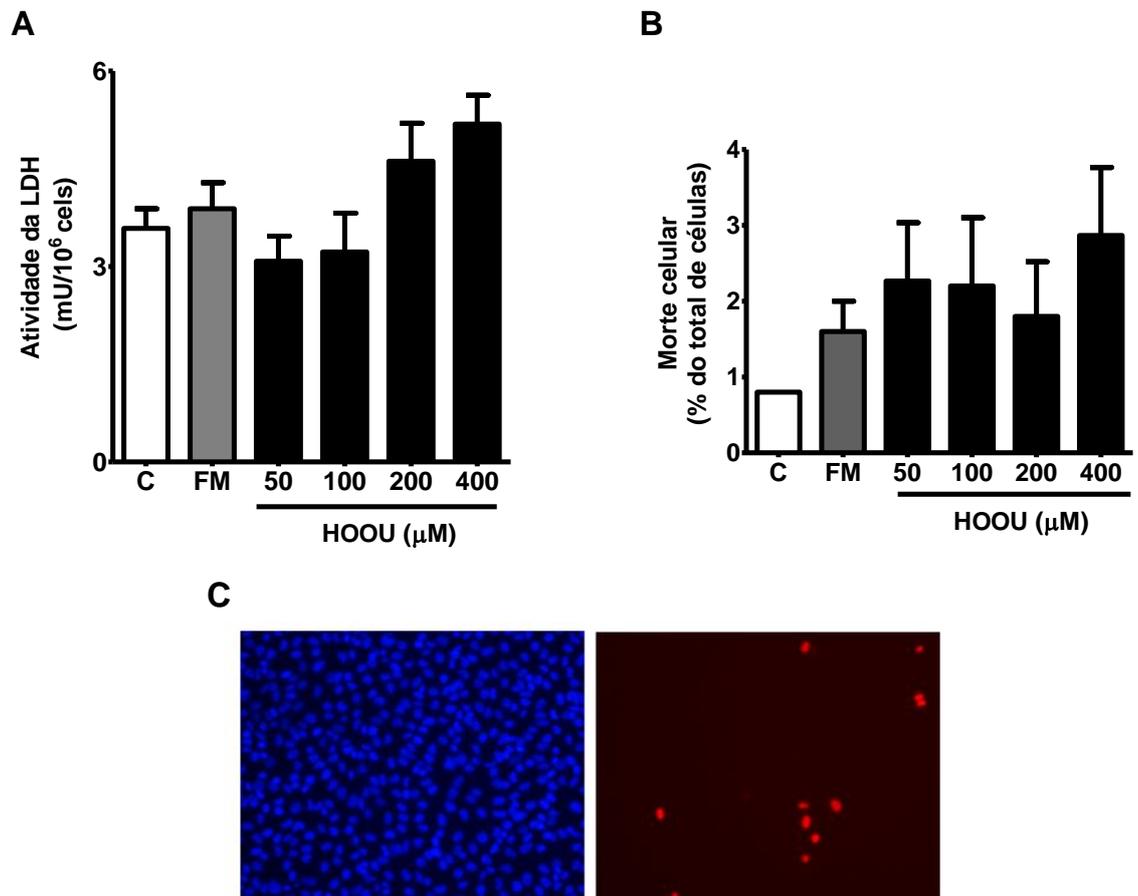


Figura 13. Viabilidade celular após tratamento com hidróperóxido de urato. HUVECs foram cultivadas em placas de 24 poços (densidade inicial de 5×10^4 células/poço) por 2 dias. Após 10 min de incubação com H₂O₂ (50 – 400 μM) ou fase móvel evaporada (FM), a viabilidade celular foi investigada. (A) A atividade da enzima lactato desidrogenase foi mensurada no sobrenadante das culturas por meio da absorbância do formazan ($\epsilon_{503\text{nm}} = 19.200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) e expressa como miliunidade por milhão (mU/10⁶) de células. (B) As células foram incubadas com Hoechst (HO) e iodeto de propídio (IP) e visualizadas em microscópio de fluorescência invertido. Um mínimo de 500 células foi contado em cada condição experimental e os resultados expressos como porcentagem de morte (células marcadas com IP ou HO azul claro e brilhante) em relação ao número total de células (marcadas com HO). (C) Imagem representativa das células incubadas com PBS e marcadas com HO e iodeto de propídio (aumento 10 x). Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes. As análises estatísticas foram feitas por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*.

As mesmas metodologias foram usadas para avaliar o potencial citotóxico do AU e os resultados obtidos mostraram que as células permanecem viáveis com tratamentos de até 400 μM (figura 14).

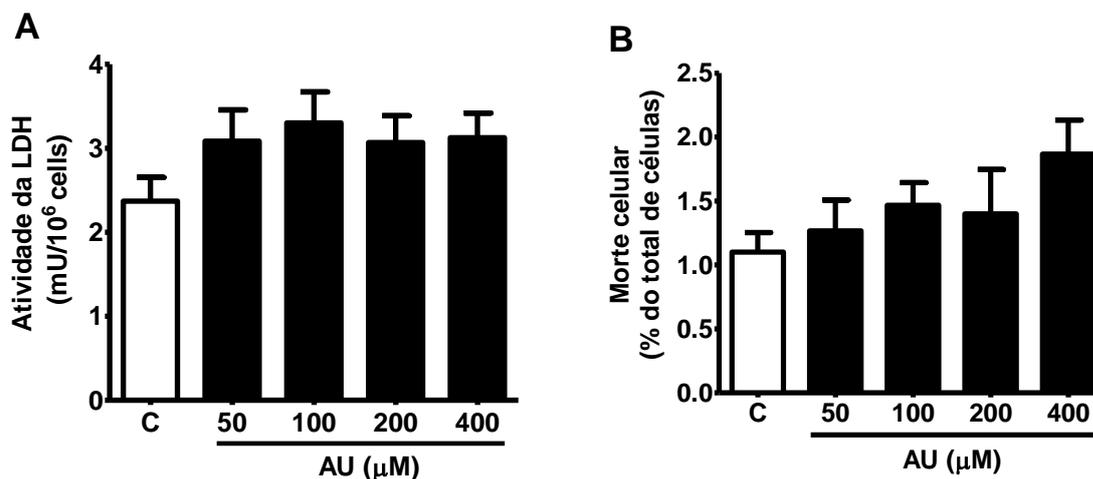


Figura 14. Viabilidade celular após tratamento com ácido úrico. HUVECs foram cultivadas em placas de 24 poços (densidade inicial de 5×10^4 células/poço) por 2 dias. Após 10 min de incubação com AU (50 – 400 μM) a viabilidade celular foi investigada. (A) A atividade da enzima lactato desidrogenase foi mensurada no sobrenadante das culturas por meio da absorbância do formazan ($\epsilon_{503\text{nm}} = 19.200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^1$) e expressa como miliunidade por milhão (mU/10⁶) de células. (B) As células foram incubadas com Hoechst (HO) e iodeto de propídio (IP) e visualizadas em microscópio de fluorescência invertido. Um mínimo de 500 células foi contado em cada condição experimental e os resultados expressos como porcentagem de morte (células marcadas com IP ou HO azul claro e brilhante) em relação ao número total de células (marcadas com HO). Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes. As análises estatísticas foram feitas por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*.

Ainda que tenhamos estabelecido que o HOOU, pelo menos até a concentração de 400 μM , não é citotóxico, procuramos fazer os tratamentos da maioria dos experimentos subsequentes com concentrações mais baixas do oxidante (até 200 - 250 μM) por considerarmos mais relevantes fisiologicamente.

4.5 Oxidação da proteína dissulfeto isomerase de superfície pelo hidroperóxido de urato

O RE é, sabidamente, um compartimento celular mais oxidativo. A razão GSH/GSSG de 3-5:1 favorece o enovelamento oxidativo (com formação de pontes dissulfeto) de proteínas recém-sintetizadas. Por outro lado, o citosol e o meio extracelular são mais redutores e, diferente daquela do RE, a fração de PDI expressa nesses locais parece funcionar, prioritariamente, como redutase de tióis proteicos [(ESSEX, 2009; HATAHET; RUDDOCK, 2009; LAURINDO; PESCATORE; DE CASTRO FERNANDES, 2012). Há que se observar, todavia, que o H₂O₂ reage muito rapidamente com outras proteínas citoplasmáticas (CARVALHO et al., 2017) e sua ação sobre a PDI deve ser pouco provável nesse compartimento em particular.

Diante dos fatores apontados, a PDIsc apresenta-se como um alvo provável para a ação do H₂O₂. Primeiro porque, conforme já mencionado, esse oxidante pode também ser gerado extracelularmente. Soma-se a isso o fato de não existirem evidências na literatura de outros oxidantes com ação mais eficaz. GSSG e H₂O₂, por exemplo, reagem com constantes de velocidade inferiores, de 188 e 17,3 M⁻¹ s⁻¹, respectivamente (LAPPI; RUDDOCK, 2011; PEIXOTO et al., 2018).

Para investigar essa hipótese, as HUVECs foram tratadas com H₂O₂ e, em seguida, foram marcadas com o MPB - alquilante impermeável à membrana plasmática - para detectar os tióis reduzidos remanescentes. A figura 15 mostra que a menor concentração de H₂O₂ usada (75 µM) foi capaz diminuir em aproximadamente 30% o total de PDI de superfície reduzida, enquanto que o tratamento com 150 µM resultou numa redução de 15%. Em outras palavras, as amostras incubadas com H₂O₂ apresentaram mais PDI oxidada em comparação às amostras que foram incubadas apenas com PBS ou fase móvel.

O *pool* extracelular de PDI representa uma fração muito pequena (em células endoteliais, por exemplo, estima-se que represente menos que 2%) do total encontrado nas células (ARAUJO et al., 2017; POPESCU; LUPU; LUPU, 2010), o que torna sua detecção metodologicamente trabalhosa. Ainda mais desafiador é investigar, ao mesmo tempo, variações no estado redox, que foi o que propusemos com os ensaios de biotilação da PDIs. Por isso, a diferença estatística sutil observada entre as amostras controle e tratadas não foi surpreendente.

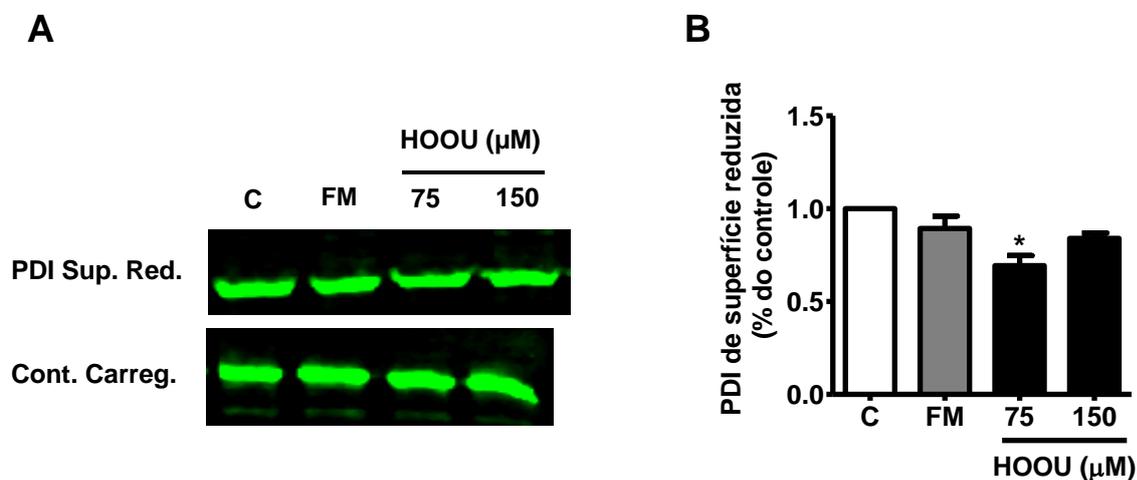


Figura 15. Hidroperóxido de urato promove oxidação da proteína dissulfeto isomerase da superfície celular. HUVECs foram cultivadas em placas de 35 mm de diâmetro (densidade inicial de 4×10^5 células/placa) por 1 dia. Após 10 min de incubação com PBS (controle, C), fase móvel evaporada (FM) ou HOOU (75 ou 150 μM) os tióis remanescentes foram alquilados com reagente impermeável à membrana plasmática conjugado à biotina (MPB) e precipitados com partículas recobertas com estreptavidina. Amostras de proteína foram separadas por eletroforese, transferidas para membranas de nitrocelulose e reveladas com anticorpo específico. (A) Membrana representativa. O painel superior mostra PDI de superfície reduzida (PDI Sup. Red.) após os diferentes tratamentos. O painel inferior é representativo do conteúdo restante da proteína (PDI de superfície oxidada e PDI intracelular total) e foi usado como controle de carregamento (Cont. Carreg.; apenas 2% do volume total obtido foi usado na eletroforese). (B) A quantificação das bandas foi feita por densitometria usando o programa Image Studio (LI-COR Biosciences). Os valores obtidos foram normalizados pelo controle de carregamento e os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes. As análises estatísticas foram feitas por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

Diversos estudos têm mostrado o envolvimento da PDIsC em processos redox dependentes, como por exemplo, internalização de vírus, regulação de metaloproteinases e sinalização de integrinas (GALLINA et al., 2002; MOR-COHEN, 2016; WAN et al., 2011; WILLEMS et al., 2010). Além disso, esse *pool* de proteínas parece ser especialmente importante em eventos vasculares, como ativação e agregação de plaquetas, trombose e remodelamento vascular (BEKENDAM; FLAUMENHAFT, 2016; ESSEX, 2009; TANAKA et al., 2016). No caso da célula endotelial, a atividade da PDIsC parece regular negativamente a coagulação pela modulação da exposição de fosfatidilserina e é fundamental para o remodelamento arterial anti-constritivo após injúria do vaso (POPESCU; LUPU; LUPU, 2010; TANAKA et al., 2016). Nesses casos, alterações no estado redox da PDI causadas pelo H₂O₂ poderiam afetar a atividade catalítica da enzima e, conseqüentemente, a homeostase vascular.

Conforme já mencionado, os dados da literatura são bastante expressivos com relação ao envolvimento da PDI extracelular em eventos vasculares, sendo discutido, inclusive, estratégias de inibição dessa proteína como potencial alvo antitrombótico (BEKENDAM; FLAUMENHAFT, 2016). É importante enfatizar, contudo, que a maioria das publicações empregam ferramentas de inibição ou regulação negativa da expressão da PDI e não apresentam análises mais específicas com relação aos mecanismos redox. Além disso, pelas estratégias experimentais utilizadas, o *pool* de PDI secretada e o que está na superfície da membrana plasmática tornam-se indistinguíveis. No nosso caso, apenas a PDIsC foi avaliada.

Também por meio da biotilação de proteínas de superfície verificamos a possibilidade da subunidade β 1 de integrinas ter sido oxidada pelo H₂O₂. Pela

figura 16, a seguir, é possível verificar que não houve diferença com significância estatística na comparação entre amostras controle e tratadas, mostrando uma seletividade do HOOU pela PDI quando comparada à integrina.

As integrinas podem não ser alvos relevantes porque seus resíduos de cisteína, apesar de numerosos, não estão tão acessíveis (MOR-COHEN, 2016), mas nenhuma conclusão definitiva deve ser tirada visto que experimentos adicionais seriam necessários. De qualquer forma, as integrinas são particularmente interessantes pois são substratos importantes da PDI (MOR-COHEN, 2016) e, mais à frente, aspectos funcionais envolvendo essas duas proteínas serão abordados e discutidos.

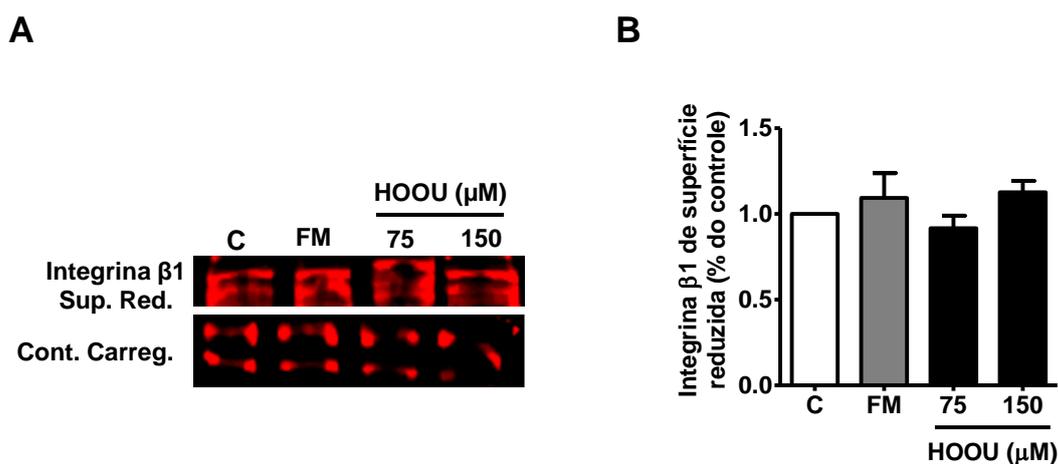


Figura 16. Hidroperóxido de urato não promove oxidação da subunidade β1 de integrinas. HUVECs foram cultivadas em placas de 35 mm de diâmetro (densidade inicial de 4×10^5 células/placa) por 1 dia. Após 10 min de incubação com PBS (controle, C), fase móvel evaporada (FM) ou HOOU (75 ou 150 μM) os tióis remanescentes foram alquilados com reagente impermeável à membrana plasmática conjugado à biotina (MPB) e precipitados com partículas recobertas com estreptavidina. Amostras de proteína foram separadas por eletroforese, transferidas para membranas de nitrocelulose e reveladas com anticorpo específico. (A) Membrana representativa. O painel superior mostra integrina β1 de superfície reduzida (integrina β1 Sup. Red.) após os diferentes tratamentos. O painel inferior é representativo do conteúdo restante da proteína (subunidade β1 de superfície oxidada e subunidade β1 intracelular total) e foi usado como controle de carregamento (Cont. Carreg.; apenas 2% do volume total obtido foi usado na eletroforese). (B) A quantificação das bandas foi feita por densitometria usando o programa Image Studio (LI-COR Biosciences). Os valores obtidos foram normalizados pelo controle de carregamento e os resultados foram expressos como a média ± erro padrão da média de três experimentos independentes. As análises estatísticas foram feitas por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*.

4.6 Oxidação de tióis de superfície totais pelo hidroperóxido de urato

Os resultados de biotinylação mostraram que a oxidação da PDI de superfície pelo H₂O₂ foi sutil (máximo de 30%) e não apresentou efeito dose-resposta. Pareceu razoável, portanto, investigar se antes mesmo dos tratamentos os grupos tiólicos das proteínas de superfície já não estariam majoritariamente oxidados.

Usando uma sonda alquilante fluorescente (Alexa Maleimida) foi possível verificar que os tióis extracelulares de HUVECs cultivadas por 24 horas (o mesmo tempo usado nos ensaios de biotinylação) já estavam oxidados nas amostras controle. O tratamento com diamida, claro, não produziu oxidação adicional, mas a incubação das células com agente redutor resultou em intenso sinal fluorescente (figura 17).

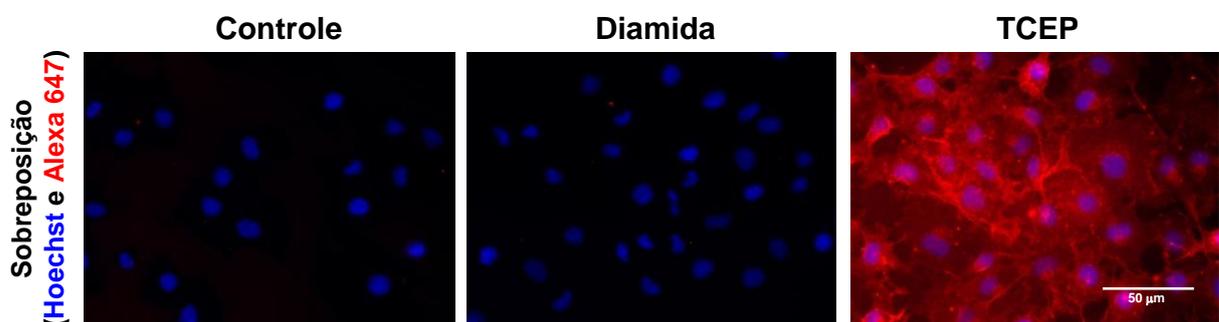


Figura 17. Tióis extracelulares de HUVECs cultivadas por 24 h estão majoritariamente oxidados. Células foram cultivadas por 24 h em placas de 24 poços (densidade inicial de $2,5 \times 10^4$ células/poço) e incubadas com meio de cultura modificado, diamida (200 μ M) ou TCEP (1 mM). Em seguida, foram marcadas com Hoechst (5 μ g/mL, azul) e Alexa Fluor® 647 C₂ Maleimida (3 μ M, vermelho). As imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência invertido. Barra de aumento = 50 μ m

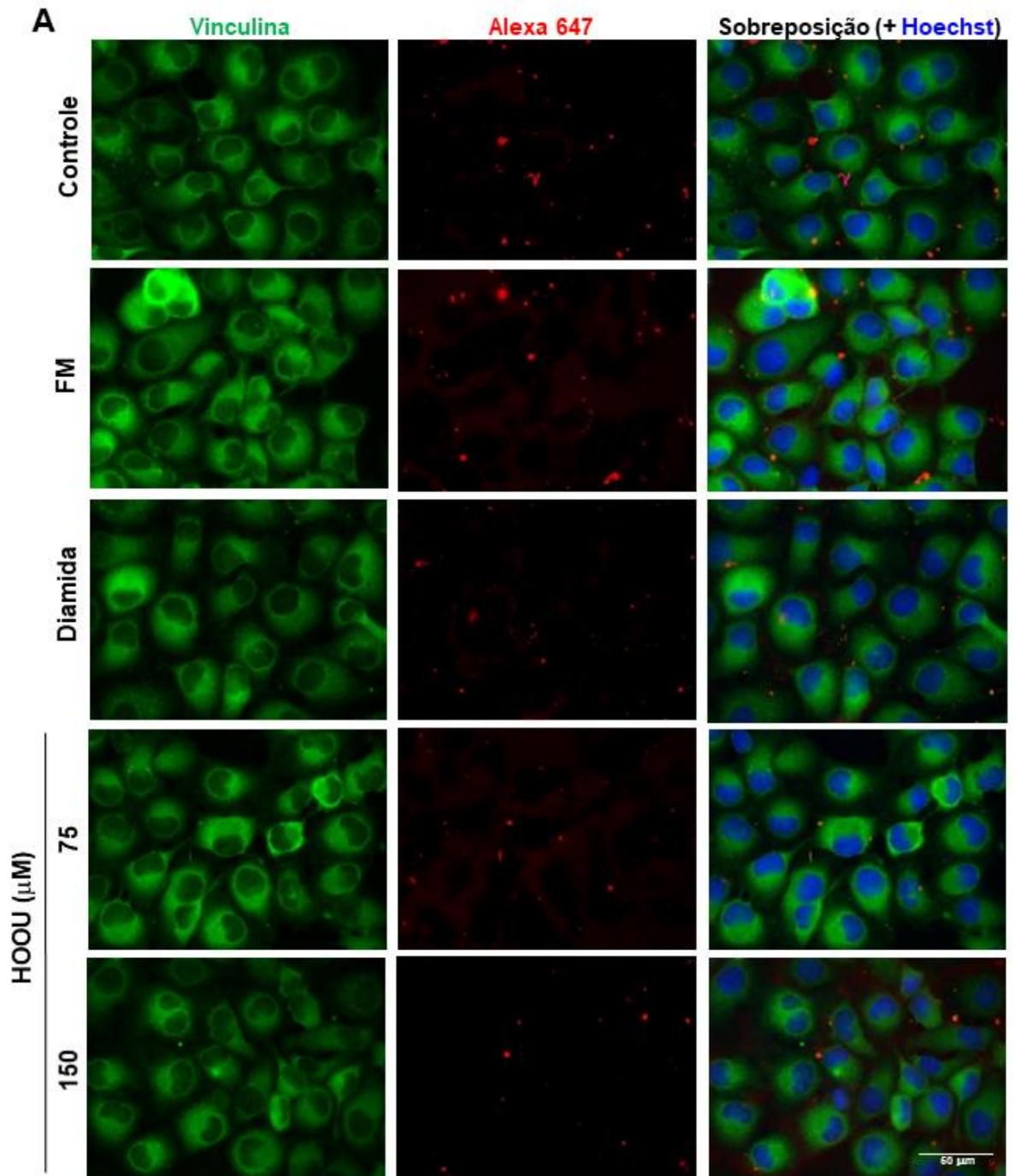
Um trabalho publicado por Ponamarczuk e colaboradores (2018) demonstrou que o recobrimento das placas de cultura com matriz extracelular (MEC) contribui para a manutenção dos tióis da superfície celular no estado reduzido. Por esse motivo, avaliamos, em seguida, o conteúdo de tióis de células cultivadas por 24

horas sobre fibronectina. Novamente, de maneira muito similar ao observado anteriormente, os tióis estavam majoritariamente oxidados (figura 18).



Figura 18. Tióis extracelulares de HUVECs cultivadas por 24 h sobre fibronectina estão majoritariamente oxidados. Células foram cultivadas por 24 h em placas de 24 poços (densidade inicial de $2,5 \times 10^4$ células/poço) preparadas com lamínulas recobertas com fibronectina (10 $\mu\text{g/mL}$). Após incubação com meio de cultura, as células foram marcadas com Hoechst (5 $\mu\text{g/mL}$, azul), Alexa Fluor® 647 C₂ Maleimida (3 μM , vermelho) e anticorpo anti-vinculina (verde). As imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência invertido. Barra de aumento = 50 μm

A alquilação dos tióis com o Alexa Maleimida foi mais eficaz após um período curto de cultivo das células. Com 2 horas de semeadura sobre fibronectina a maioria das HUVECs já estava aderida e expressou maior conteúdo de tióis, sugerindo que a oxidação dos resíduos de cisteína acontece ao longo do processo de aderência da célula sobre o substrato (figura 19 A). Após incubação com os oxidantes, o sinal fluorescente - indicativo da presença de tióis livres na superfície das células - foi reduzido significativamente. Na comparação com o controle, os tratamentos resultaram em oxidações médias variando entre 40 % (150 μM) e 65 % (diamida) (Figura 19 A e B).



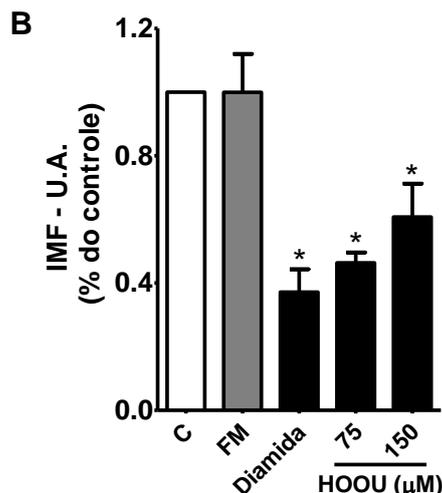
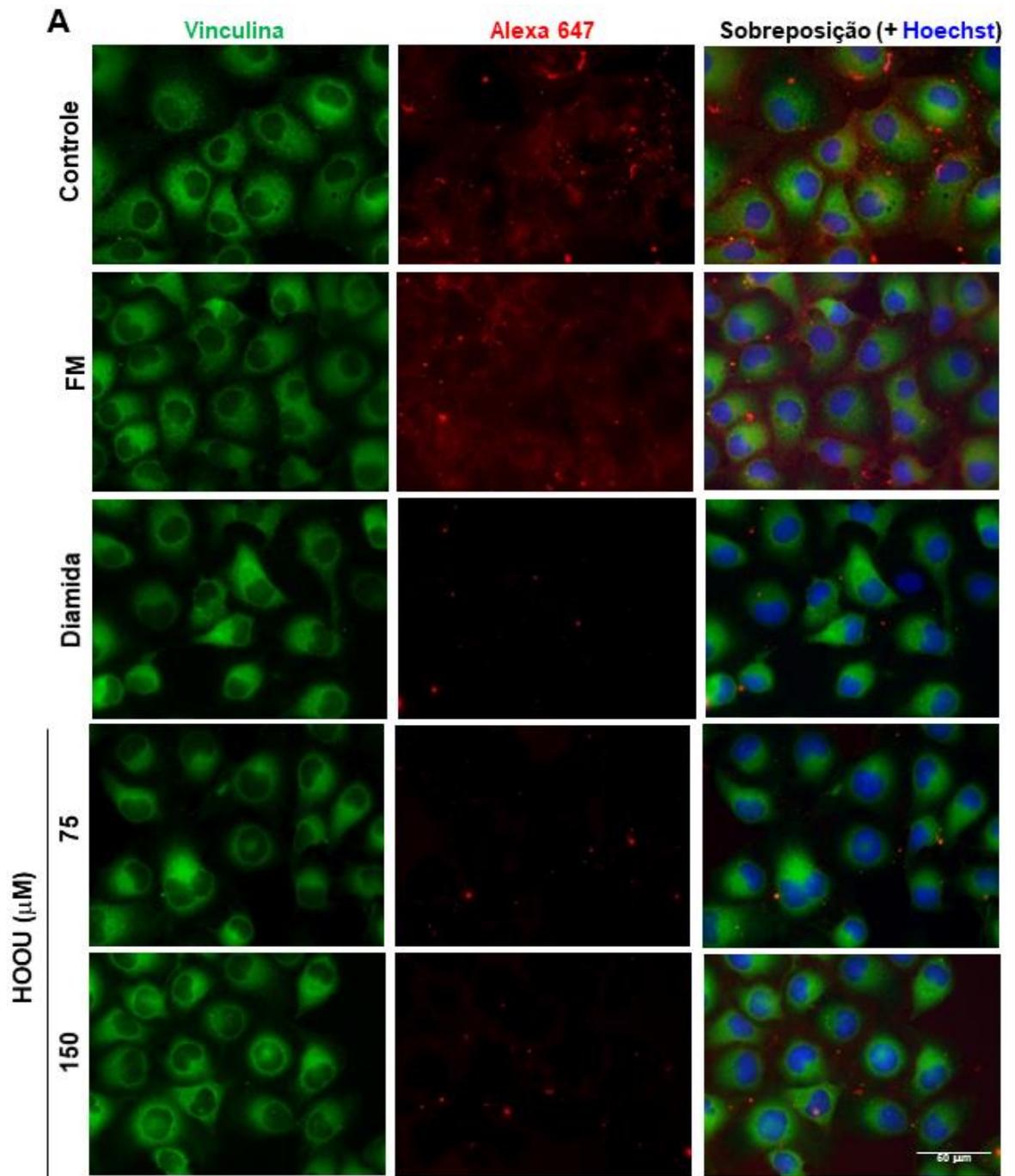


Figura 19. Hidroperóxido de urato promove oxidação de tióis de superfície em HUVECs. (A) Células foram cultivadas por 2 h em placas de 24 poços (5×10^4 células/poço) preparadas com lamínulas recobertas com fibronectina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), seguindo o tratamento com meio de cultura modificado (controle, C), fase móvel evaporada (FM), diamida (200 μM) ou HOOU (75 ou 150 μM), por 15 min. Após marcação com Hoechst (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, azul), Alexa Fluor® 647 C₂ Maleimida (3 μM , vermelho) e anticorpo anti-vinculina (verde) as imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência invertido. Barra de aumento = 50 μm . (B) A intensidade média de fluorescência (IMF) foi calculada a partir da marcação com Alexa 647 (vermelha) e representa a razão entre o somatório da fluorescência medida em cada célula pelo número total de células contadas (80 – 100 por experimento). A quantificação da fluorescência foi calculada com o programa ImageJ Fiji. Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes. As análises estatísticas foram feitas por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

Nesse modelo de cultivo de 2 h, a pré-incubação com TCEP (200 μM) também foi eficiente em aumentar a quantidade de tióis e, portanto, o sinal fluorescente (figura 20 A). A fluorescência absoluta de células controle previamente reduzidas foi de $1854,7 \pm 273$ U.A., enquanto que daquelas não incubadas com TCEP foi de $572,9 \pm 236,13$ U.A. Foi possível, então, detectar um efeito ainda mais pronunciado dos oxidantes: os decaimentos do sinal fluorescente emitido pelas culturas tratadas com diamida, HOOU 75 μM e 150 μM foram de 80, 85 e 65 %, respectivamente, na comparação com o sinal das células controle (figura 20 A e B).



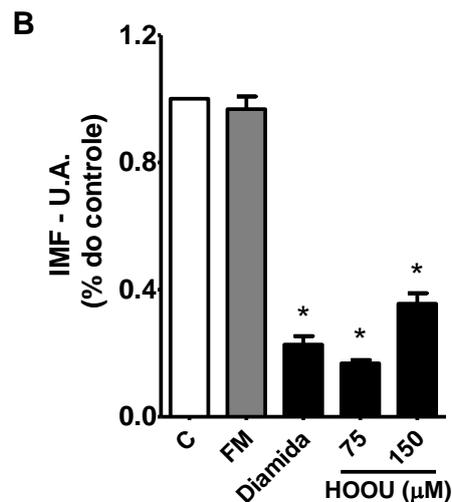


Figura 20. Hidroperóxido de urato promove oxidação de tióis de superfície em HUVECs pré-tratadas com TCEP. (A) Células foram cultivadas por 2 h em placas de 24 poços (5×10^4 células/poço) preparadas com laminulas recobertas com fibronectina ($10 \mu\text{g/mL}$). Após redução com TCEP ($200 \mu\text{M}$), seguiu-se o tratamento com meio de cultura modificado (controle, C), fase móvel evaporada (FM), diamida ($200 \mu\text{M}$) ou HOOU (75 ou $150 \mu\text{M}$), por 15 min. Após marcação com Hoechst ($5 \mu\text{g/mL}$, azul), Alexa Fluor® 647 C₂ Maleimida ($3 \mu\text{M}$, vermelho) e anticorpo anti-vinculina (verde) as imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência invertido. Barra de aumento = $50 \mu\text{m}$. (B) A intensidade média de fluorescência (IMF) foi calculada a partir da marcação com Alexa 647 (vermelha) e representa a razão entre o somatório da fluorescência medida em cada célula pelo número total de células contadas (80 – 100 por experimento). A quantificação da fluorescência foi calculada com o programa ImageJ Fiji. Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes. As análises estatísticas foram feitas por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

Ainda que pelos experimentos de biotilação não tenhamos observado efeito do HOOU especificamente sobre integrinas, a estratégia de usar a sonda alquilante fluorescente foi interessante porque mostrou um efeito oxidativo geral. Ou seja, outras proteínas podem ser oxidadas pelo HOOU. Além disso, como observado na oxidação específica da PDI de superfície (figura 15 A e B), a oxidação dos tióis totais pelo HOOU não foi dose-dependente, sendo a menor concentração mais eficiente. Esse efeito diferencial poderia ser decorrente de alguma resposta compensatória, mas como não foi possível investigar com mais detalhes carecemos de outras evidências que contribuam para uma melhor explicação do fenômeno.

Finalmente, é interessante comentar o fato de que em todas as análises feitas com células cultivadas sobre fibronectina (figura 18, 19 A e 20 A) marcações vermelhas – decorrentes da incubação com a sonda alquilante - intensas e puntiformes foram observadas. Tratam-se, sem dúvida, de locais em que há abundância de proteínas reduzidas, mas experimentos adicionais serão necessários para melhor compreensão da natureza biológica desses achados.

4.7 Avaliação da razão GSH/GSSG de HUVECs tratadas com hidroperóxido de urato

Até agora nossos resultados estiveram direcionados para os efeitos oxidativos extracelulares do H₂O₂. Para investigar o efeito oxidante no meio intracelular medimos a razão GSH/GSSG. A análise da figura 21 C permite constatar que o tratamento com H₂O₂ resulta em diminuição da razão GSH/GSSG de forma dose-dependente. É importante notar que a referida alteração é decorrente do aumento da concentração de GSSG (figura 21 B) e não do consumo de GSH (figura 21 A). Como a concentração de GSH citoplasmática é muito superior à de GSSG, uma pequena alteração na concentração daquela pode não ser detectada.

A produção exacerbada de oxidantes e alterações na homeostase redox estão relacionadas ao desenvolvimento e progressão de diversas patologias, incluindo as cardiovasculares (SIES; BERNDT; JONES, 2017). Nesse sentido, a diminuição da razão GSH/GSSG é indicativa de que o H₂O₂ altera o estado redox da célula, torna o ambiente intracelular mais oxidativo e, portanto, poderia contribuir para esses estados patológicos. É notável o fato de que a menor concentração do peróxido usada (20 μ M) já tenha resultado em alteração do parâmetro analisado de forma significativa, indicando que mesmo a geração sutil do H₂O₂ pode ter efeitos prejudiciais.

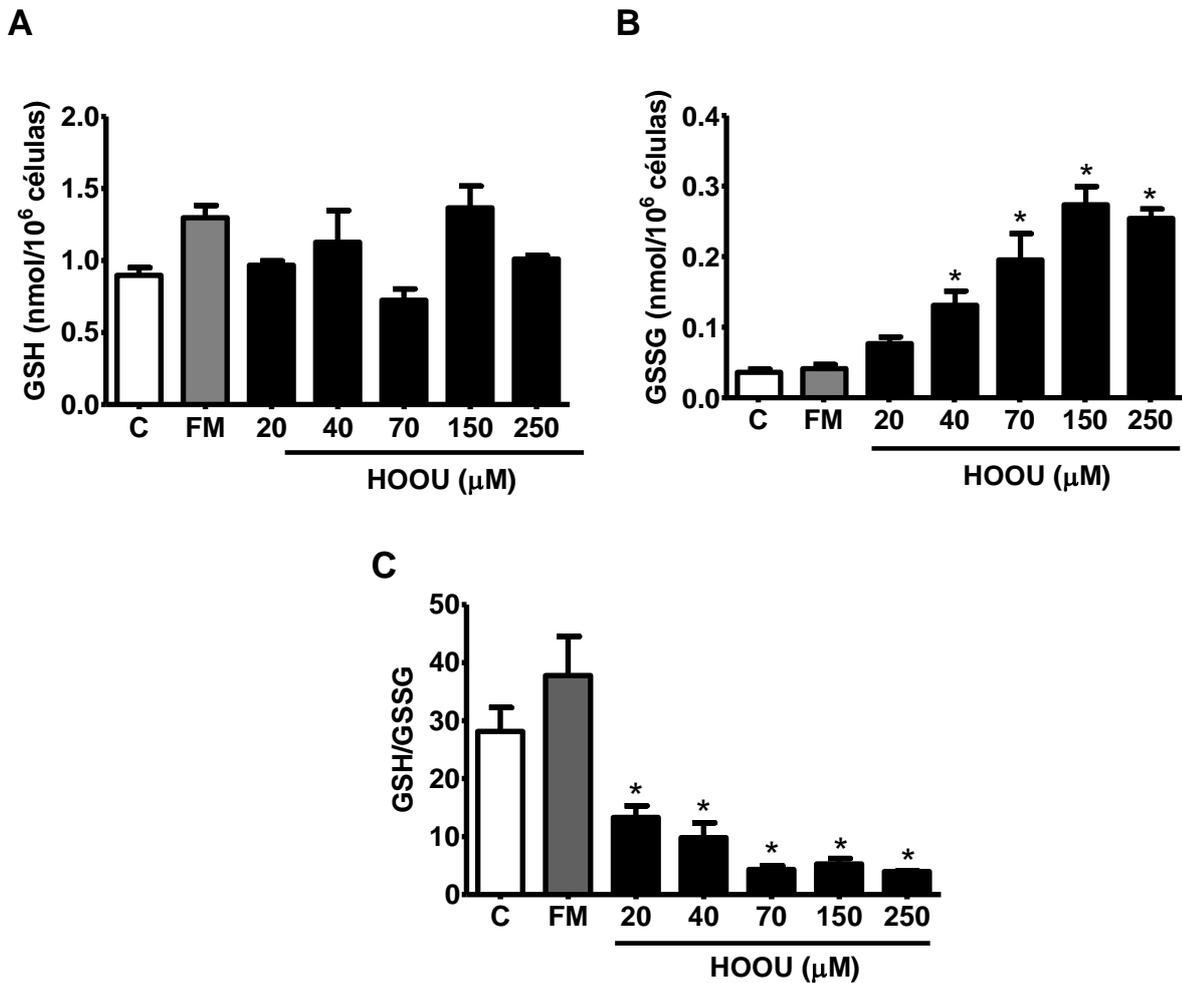


Figura 21. Hidroperóxido de urato altera a razão glutatona oxidada/reduzida de HUVECs.

Células confluentes foram descoladas da placa de cultura e distribuídas em microtubos (3×10^6 células/microtubo), seguido do tratamento apenas com PBS (controle, C), fase móvel evaporada (FM) ou H₂O₂ (20 - 250 μM) por 10 min. A quantificação de GSH (A) e GSSG (B) foi feita por LC-MS/MS, usando as respectivas transições de massa m/z 308.0911 \rightarrow 179.0462 e m/z 613.1592 \rightarrow 355.0741.

(C) Razão GSH/GSSG. A quantificação das razões GSH/NAC e GSSG/NAC foi feita pela integração dos picos. As concentrações de GSH e GSSG foram plotadas sobre uma curva padrão e normalizadas por milhão de células. Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes. As análises estatísticas foram feitas por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo pós-teste de *Newman-Keuls*. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

4.8 Avaliação de propriedades funcionais de HUVECs expostas ao hidroperóxido de urato

Conforme já mencionado em seção anterior, as células endoteliais recobrem a porção interna dos vasos sanguíneos e representam uma interface dinâmica entre o sangue e os tecidos. A exposição dessas células ao HOOU, portanto, deve ter impactos na integridade e homeostase vascular. Ainda que não citotóxico, o tratamento das HUVECs com o peróxido resultou na oxidação de proteínas totais da superfície celular, incluindo a PDI expressa nesse local, além de alterar o balanço redox intracelular. A partir dessas evidências iniciais nos propusemos a investigar o efeito do HOOU sobre alguns aspectos funcionais da célula endotelial.

4.8.1 Avaliação da capacidade de migração

A capacidade de migração é característica, embora não exclusiva, de células endoteliais. É um processo integrado, dinâmico e cíclico, importante para a manutenção da integridade do endotélio, reparo e formação de vasos sanguíneos durante a cicatrização e angiogênese. De forma bastante sucinta, a coordenação da migração envolve: (1) polarização morfológica (“frente e trás”) da célula, (2) extensão da membrana plasmática na direção do movimento, (3) adesão da “parte da frente” da célula ao substrato, (4) força de contração e tração e (5) descolamento da parte traseira da célula (LAUFFENBURGER; HORWITZ, 1996; SAN MARTÍN; GRIENDLING, 2010). A atividade da enzima NADPH oxidase e a geração intracelular de espécies oxidantes é fundamental durante o evento migratório, uma vez que a oxidação e inibição temporária de proteínas tirosina fosfatase desencadeia cascatas de sinalização que modulam a reorganização de filamentos

de actina (CHIARUGI et al., 2003; FIASCHI et al., 2006; FREY; USHIO–FUKAI; MALIK, 2009; MOLDOVAN et al., 2000).

A capacidade migratória de HUVECs frente o tratamento com H₂O₂ foi investigada pelo ensaio de *wound healing*. Conforme pode ser observado na figura 22, após 18 h não foram observadas diferenças na capacidade de migração das células tratadas com as diferentes concentrações de H₂O₂ na comparação com aquelas incubadas apenas com PBS ou fase móvel. Utilizando também o ensaio de *wound healing*, Moldovan e colaboradores (2000) mostraram que, já na primeira hora, as células endoteliais da margem da fenda apresentavam maior concentração de oxidantes (principalmente superóxido) em relação às mais afastadas. Além disso, a remoção do superóxido do meio intracelular resultou em menor motilidade das células ao final de 5 h de análise (MOLDOVAN et al., 2000). É importante mencionar que o fator temporal parece crítico nesses ensaios de migração e, nesse sentido, um possível efeito do H₂O₂ sobre propriedades de migração pode ter sido revertido após algumas horas de tratamento. Ainda nesse contexto, também é importante considerar que o peróxido foi adicionado uma única vez. Em situações inflamatórias, a geração de H₂O₂ deve ser contínua, de forma que a ausência de efeito pode também ter sido decorrente de uma falha no protocolo utilizado.

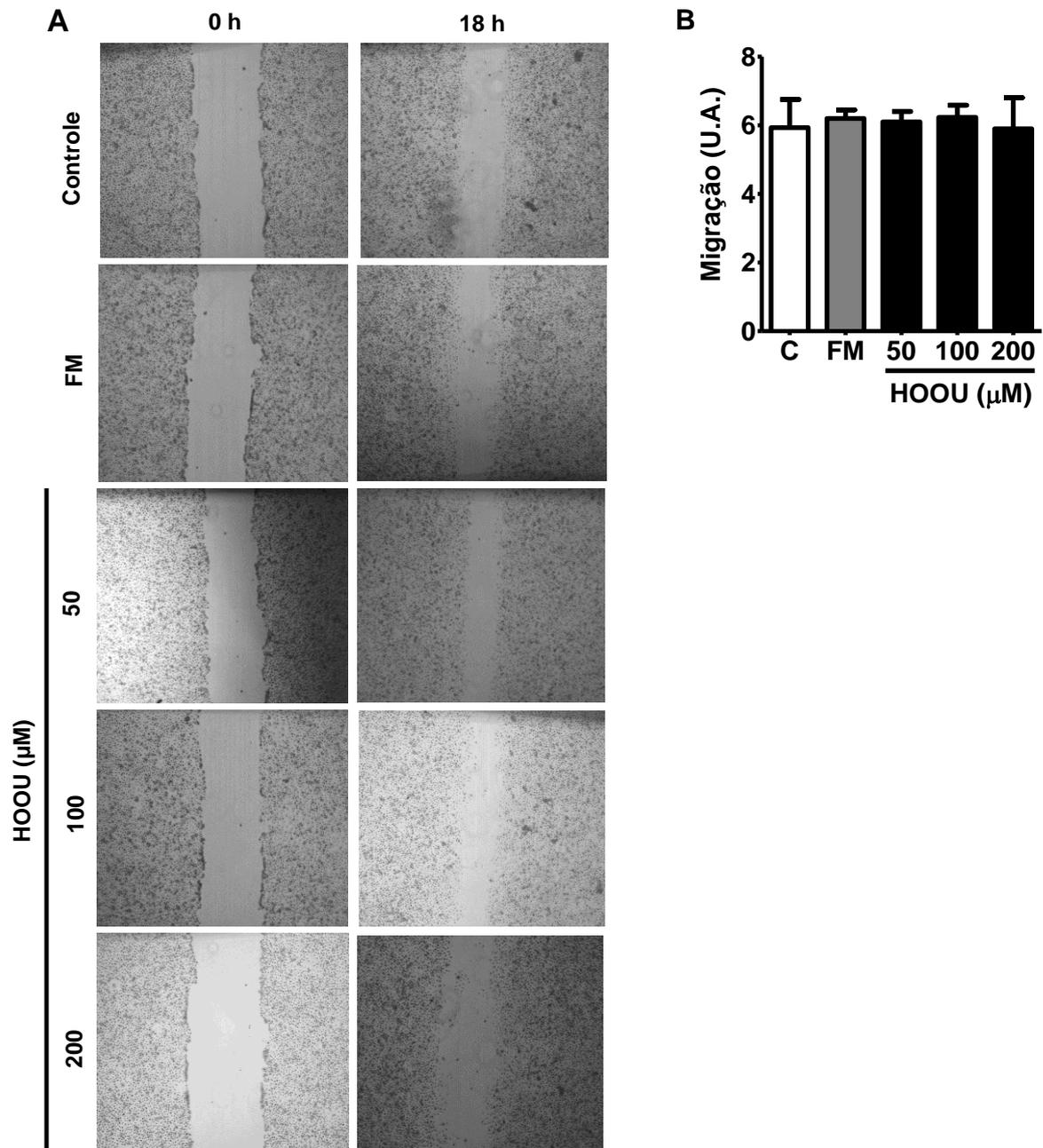


Figura 22. Hidroperóxido de urato não interfere na migração de HUVECs. Células foram cultivadas em placas de 6 poços (densidade inicial de 2×10^5 células/poço) por 2 dias, seguido de 1 dia de cultivo adicional em meio carenciado. Após execução da fenda ao longo da monocamada, as células foram tratadas com PBS (controle, C), fase móvel evaporada (FM) ou HOOU (50 – 200 μM) por 10 min. A migração foi acompanhada em microscópio invertido, com aumento de 4x, sendo a captura de imagens feita imediatamente após os tratamentos (0h) e 18 h depois. (A) Imagens representativas obtidas no início (0 h) e no final (18 h) do ensaio. (B) Quantificação da migração. Para cada imagem, a distância arbitrária entre um lado e outro da fenda foi medida em seis pontos diferentes com auxílio do programa ImageJ. Os dados foram obtidos pela diferença entre a mensuração feita no início e a feita no final do experimento. Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes. As análises estatísticas foram feitas por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*

4.8.2 Avaliação das propriedades adesivas

A adesão é um outro evento importante da biologia da célula endotelial, que pode ser entendido dentro do contexto maior de migração celular. Conforme já colocado anteriormente, o ciclo de migração é dinâmico, dependente de cascatas de sinalização e reorganização de citoesqueleto e envolve, em primeira e última instâncias, adesão e descolamento do substrato (LAUFFENBURGER; HORWITZ, 1996). No experimento de migração, conclusões mais assertivas a respeito dos efeitos do H₂O₂ podem ter sido comprometidas pelo longo tempo de análise (18 h). Por outro lado, a adesão é um evento que pode ser analisado mais precocemente, pois na presença de algum componente da MEC as células endoteliais aderem mais rapidamente. Além disso, essa abordagem também é vantajosa visto que os tióis extracelulares são oxidados conforme as células vão aderindo ao substrato (figuras 17 e 18).

Para o experimento, HUVECs previamente reduzidas com TCEP ou não, foram submetidas a tratamentos que resultaram em oxidação, alquilação de tióis de superfície, bloqueio de integrinas ou inibição da PDI, seguido da semeadura sobre fibronectina. A análise precoce, com apenas 30 min de cultivo, mostrou que o tratamento com os oxidantes diamida ou H₂O₂, assim como com o agente alquilante de tióis (pCMBS), inibiu significativamente a aderência das células sobre a placa. Além disso, também foram eficazes o composto que bloqueia as integrinas (peptídeo RGDS) e os inibidores da PDI (rutinosídeo e bacitracina) (figura 23 A). A maioria dos tratamentos perdeu parte ou todo o efeito inibitório com 90 min de cultivo (figura 23 B). A alquilação pelo pCMBS foi a maior exceção, já que o efeito observado permaneceu praticamente inalterado nas duas análises (figura 23 A e B). Embora com menor extensão, a inibição da adesão pela diamida também se

manteve significativa na análise tardia. Contudo, verifica-se uma tendência de perda do efeito com o passar do tempo (figura 23 B). O tratamento com miricitrina, flavonóide similar ao rutinosídeo, não resultou em inibição da adesão celular, mostrando que o efeito da rutina foi consequência da ação sobre a PDI e não um efeito inespecífico dos flavonóides. O padrão de adesão observado nas células previamente reduzidas com TCEP foi muito similar ao daquelas não reduzidas (figura 23 C e D).

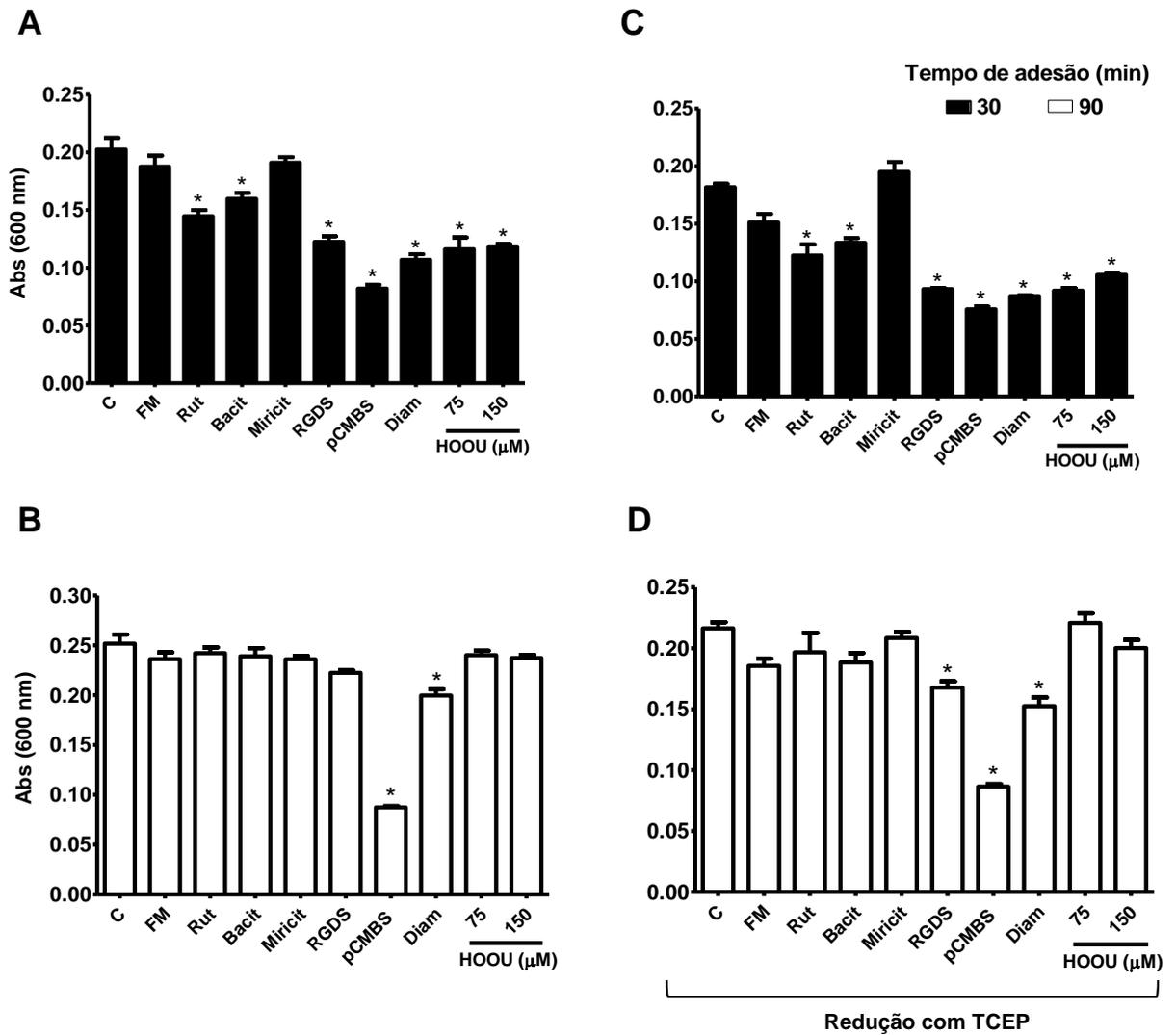


Figura 23. Hidroperóxido de urato inibe a adesão de HUVECs sobre fibronectina. (A e B) Células confluentes foram destacadas da placa de cultura, distribuídas em microtubos (1×10^6 células/microtubo) e incubadas com meio RPMI modificado (controle, C), quercetina-3-rutinosídeo (Rut, 10 μ M), bacitracina (bacit, 100 μ M), miricitrina (miricit, 100 μ M), RGDS (500 μ M), pCMBS (100 μ M), diamida (diam, 200 μ M) ou HOOU (75 and 150 μ M), por 30 min à temperatura ambiente e agitação suave. (C e D) Antes do descolamento das placas, as células foram reduzidas com TCEP (200 μ M). Os tratamentos foram feitos conforme especificado anteriormente. Após os tratamentos as células foram distribuídas em placas de 96 poços recobertas com fibronectina (10 μ g/ml) e cultivadas por 30, ou 90 min, seguido da marcação com cristal violeta. Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes. As análises estatísticas foram feitas por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

As integrinas são uma classe de receptores de adesão presentes na superfície celular que medeiam interações célula-célula e célula-MEC. A interação receptor/ligante envolve mudanças conformacionais nas integrinas, que passam de um estado de baixa afinidade (inativo) para um estado de maior afinidade (ativo). Foi mostrado que o bloqueio de tióis com N-etilmaleimida (NEM), DTNB e pCMBS é capaz de inibir a ativação da integrina α IIb β 3 e agregação de plaquetas, mas que redutores como o DTT promovem ativação de integrinas. Além disso, diversos estudos mostram a importância de reduções e trocas dissulfeto catalisadas enzimaticamente por PDI na ligação das integrinas a ligantes (MOR-COHEN, 2016). A interação entre PDI e integrinas já foi documentada em plaquetas e células endoteliais, sendo que nessas mesmas células, a inibição da enzima resultou em inibição da adesão (LAHAV et al., 2000, 2002, 2003; PONAMARCZUK et al., 2018; SWIATKOWSKA et al., 2008). Nossos resultados estão de acordo com a literatura e direcionam para o fato de que o HOOU, ao oxidar a PDI, poderia indiretamente inibir a ativação das integrinas, sendo essa uma das razões da menor adesão celular em HUVECs tratadas com HOOU.

Além do ensaio de adesão, foi feito um ensaio de descolamento das HUVECs, que também reflete as propriedades adesivas das células, mas de um

outro ponto de vista. Nesse caso, HUVECs já aderidas à placa de cultura foram tratadas com diferentes concentrações de H₂O₂ e, em seguida, foram lavadas com PBS de maneira bastante delicada. A figura 24, a seguir, mostra que o incremento da concentração de H₂O₂ usado nos tratamentos foi acompanhado de maior sensibilidade das células à força mecânica causada pelo fluxo de PBS. Além disso, incubações com concentrações mais altas de H₂O₂, embora não tenham causado morte celular (dado não mostrado), provocaram alterações morfológicas nas células, que se contraíram a um formato mais arredondado (figura 24 A).

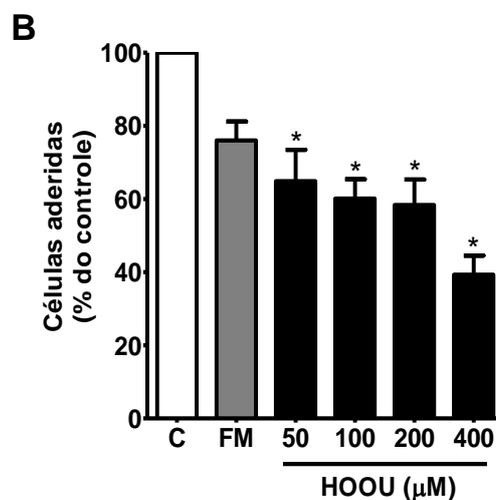
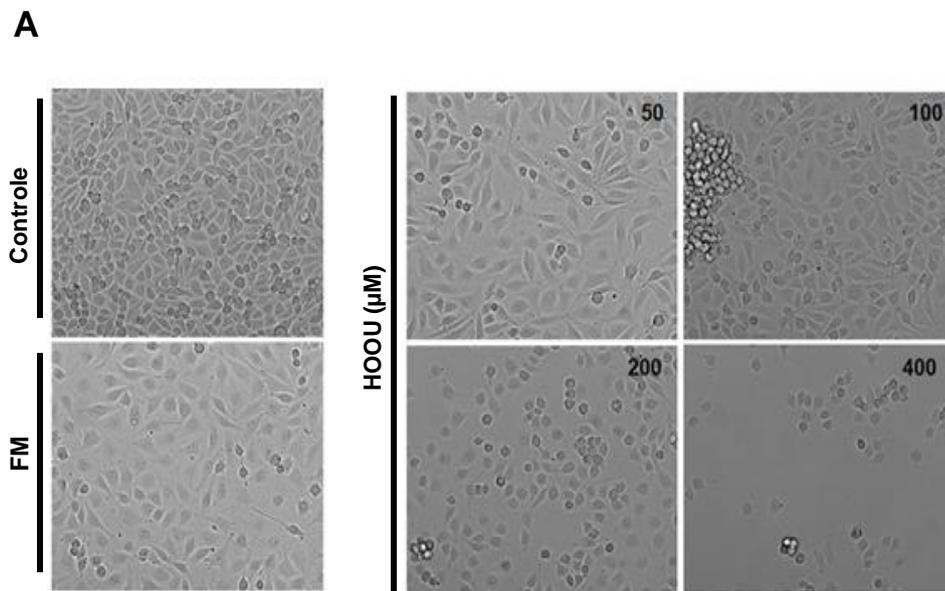


Figura 24. Hidroperóxido de urato favorece o descolamento de HUVECs da placa de cultivo. Células foram cultivadas em placas de 24 poços (densidade inicial de $2,5 \times 10^4$ células/poço) por 2 dias, seguido de incubação apenas com PBS (controle, C), fase móvel evaporada (FM) ou HOOU (50 – 400 μ M) por 10 min. (A) Após lavagem com PBS, as células que permaneceram aderidas foram contadas em câmara de Neubauer. (B) As análises morfológicas foram feitas com microscópio óptico invertido e aumento de 20x, exceto controle, cujo aumento foi de 10x. Os resultados estão expressos como a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes. As análises estatísticas foram feitas por análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

O destacamento das células endoteliais pode ser estimulado por insultos imunes (ativação de *Toll Like Receptor* [TLR] 2 de células endoteliais) e também oxidantes como H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$ liberado por neutrófilos ativados. Como consequência, decorre a chamada erosão endotelial, que é um dos mecanismos de aterotrombose relacionada à aterosclerose. Embora ainda pouco estudado, esse evento contribui para 20 – 40 % dos casos de trombose, especialmente em mulheres e jovens (HANSSON; LIBBY; TABAS, 2015). Tendo em vista o envolvimento de oxidantes e conforme sinalizam os resultados acima, o HOOU gerado localmente poderia contribuir para o processo de erosão endotelial ao favorecer a descamação dessas células. De fato, já foi observada uma correlação positiva entre a espessura da camada média da íntima arterial e a oxidação do AU em pacientes (SANTANA et al., 2018).

4.9 Investigação do ácido úrico como substrato da peroxidase

O HOOU, cujos efeitos foram objeto central da investigação feita até aqui, é produto da oxidação do AU por heme peroxidases como a MPO e a LPO (MEOTTI et al., 2011; SEIDEL et al., 2014). Mais recentemente foi identificada uma nova heme peroxidase expressa no pulmão, fígado, pâncreas, baço e, principalmente, no tecido vascular. Devido à sua abundância nesse ambiente foi chamada de peroxidase vascular (*vascular peroxidase* – VPO) (MA; ZHANG; PENG, 2013),

embora a denominação “peroxidase” (PXDN) seja mais comumente empregada. Estima-se que a concentração da PXDN no plasma de indivíduos saudáveis seja, aproximadamente, quatro ordens de magnitude maior que a da MPO (MA; ZHANG; PENG, 2013). Já foi observado que o domínio catalítico da PXDN é bastante similar ao da MPO e LPO, tornando plausível o fato de o AU também ser substrato da PXDN (FURTMÜLLER et al., 2006; SOUDI et al., 2015).

Embora a literatura já trouxesse evidências de que a PXDN é secretada por células endoteliais (CHENG et al., 2011), foi necessário, primeiramente, verificar se as HUVECs cultivadas por nós secretavam proteínas com atividade de peroxidase. A incubação do sobrenadante concentrado da cultura de células com H_2O_2 e *Amplex Red*, resultou na oxidação desse substrato fluorescente, confirmando, portanto, a presença de peroxidases (figura 25 A [amostra controle] e B [curva verde]). Em seguida, com esse mesmo ensaio, foi possível verificar redução significativa do sinal do *Amplex Red* na presença de concentrações fisiológicas de AU, mostrando que este é substrato e compete com o reagente fluorescente pelo sítio ativo da enzima (Figura 25 A e B).

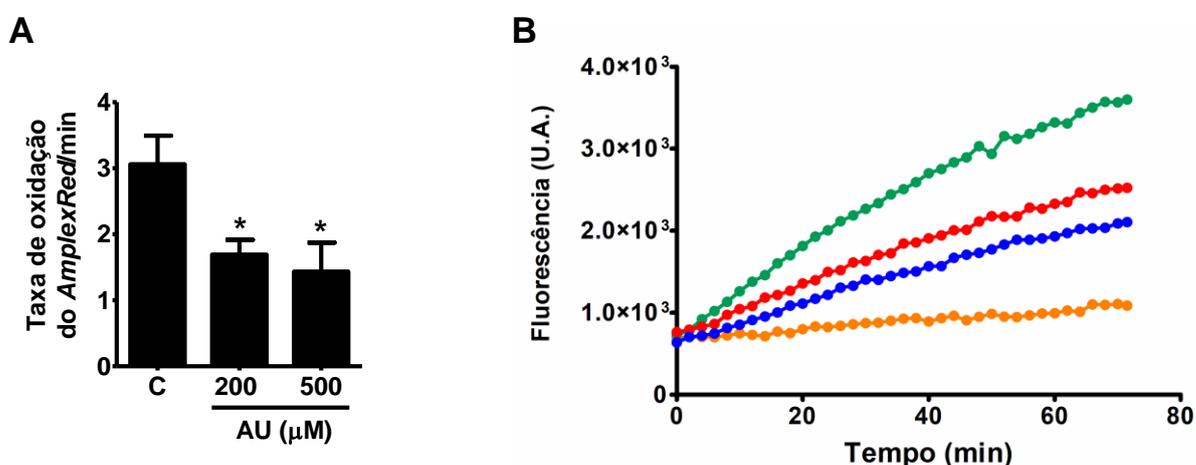


Figura 25. Ácido úrico compete com *Amplex Red* como substrato para oxidação pela peroxidase do sobrenadante de cultura de HUVECs. (A) Sobrenadante concentrado do cultivo de HUVECs contendo 10 µg de proteína foi adicionado a poços de uma placa preta de 96 poços juntamente com *Amplex Red* (50 µg) e H₂O₂ (50 µg), na ausência ou presença de ácido úrico (200 e 500 µM). A catálise enzimática e formação de resorufina foram acompanhados ao longo de 1 h e 30 min, a 37 °C em leitor de microplacas (Em = 560/Ex = 590). (A) Os resultados foram normalizados pela fluorescência basal obtida de um poço contendo apenas sobrenadante e *Amplex Red* e expressos como taxa de consumo de *Amplex Red*/min. (B) Cinética representativa da oxidação do *Amplex Red* nas diferentes condições experimentais. Reação na ausência de AU (verde) ou na presença de AU 200 (vermelho) e 500 µM (azul); Reação contendo apenas sobrenadante e *Amplex Red* (laranja).

Uma outra evidência de que o AU é substrato para a peroxidase secretada pelas HUVECs foi obtida pela detecção de hidroxissourato (HOU) em sistema LC-MS/MS. A incubação de sobrenadante e H₂O₂ na presença de AU resultou em significativa geração de HOU (Figura 26, pico e gráfico de barra azul claro), mostrando que houve oxidação do AU. Amostras controle contendo AU (PBS + AU e sobrenadante + AU) também apresentaram uma pequena fração de HOU, possivelmente decorrente da auto-oxidação do AU. Não foram detectados níveis relevantes de HOU nas amostras de sobrenadante e sobrenadante + H₂O₂.

A função biológica principal da PXDN abrange a formação de pontes sulfilimina no colágeno IV, fundamentais para a integridade da MEC (VANACORE et al., 2009). O mecanismo proposto para a formação desses *cross-links* envolve a geração de ácido hipobromoso (HOBr) a partir da reação entre brometo (Br⁻) e H₂O₂ catalisada pela peroxidase (BHAVE et al., 2012). Muito recentemente foi mostrado que concentrações fisiológicas de urato inibem a formação das pontes sulfilimina, sugerindo que o AU é capaz de competir com o Br⁻ como substrato da enzima (BATHISH et al., 2018). À vista disso, nossos resultados estão de acordo com a literatura e apontam para o fato de que o AU ser substrato para PXDN tem implicações tanto na integridade da membrana basal como também no balanço redox do sistema vascular.

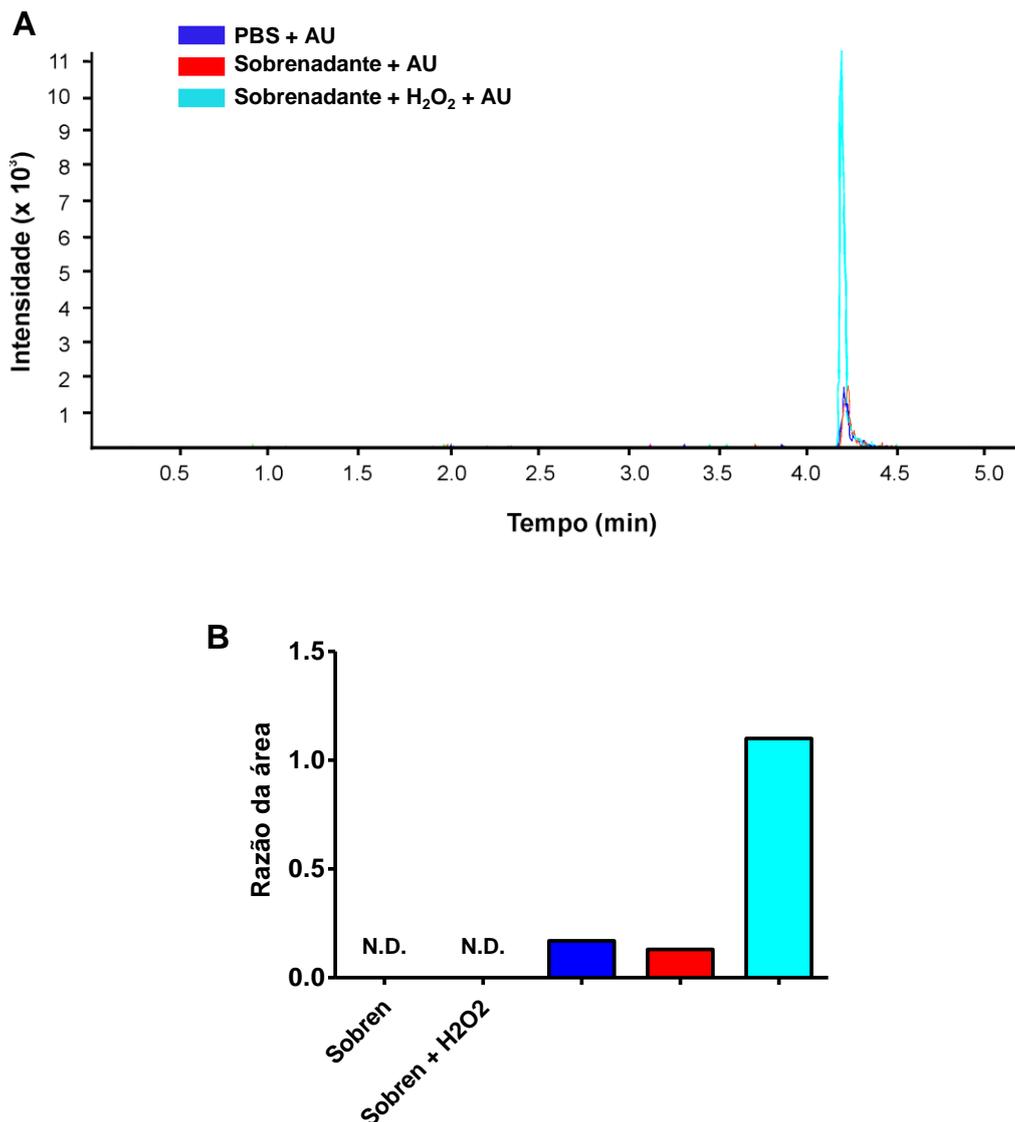


Figura 26. Detecção do hidroxissourato no sobrenadante de HUVECs incubadas com ácido úrico e peróxido de hidrogênio. Sobrenadante concentrado do cultivo de HUVECs contendo 20 μ g de proteína foi adicionado a microtubos juntamente com AU (200 μ M) e H₂O₂ (50 μ g). Após 30 min de incubação a 37 °C, sob agitação (600 rpm), alíquotas das reações foram misturadas com acetonitrila contendo padrão interno (alantoína marcada radioativamente) e submetidas à análise LC-MS/MS. A detecção do HOU foi feita com a transição de massa (MRM) m/z 183,0108 \rightarrow 140,0102. (A) Espectro representativo dos picos referentes ao HOU detectado nas seguintes amostras: PBS + AU (azul escuro), sobrenadante + AU (vermelho) e sobrenadante + H₂O₂ + AU (azul claro). (B) Quantificação relativa feita pela razão entre a área integrada do pico obtido para o HOU e o pico obtido para o padrão interno (alantoína marcada), em cada condição experimental. Nas amostras contendo apenas sobrenadante (sobren) e sobrenadante + H₂O₂ não foi detectado (N.D.) HOU. Foi feita apenas uma replicata experimental.

5 CONCLUSÃO

Parte das atividades de pesquisa do nosso laboratório envolvem a investigação dos efeitos biológicos do H₂O₂ e a padronização de uma condição na qual o oxidante permanece mais estável foi importante para a condução dos experimentos.

Nossos estudos envolvendo a PDI recombinante demonstraram que a reação com o H₂O₂ promove consumo dos tióis livres da proteína e que, mais especificamente, os tióis redox ativos dos sítios catalíticos da proteína são alvos preferenciais. Provavelmente, um tiól de cada sítio ativo é oxidado ao derivado ácido sulfênico que, subsequentemente, reage com o tiol vicinal e forma uma ponte dissulfeto. Apesar de reversíveis, as oxidações promovidas podem ter efeitos deletérios, principalmente quando consideramos o tempo de ação de um redutor e a geração contínua do H₂O₂ em situações inflamatórias. As pontes dissulfeto foram as únicas modificações encontradas, mas o tratamento com H₂O₂ também resultou em agregação e inativação da PDI. Ainda que careça de mais evidências experimentais, esses resultados são indicativos de outras modificações promovidas pelo H₂O₂.

A oxidação da PDI observada *in vitro* foi confirmada pelos estudos de biotinylation da proteína da superfície de HUVECs. A diferença sutil de oxidação entre as amostras controle e tratadas, se mostrou razoável quando verificamos que nas condições do experimento a grande maioria dos tióis extracelulares já estavam oxidados. Além da PDI, tióis totais expressos na superfície das células também foram oxidados pelo H₂O₂. Em ambos os casos, a menor concentração de H₂O₂ promoveu oxidação superior àquela observada para a maior concentração. Não pudemos buscar evidências científicas que explicassem tal

fato, mas trata-se, sem dúvida, de um efeito bastante interessante.

A diminuição da razão GSH/GSSG das HUVECs tratadas com H₂O₂ sinalizou a alteração do estado redox da célula para um ambiente intracelular mais oxidativo. Embora os ensaios de migração não tenham refletido em efeitos do H₂O₂ – possivelmente por causa do fator temporal – o ensaio de adesão, por ter envolvido uma série reagentes e inibidores, trouxe valiosos *insights* mecanísticos. A inibição da adesão provocada pelo H₂O₂, juntamente com o efeito desencadeado pelos inibidores e pelo bloqueador de tiol, evidenciou o envolvimento da PDI e da integrina no processo de adesão, bem como a importância da manutenção dessas proteínas no estado reduzido e de reações de troca de dissulfeto.

É importante ressaltar que em todos os experimentos procuramos usar concentrações que considerávamos relevantes fisiologicamente. Não existem dados na literatura a respeito de concentrações plasmáticas de H₂O₂, mas certamente são tão maiores quanto maiores os níveis de AU. Diversos estudos apontam a hiperuricemia como fator de risco para doenças vasculares, contudo, nossos dados direcionam para o fato de que mesmo níveis normais de AU plasmático poderiam resultar em efeitos deletérios.

A última parte do trabalho trouxe evidências de que o AU é substrato para a PXDN e pode interferir tanto na integridade da membrana basal como também no balanço redox do sistema vascular. Como a PRDX é uma enzima descrita recentemente, seus efeitos biológicos ainda não estão completamente caracterizados, sendo esse um campo frutífero para novas investigações.

Todo o conjunto de dados apresentado contribui para o maior entendimento da participação do H₂O₂ em processos oxidativos vasculares,

especialmente a oxidação de proteínas. Nesse contexto, a geração do H₂O₂ pode ser entendida como um dos mecanismos pelos quais o AU altera a função endotelial, interfere na homeostase vascular e, conseqüentemente, sustenta patologias cardiovasculares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, M.; TAYLOR, W.; SMITH, P. R.; BECKER, M. A. Accelerated transcription of PRPS1 in X-linked overactivity of normal human phosphoribosylpyrophosphate synthetase. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 11, p. 7482–8, 12 mar. 1999.
- AKAGI, S.; YAMAMOTO, A.; YOSHIMORI, T.; MASAKI, R.; OGAWA, R.; TASHIRO, Y. Distribution of protein disulfide isomerase in rat hepatocytes. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 36, n. 12, p. 1533–1542, 5 dez. 1988.
- ALVAREZ, B.; FERRER-SUETA, G.; FREEMAN, B. A.; RADI, R. Kinetics of peroxynitrite reaction with amino acids and human serum albumin. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 2, p. 842–8, 8 jan. 1999.
- AMES, B. N.; CATHCART, R.; SCHWIERS, E.; HOCHSTEIN, P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 11, p. 6858–62, nov. 1981.
- ARAI, Y.; NISHINAKA, Y.; ARAI, T.; MORITA, M.; MIZUGISHI, K.; ADACHI, S.; TAKAORI-KONDO, A.; WATANABE, T.; YAMASHITA, K. Uric acid induces NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 443, n. 2, p. 556–61, 10 jan. 2014.
- ARAUJO, T. L. S.; FERNANDES, C. G.; LAURINDO, F. R. M. Golgi-independent routes support protein disulfide isomerase externalization in vascular smooth muscle cells. **Redox biology**, v. 12, p. 1004–1010, 2017.
- ARAUJO, T. L. S.; ZEIDLER, J. D.; OLIVEIRA, P. V. S.; DIAS, M. H.; ARMELIN, H. A.; LAURINDO, F. R. M. Protein disulfide isomerase externalization in endothelial cells follows classical and unconventional routes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 103, p. 199–208, fev. 2017.
- ARUOMA, O. I.; HALLIWELL, B. Inactivation of alpha 1-antiproteinase by hydroxyl radicals. The effect of uric acid. **FEBS letters**, v. 244, n. 1, p. 76–80, 13 fev. 1989.
- BABSON, A. L.; BABSON, S. R. Kinetic colorimetric measurement of serum lactate dehydrogenase activity. **Clinical chemistry**, v. 19, n. 7, p. 766–9, jul. 1973.
- BATHISH, B.; TURNER, R.; PAUMANN-PAGE, M.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Characterisation of peroxidasin activity in isolated extracellular matrix and direct detection of hypobromous acid formation. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 646, p. 120–127, 15 maio 2018.
- BECKER, B. F. Towards the physiological function of uric acid. **Free radical biology & medicine**, v. 14, n. 6, p. 615–31, jun. 1993.
- BEKENDAM, R. H.; FLAUMENHAFT, R. Inhibition of Protein Disulfide Isomerase in Thrombosis. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 119, p. 42–48, out. 2016.
- BHAVE, G.; CUMMINGS, C. F.; VANACORE, R. M.; KUMAGAI-CRESSE, C.; ERO-TOLLIVER, I. A.; RAFI, M.; KANG, J.-S.; PEDCHENKO, V.; FESSLER, L. I.; FESSLER, J. H.; HUDSON, B. G. Peroxidasin forms sulfilimine chemical bonds using hypohalous acids in tissue genesis. **Nature Chemical Biology**, v. 8, n. 9, p. 784–790, 29 set. 2012.
- BI, S.; HONG, P. W.; LEE, B.; BAUM, L. G. Galectin-9 binding to cell surface protein disulfide isomerase regulates the redox environment to enhance T-cell migration and HIV entry. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 26, p. 10650–5, 28 jun. 2011.
- BONANATA, J.; TURELL, L.; ANTMANN, L.; FERRER-SUETA, G.; BOTASINI, S.; MÉNDEZ, E.; ALVAREZ, B.; COITIÑO, E. L. The thiol of human serum albumin: Acidity, microenvironment and mechanistic insights on its oxidation to sulfenic acid. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 108, p.

952–962, jul. 2017.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–54, 7 maio 1976.

BRAGA, T. T.; FORNI, M. F.; CORREA-COSTA, M.; RAMOS, R. N.; BARBUTO, J. A.; BRANCO, P.; CASTOLDI, A.; HIYANE, M. I.; DAVANSO, M. R.; LATZ, E.; FRANKLIN, B. S.; KOWALTOWSKY, A. J.; CAMARA, N. O. S. Soluble Uric Acid Activates the NLRP3 Inflammasome. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 39884, 13 dez. 2017.

BURGESS, J. K.; HOTCHKISS, K. A.; SUTER, C.; DUDMAN, N. P.; SZÖLLÖSI, J.; CHESTERMAN, C. N.; CHONG, B. H.; HOGG, P. J. Physical proximity and functional association of glycoprotein 1b α and protein-disulfide isomerase on the platelet plasma membrane. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 13, p. 9758–66, 31 mar. 2000.

CAI, H.; WANG, C. C.; TSOU, C. L. Chaperone-like activity of protein disulfide isomerase in the refolding of a protein with no disulfide bonds. **The Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 40, p. 24550–2, 7 out. 1994.

CANELLAKIS, E. S.; TUTTLE, A. L.; COHEN, P. P. A comparative study of the end-products of uric acid oxidation by peroxidases. **The Journal of biological chemistry**, v. 213, n. 1, p. 397–404, mar. 1955.

CANNON, P. J.; STATSON, W. B.; DEMARTINI, F. E.; SOMMERS, S. C.; LARAGH, J. H. Hyperuricemia in primary and renal hypertension. **The New England journal of medicine**, v. 275, n. 9, p. 457–64, 1 set. 1966.

CARBALLAL, S.; RADI, R.; KIRK, M. C.; BARNES, S.; FREEMAN, B. A.; ALVAREZ, B. Sulfenic Acid Formation in Human Serum Albumin by Hydrogen Peroxide and Peroxynitrite †. **Biochemistry**, v. 42, n. 33, p. 9906–9914, 26 ago. 2003.

CARROLL, D.; HOWARD, D.; ZHU, H.; PAUMI, C. M.; VORE, M.; BONDADA, S.; LIANG, Y.; WANG, C.; ST CLAIR, D. K. Simultaneous quantitation of oxidized and reduced glutathione via LC-MS/MS: An insight into the redox state of hematopoietic stem cells. **Free radical biology & medicine**, v. 97, p. 85–94, ago. 2016.

CARVALHO, L. A. C. **No Title**Instituto de Quimica, USP, 2017.

CARVALHO, L. A. C.; TRUZZI, D. R.; FALLANI, T. S.; ALVES, S. V.; TOLEDO, J. C.; AUGUSTO, O.; NETTO, L. E. S.; MEOTTI, F. C. Urate hydroperoxide oxidizes human peroxiredoxin 1 and peroxiredoxin 2. **The Journal of biological chemistry**, v. 292, n. 21, p. 8705–8715, 26 maio 2017.

CHEN, K.; DETWILER, T. C.; ESSEX, D. W. Characterization of protein disulphide isomerase released from activated platelets. **British journal of haematology**, v. 90, n. 2, p. 425–31, jun. 1995.

CHENG, G.; LI, H.; CAO, Z.; QIU, X.; MCCORMICK, S.; THANNICKAL, V. J.; NAUSEEF, W. M. Vascular peroxidase-1 is rapidly secreted, circulates in plasma, and supports dityrosine cross-linking reactions. **Free radical biology & medicine**, v. 51, n. 7, p. 1445–53, 1 out. 2011.

CHIARUGI, P.; PANI, G.; GIANNONI, E.; TADDEI, L.; COLAVITTI, R.; RAUGEI, G.; SYMONS, M.; BORRELLO, S.; GALEOTTI, T.; RAMPONI, G. Reactive oxygen species as essential mediators of cell adhesion: the oxidative inhibition of a FAK tyrosine phosphatase is required for cell adhesion. **The Journal of cell biology**, v. 161, n. 5, p. 933–44, 9 jun. 2003.

CHO, J.; KENNEDY, D. R.; LIN, L.; HUANG, M.; MERRILL-SKOLOFF, G.; FURIE, B. C.; FURIE, B. Protein disulfide isomerase capture during thrombus formation in vivo depends on the presence of 3 integrins. **Blood**, v. 120, n. 3, p. 647–655, 19 jul. 2012.

CHOI, H. K.; ATKINSON, K.; KARLSON, E. W.; WILLET, W.; CURHAN, G. Purine-rich foods, dairy and protein intake, and the risk of gout in men. **The New England journal of medicine**, v. 350, n. 11, p. 1093–103, 11 mar. 2004.

CHOI, H. K.; MOUNT, D. B.; REGINATO, A. M.; AMERICAN COLLEGE OF PHYSICIANS; AMERICAN PHYSIOLOGICAL SOCIETY. Pathogenesis of gout. **Annals of internal medicine**, v.

143, n. 7, p. 499–516, 4 out. 2005.

CLAUSEN, M. R.; HUVAERE, K.; SKIBSTED, L. H.; STAGSTED, J. Characterization of peroxides formed by riboflavin and light exposure of milk. Detection of urate hydroperoxide as a novel oxidation product. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 1, p. 481–7, 13 jan. 2010.

CORRY, D. B.; ESLAMI, P.; YAMAMOTO, K.; NYBY, M. D.; MAKINO, H.; TUCK, M. L. Uric acid stimulates vascular smooth muscle cell proliferation and oxidative stress via the vascular renin-angiotensin system. **Journal of hypertension**, v. 26, n. 2, p. 269–75, fev. 2008.

COUËT, J.; DE BERNARD, S.; LOOSFELT, H.; SAUNIER, B.; MILGROM, E.; MISRAHI, M. Cell surface protein disulfide-isomerase is involved in the shedding of human thyrotropin receptor ectodomain. **Biochemistry**, v. 35, n. 47, p. 14800–5, 26 nov. 1996.

CRISAN, T. O.; CLEOPHAS, M. C. P.; OOSTING, M.; LEMMERS, H.; TOENHAKKE-DIJKSTRA, H.; NETEA, M. G.; JANSEN, T. L.; JOOSTEN, L. A. B. Soluble uric acid primes TLR-induced proinflammatory cytokine production by human primary cells via inhibition of IL-1Ra. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 75, n. 4, p. 755–62, abr. 2016.

DAVIES, M. J. The oxidative environment and protein damage. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1703, n. 2, p. 93–109, 17 jan. 2005.

DAVIES, M. J. Protein oxidation and peroxidation. **The Biochemical journal**, v. 473, n. 7, p. 805–25, 1 abr. 2016.

DAVIS, N. S. The Cardiovascular and Renal Manifestations of Gout. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 29, n. 6, p. 261–262, 7 ago. 1897.

DOMAZOU, A. S.; ZHU, H.; KOPPENOL, W. H. Fast repair of protein radicals by urate. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 9, p. 1929–1936, 1 maio 2012.

DOST, B.; BANDEIRA, N.; LI, X.; SHEN, Z.; BRIGGS, S. P.; BAFNA, V. Accurate mass spectrometry based protein quantification via shared peptides. **Journal of computational biology: a journal of computational molecular cell biology**, v. 19, n. 4, p. 337–48, abr. 2012.

ELAHI, M. M.; KONG, Y. X.; MATATA, B. M. Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2, n. 5, p. 259–69, 2009.

ELLIS, R. J. Assembly chaperones: a perspective. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 368, n. 1617, p. 20110398, 5 maio 2013.

ESSEX, D. W. Redox Control of Platelet Function. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 5, p. 1191–1225, maio 2009.

ESSEX, D. W.; CHEN, K.; SWIATKOWSKA, M. Localization of protein disulfide isomerase to the external surface of the platelet plasma membrane. **Blood**, v. 86, n. 6, p. 2168–73, 15 set. 1995.

ESSEX, D. W.; LI, M.; MILLER, A.; FEINMAN, R. D. Protein Disulfide Isomerase and Sulfhydryl-Dependent Pathways in Platelet Activation. **Biochemistry**, v. 40, n. 20, p. 6070–6075, maio 2001.

ESSEX, D. W.; MILLER, A.; SWIATKOWSKA, M.; FEINMAN, R. D. Protein disulfide isomerase catalyzes the formation of disulfide-linked complexes of vitronectin with thrombin-antithrombin. **Biochemistry**, v. 38, n. 32, p. 10398–405, 10 ago. 1999.

FEENER, E. P.; SHEN, W. C.; RYSER, H. J. Cleavage of disulfide bonds in endocytosed macromolecules. A processing not associated with lysosomes or endosomes. **The Journal of biological chemistry**, v. 265, n. 31, p. 18780–5, 5 nov. 1990.

FEIG, D. I.; JOHNSON, R. J. Hyperuricemia in Childhood Primary Hypertension. **Hypertension**, v. 42, n. 3, p. 247–252, set. 2003.

FEIG, D. I.; KANG, D. H.; JOHNSON, R. J. Uric Acid and Cardiovascular Risk. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 17, p. 1811–1821, 23 out. 2008.

FERRER-SUETA, G.; MANTA, B.; BOTTI, H.; RADI, R.; TRUJILLO, M.; DENICOLA, A. Factors affecting protein thiol reactivity and specificity in peroxide reduction. **Chemical research in**

toxicology, v. 24, n. 4, p. 434–50, 18 abr. 2011.

FIASCHI, T.; COZZI, G.; RAUGEI, G.; FORMIGLI, L.; RAMPONI, G.; CHIARUGI, P. Redox Regulation of β -Actin during Integrin-mediated Cell Adhesion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 32, p. 22983–22991, 11 ago. 2006.

FLAUMENHAFT, R.; FURIE, B. Vascular thiol isomerases. **Blood**, v. 128, n. 7, p. 893–901, 18 ago. 2016.

FREY, R. S.; USHIO-FUKAI, M.; MALIK, A. B. NADPH Oxidase-Dependent Signaling in Endothelial Cells: Role in Physiology and Pathophysiology. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 4, p. 791–810, abr. 2009.

FURTMÜLLER, P. G.; JANTSCHKO, W.; REGELSBERGER, G.; JAKOPITSCH, C.; ARNHOLD, J.; OINGER, C. Reaction of lactoperoxidase compound I with halides and thiocyanate. **Biochemistry**, v. 41, n. 39, p. 11895–900, 1 out. 2002.

FURTMÜLLER, P. G.; ZEDERBAUER, M.; JANTSCHKO, W.; HELM, J.; BOGNER, M.; JAKOPITSCH, C.; OBINGER, C. Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 445, n. 2, p. 199–213, 15 jan. 2006.

GALLINA, A.; HANLEY, T. M.; MANDEL, R.; TRAHEY, M.; BRODER, C. C.; VIGLIANTI, G. A.; RYSER, H. J.-P. Inhibitors of protein-disulfide isomerase prevent cleavage of disulfide bonds in receptor-bound glycoprotein 120 and prevent HIV-1 entry. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 52, p. 50579–88, 27 dez. 2002.

GERTLER, M. M.; GARN, S. M.; LEVINE, S. A. Serum uric acid in relation to age and physique in health and in coronary heart disease. **Annals of internal medicine**, v. 34, n. 6, p. 1421–31, jun. 1951.

GOLDBERGER, R. F.; EPSTEIN, C. J.; ANFINSEN, C. B. Acceleration of reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by a microsomal system from rat liver. **The Journal of biological chemistry**, v. 238, p. 628–35, fev. 1963.

GOLIA, E.; LIMONGELLI, G.; NATALE, F.; FIMIANI, F.; MADDALONI, V.; PARIGGIANO, I.; BIANCHI, R.; CRISCI, M.; D'ACIERNO, L.; GIORDANO, R.; DI PALMA, G.; CONTE, M.; GOLINO, P.; RUSSO, M. G.; CALABRÒ, R.; CALABRÒ, P. Inflammation and Cardiovascular Disease: From Pathogenesis to Therapeutic Target. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 16, n. 9, p. 435, 19 set. 2014.

GROOTVELD, M.; HALLIWEL, B.; MOORHOUSE, C. P. Action of uric acid, allopurinol and oxypurinol on the myeloperoxidase-derived oxidant hypochlorous acid. **Free radical research communications**, v. 4, n. 2, p. 69–76, 1987.

GUPTA, V.; CARROLL, K. S. Sulfenic acid chemistry, detection and cellular lifetime. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1840, n. 2, p. 847–75, fev. 2014.

GUZIK, T. J.; TOUYZ, R. M. Oxidative Stress, Inflammation, and Vascular Aging in Hypertension. **Hypertension**, v. 70, n. 4, p. 660–667, out. 2017.

HAHM, E.; LI, J.; KIM, K.; HUH, S.; ROGELJ, S.; CHO, J. Extracellular protein disulfide isomerase regulates ligand-binding activity of α M β 2 integrin and neutrophil recruitment during vascular inflammation. **Blood**, v. 121, n. 19, p. 3789–800, S1-15, 9 maio 2013.

HAMANN, M.; ZHANG, T.; HENDRICH, S.; THOMAS, J. A. Quantitation of protein sulfenic and sulfonic acid, irreversibly oxidized protein cysteine sites in cellular proteins. **Methods in enzymology**, v. 348, p. 146–56, 2002.

HANSSON, G. K.; LIBBY, P.; TABAS, I. Inflammation and plaque vulnerability. **Journal of internal medicine**, v. 278, n. 5, p. 483–93, nov. 2015.

HANSSON, G. K.; ROBERTSON, A. L.; SODERBERG-NAUCLÉR, C. INFLAMMATION AND ATHEROSCLEROSIS. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 1, n. 1, p. 297–329, 24 fev. 2006.

HATAHET, F.; RUDDOCK, L. W. Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation. **Antioxidants & redox signaling**, v. 11, n. 11, p. 2807–50, nov. 2009.

HAWKINS, H. C.; FREEDMAN, R. B. Randomly reoxidised soybean trypsin inhibitor and the possibility of conformational barriers to disulphide isomerization in proteins. **FEBS letters**, v. 58, n. 1, p. 7–11, 15 out. 1975.

HAYANO, T.; HIROSE, M.; KIKUCHI, M. Protein disulfide isomerase mutant lacking its isomerase activity accelerates protein folding in the cell. **FEBS Letters**, v. 377, n. 3, p. 505–511, 27 dez. 1995.

HOOPER, D. C.; SCOTT, G. S.; ZBOREK, A.; MIKHEEVA, T.; KEAN, R. B.; KOPROWSKI, H.; SPITSIN, S. V. Uric acid, a peroxynitrite scavenger, inhibits CNS inflammation, blood-CNS barrier permeability changes, and tissue damage in a mouse model of multiple sclerosis. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 14, n. 5, p. 691–8, abr. 2000.

HOTCHKISS, K. A.; CHESTERMAN, C. N.; HOGG, P. J. Catalysis of disulfide isomerization in thrombospondin 1 by protein disulfide isomerase. **Biochemistry**, v. 35, n. 30, p. 9761–7, 30 jul. 1996.

HOTCHKISS, K. A.; MATTHIAS, L. J.; HOGG, P. J. Exposure of the cryptic Arg-Gly-Asp sequence in thrombospondin-1 by protein disulfide isomerase. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1388, n. 2, p. 478–88, 10 nov. 1998.

IHALIN, R.; LOIMARANTA, V.; TENOVUO, J. Origin, structure, and biological activities of peroxidases in human saliva. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 445, n. 2, p. 261–8, 15 jan. 2006.

IIDA, S.; OHKUBO, Y.; YAMAMOTO, Y.; FUJISAWA, A. Parabanic acid is the singlet oxygen specific oxidation product of uric acid. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v. 61, n. 3, p. 169–175, nov. 2017.

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. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 557, p. 72–81, 1 set. 2014.

IRANI, K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. **Circulation research**, v. 87, n. 3, p. 179–83, 4 ago. 2000.

JASUJA, R.; FURIE, B.; FURIE, B. C. Endothelium-derived but not platelet-derived protein disulfide isomerase is required for thrombus formation in vivo. **Blood**, v. 116, n. 22, p. 4665–74, 25 nov. 2010.

JERKE, U.; ROLLE, S.; PURFÜRST, B.; LUFT, F. C.; NAUSEEF, W. M.; KETTRITZ, R. β 2 integrin-mediated cell-cell contact transfers active myeloperoxidase from neutrophils to endothelial cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 288, n. 18, p. 12910–9, 3 maio 2013.

JIANG, X. M.; FITZGERALD, M.; GRANT, C. M.; HOGG, P. J. Redox control of exofacial protein thiols/disulfides by protein disulfide isomerase. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 4, p. 2416–23, 22 jan. 1999.

KAETZEL, R. S.; STAPELS, M. D.; BAROFSKY, D. F.; REED, D. J. Alkylation of protein disulfide isomerase by the episulfonium ion derived from the glutathione conjugate of 1,2-dichloroethane and mass spectrometric characterization of the adducts. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 423, n. 1, p. 136–47, 1 mar. 2004.

KANELIS, J.; WATANABE, S.; LI, J. H.; KANG, D. H.; LI, P.; NAKAGAWA, T.; WAMSLEY, A.; SHEIKH-HAMAD, D.; LAN, H. Y.; FENG, L.; JOHNSON, R. J. Uric acid stimulates monocyte chemoattractant protein-1 production in vascular smooth muscle cells via mitogen-activated protein kinase and cyclooxygenase-2. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 41, n. 6, p. 1287–93, jun. 2003.

KARALA, A.-R.; PSARRAKOS, P.; RUDDOCK, L. W.; KLAPPA, P. Protein disulfide isomerases from *C. elegans* are equally efficient at thiol-disulfide exchange in simple peptide-based systems but show differences in reactivity towards protein substrates. **Antioxidants & redox signaling**, v. 9, n. 11, p. 1815–23, nov. 2007.

KAUR, H.; HALLIWELL, B. Action of biologically-relevant oxidizing species upon uric acid. Identification of uric acid oxidation products. **Chemico-biological interactions**, v. 73, n. 2–3, p. 235–47, 1990.

KHOSLA, U. M.; ZHAKIROV, S.; FINCH, J. L.; NAKAGAWA, T.; RONCAL, C.; MU, W.; KROTOVA, K.; BLOCK, E. R.; PRABANKAR, S.; JOHNSON, R. J. Hyperuricemia induces endothelial dysfunction. **Kidney international**, v. 67, n. 5, p. 1739–42, maio 2005.

KITTRIDGE, K. J.; WILLSON, R. L. Uric acid substantially enhances the free radical-induced inactivation of alcohol dehydrogenase. **FEBS letters**, v. 170, n. 1, p. 162–4, 7 maio 1984.

KLEBANOFF, S. J.; KETTLE, A. J.; ROSEN, H.; WINTERBOURN, C. C.; NAUSEEF, W. M. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. **Journal of leukocyte biology**, v. 93, n. 2, p. 185–98, 1 fev. 2013.

KONO, H.; CHEN, C.; ONTIVEROS, F.; ROCK, K. L. Uric acid promotes an acute inflammatory response to sterile cell death in mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 6, p. 1939–49, 1 jun. 2010.

KOZLOV, G.; MÄÄTTÄNEN, P.; THOMAS, D. Y.; GEHRING, K. A structural overview of the PDI family of proteins. **FEBS Journal**, v. 277, n. 19, p. 3924–3936, out. 2010.

KUTZING, M. K.; FIRESTEIN, B. L. Altered Uric Acid Levels and Disease States. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 324, n. 1, p. 1–7, 5 out. 2007.

KUWABARA, M.; NIWA, K.; NISHIHARA, S.; NISHI, Y.; TAKAHASHI, O.; KARIO, K.; YAMAMOTO, K.; YAMASHITA, T.; HISATOME, I. Hyperuricemia is an independent competing risk factor for atrial fibrillation. **International Journal of Cardiology**, v. 231, p. 137–142, 15 mar. 2017.

KUWABARA, Y.; NISHINO, T.; OKAMOTO, K.; MATSUMURA, T.; EGER, B. T.; PAI, E. F.; NISHINO, T. Unique amino acids cluster for switching from the dehydrogenase to oxidase form of xanthine oxidoreductase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 14, p. 8170–5, 8 jul. 2003.

KUZKAYA, N.; WEISSMANN, N.; HARRISON, D. G.; DIKALOV, S. Interactions of peroxynitrite with uric acid in the presence of ascorbate and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric oxide synthase. **Biochemical pharmacology**, v. 70, n. 3, p. 343–54, 1 ago. 2005.

LAHAV, J.; GOFER-DADOSH, N.; LUBOSHITZ, J.; HESS, O.; SHAKLAI, M. Protein disulfide isomerase mediates integrin-dependent adhesion. **FEBS letters**, v. 475, n. 2, p. 89–92, 16 jun. 2000.

LAHAV, J.; JURK, K.; HESS, O.; BARNES, M. J.; FARNDAL, R. W.; LUBOSHITZ, J.; KEHREL, B. E. Sustained integrin ligation involves extracellular free sulfhydryls and enzymatically catalyzed disulfide exchange. **Blood**, v. 100, n. 7, p. 2472–8, 1 out. 2002.

LAHAV, J.; WIJNEN, E. M.; HESS, O.; HAMAIA, S. W.; GRIFFITHS, D.; MAKRIS, M.; KNIGHT, C. G.; ESSEX, D. W.; FARNDAL, R. W. Enzymatically catalyzed disulfide exchange is required for platelet adhesion to collagen via integrin $\alpha 2\beta 1$. **Blood**, v. 102, n. 6, p. 2085–92, 15 set. 2003.

LAMBERG, A.; JAUHAINEN, M.; METSO, J.; EHNHOLM, C.; SHOULDERS, C.; SCOTT, J.; PIHLAJANIEMI, T.; KIVIRIKKO, K. I. The role of protein disulphide isomerase in the microsomal triacylglycerol transfer protein does not reside in its isomerase activity. **The Biochemical journal**, v. 315 (Pt 2), p. 533–6, 15 abr. 1996.

LAPPI, A.-K.; RUDDOCK, L. W. Reexamination of the role of interplay between glutathione and protein disulfide isomerase. **Journal of molecular biology**, v. 409, n. 2, p. 238–49, 3 jun. 2011.

LAUFFENBURGER, D. A.; HORWITZ, A. F. Cell migration: a physically integrated molecular process. **Cell**, v. 84, n. 3, p. 359–69, 9 fev. 1996.

LAURINDO, F. R. M.; PESCATORE, L. A.; DE CASTRO FERNANDES, D. Protein disulfide isomerase in redox cell signaling and homeostasis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 9, p. 1954–1969, 1 maio 2012.

LI, M.; HOU, W.; ZHANG, X.; HU, L.; TANG, Z. Hyperuricemia and risk of stroke: A systematic review and meta-analysis of prospective studies. **Atherosclerosis**, v. 232, n. 2, p. 265–270, 1 fev. 2014.

LIANG, C.-C.; PARK, A. Y.; GUAN, J.-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–333, 1 fev. 2007.

LIANG, W. Y.; ZHU, X. Y.; ZHANG, J. W.; FENG, X. R.; WANG, Y. C.; LIU, M. L. Uric acid promotes chemokine and adhesion molecule production in vascular endothelium via nuclear factor-kappa B signaling. **Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD**, v. 25, n. 2, p. 187–94, fev. 2015.

MA, Q.-L.; ZHANG, G.-G.; PENG, J. Vascular peroxidase 1: a novel enzyme in promoting oxidative stress in cardiovascular system. **Trends in cardiovascular medicine**, v. 23, n. 5, p. 179–83, jul. 2013.

MADAMANCHI, N. R.; RUNGE, M. S. Redox signaling in cardiovascular health and disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 61, p. 473–501, ago. 2013.

MANDAL, A. K.; MOUNT, D. B. The Molecular Physiology of Uric Acid Homeostasis. **Annual Review of Physiology**, v. 77, n. 1, p. 323–345, 10 fev. 2015.

MANDEL, R.; RYSER, H. J.; GHANI, F.; WU, M.; PEAK, D. Inhibition of a reductive function of the plasma membrane by bacitracin and antibodies against protein disulfide-isomerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 9, p. 4112–6, 1 maio 1993.

MAPLES, K. R.; MASON, R. P. Free radical metabolite of uric acid. **The Journal of biological chemistry**, v. 263, n. 4, p. 1709–12, 5 fev. 1988.

MARQUEZ, L. A.; DUNFORD, H. B. Kinetics of oxidation of tyrosine and dityrosine by myeloperoxidase compounds I and II. Implications for lipoprotein peroxidation studies. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 51, p. 30434–40, 22 dez. 1995.

MARQUEZ, L. A.; DUNFORD, H. B.; VAN WART, H. Kinetic studies on the reaction of compound II of myeloperoxidase with ascorbic acid. Role of ascorbic acid in myeloperoxidase function. **The Journal of biological chemistry**, v. 265, n. 10, p. 5666–70, 5 abr. 1990.

MARTINON, F.; PÉTRILLI, V.; MAYOR, A.; TARDIVEL, A.; TSCHOPP, J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. **Nature**, v. 440, n. 7081, p. 237–41, 9 mar. 2006.

MEOTTI, F. C.; JAMESON, G. N. L.; TURNER, R.; HARWOOD, D. T.; STOCKWELL, S.; REES, M. D.; THOMAS, S. R.; KETTLE, A. J. Urate as a physiological substrate for myeloperoxidase: implications for hyperuricemia and inflammation. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 15, p. 12901–11, 15 abr. 2011.

MOLDOVAN, L.; MOLDOVAN, N. I.; SOHN, R. H.; PARIKH, S. A.; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, P. J. Redox changes of cultured endothelial cells and actin dynamics. **Circulation research**, v. 86, n. 5, p. 549–57, 17 mar. 2000.

MOR-COHEN, R. Disulfide Bonds as Regulators of Integrin Function in Thrombosis and Hemostasis. **Antioxidants & redox signaling**, v. 24, n. 1, p. 16–31, 1 jan. 2016.

MURAOKA, S.; MIURA, T. Inhibition by uric acid of free radicals that damage biological molecules. **Pharmacology & toxicology**, v. 93, n. 6, p. 284–9, dez. 2003.

MUSTARD, J. F.; MURPHY, E. A.; OGRYZLO, M. A.; SMYTHE, H. A. BLOOD COAGULATION AND PLATELET ECONOMY IN SUBJECTS WITH PRIMARY GOUT. **Canadian Medical Association journal**, v. 89, p. 1207–11, 14 dez. 1963.

NAKAGAWA, T.; TUTTLE, K. R.; SHORT, R. A.; JOHNSON, R. J. Hypothesis: fructose-induced hyperuricemia as a causal mechanism for the epidemic of the metabolic syndrome. **Nature Clinical Practice Nephrology**, v. 1, n. 2, p. 80–86, 1 dez. 2005.

NELSON, D. L.; MICHAEL, M. C. **Principios de Bioquímica de Lehninger**. 6ª Ed ed. Porto Alegre: ArtMed, 2011.

NIKI, E. Do free radicals play causal role in atherosclerosis? Low density lipoprotein oxidation and vitamin E revisited. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v. 48, n. 1, p. 3–7, jan. 2011.

NISKANEN, L. K.; LAAKSONEN, D. E.; NYSSONEN, K.; ALFTHAN, G.; LAKKA, H. M.; LAKKA, T. A.; SALONEN, J. T. Uric Acid Level as a Risk Factor for Cardiovascular and All-Cause Mortality in Middle-aged Men. **Archives of Internal Medicine**, v. 164, n. 14, p. 1546, 26 jul. 2004.

ODA, M.; SATTA, Y.; TAKENATA, O.; TAKAHATA, N. Loss of Urate Oxidase Activity in Hominoids and its Evolutionary Implications. **Molecular Biology and Evolution**, v. 19, n. 5, p. 640–653, 1 maio 2002.

PAGANONI, S.; SCHWARZSCHILD, M. A. Urate as a Marker of Risk and Progression of Neurodegenerative Disease. **Neurotherapeutics**, v. 14, n. 1, p. 148–153, 19 jan. 2017.

PATRICIO, E. S. **Avaliação da interação do hidroperóxido de urato com a proteína dissulfeto isomerase (PDI) em processos inflamatórios [dissertação]** Sao Paulo: Universidade de São Paulo; Instituto de Química, 2014.

PATRICIO, E. S.; PRADO, F. M.; DA SILVA, R. P.; CARVALHO, L. A. C.; PRATES, M. V. C.; DADAMOS, T.; BERTOTTI, M.; DI MASCIO, P.; KETTLE, A. J.; MEOTTI, F. C. Chemical Characterization of Urate Hydroperoxide, A Pro-oxidant Intermediate Generated by Urate Oxidation in Inflammatory and Photoinduced Processes. **Chemical research in toxicology**, v. 28, n. 8, p. 1556–66, 17 ago. 2015.

PEIXOTO, Á. S.; GEYER, R. R.; IQBAL, A.; TRUZZI, D. R.; SOARES MORETTI, A. I.; LAURINDO, F. R. M.; AUGUSTO, O. Peroxynitrite preferentially oxidizes the dithiol redox motifs of protein-disulfide isomerase. **The Journal of biological chemistry**, v. 293, n. 4, p. 1450–1465, 26 jan. 2018.

PENG, F.; ZHANG, B.; ZHONG, X.; LI, J.; XU, G.; HU, X.; QIU, W.; PEI, Z. Serum uric acid levels of patients with multiple sclerosis and other neurological diseases. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 14, n. 2, p. 188–196, 17 mar. 2008.

PONAMARCZUK, H.; POPIELARSKI, M.; STASIAK, M.; BEDNAREK, R.; STUDZIAN, M.; PULASKI, L.; BABINSKA, A.; SWIATKOWSKA, M. Contribution of activated beta3 integrin in the PDI release from endothelial cells. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 23, p. 1612–1627, 2018.

POPESCU, N. I.; LUPU, C.; LUPU, F. Extracellular protein disulfide isomerase regulates coagulation on endothelial cells through modulation of phosphatidylserine exposure. **Blood**, v. 116, n. 6, p. 993–1001, 12 ago. 2010.

RAMACHANDRAN, N.; ROOT, P.; JIANG, X. M.; HOGG, P. J.; MUTUS, B. Mechanism of transfer of NO from extracellular S-nitrosothiols into the cytosol by cell-surface protein disulfide isomerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 17, p. 9539–44, 14 ago. 2001.

REDDIE, K. G.; CARROLL, K. S. Expanding the functional diversity of proteins through cysteine oxidation. **Current opinion in chemical biology**, v. 12, n. 6, p. 746–54, dez. 2008.

RHEE, S. G. Overview on Peroxiredoxin. **Molecules and Cells**, v. 39, n. 1, p. 1–5, 31 jan. 2016.

RIDDLES, P. W.; BLAKELEY, R. L.; ZERNER, B. Ellman's reagent: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)-a reexamination. **Analytical biochemistry**, v. 94, n. 1, p. 75–81, 1 abr. 1979.

RYSER, H. J.; MANDEL, R.; GHANI, F. Cell surface sulfhydryls are required for the cytotoxicity of diphtheria toxin but not of ricin in Chinese hamster ovary cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 266, n. 28, p. 18439–42, 5 out. 1991.

SAN MARTÍN, A.; GRIENGLING, K. K. Redox Control of Vascular Smooth Muscle Migration. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 12, n. 5, p. 625–640, 1 mar. 2010.

SANTANA, M. S.; NASCIMENTO, K. P.; LOTUFO, P. A.; BENSEÂOR, I. M.; MEOTTI, F. C. Allantoin as an independent marker associated with carotid intima-media thickness in subclinical atherosclerosis. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 51, n. 8, p. e7543, 18 jun. 2018.

SANTOS, C. X.; ANJOS, E. I.; AUGUSTO, O. Uric acid oxidation by peroxynitrite: multiple reactions, free radical formation, and amplification of lipid oxidation. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 372, n. 2, p. 285–94, 15 dez. 1999.

SANTUS, R.; PATTERSON, L. K.; FILIPE, P.; MORLIERE, P.; HUG, G. L.; FERNANDES, A.; MAZIÈRE, J. C. Redox reactions of the urate radical/urate couple with the superoxide radical anion, the tryptophan neutral radical and selected flavonoids in neutral aqueous solutions. **Free radical**

research, v. 35, n. 2, p. 129–36, ago. 2001.

SCHAEFER, L. Complexity of danger: the diverse nature of damage-associated molecular patterns. **The Journal of biological chemistry**, v. 289, n. 51, p. 35237–45, 19 dez. 2014.

SEIDEL, A.; PARKER, H.; TURNER, R.; DICKERHOF, N.; KHALILOVA, I. S.; WILBANKS, S. M.; KETTLE, A. J.; JAMESON, G. N. L. Uric acid and thiocyanate as competing substrates of lactoperoxidase. **The Journal of biological chemistry**, v. 289, n. 32, p. 21937–49, 8 ago. 2014.

SEVIER, C. S.; KAISER, C. A. Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 11, p. 836–847, 1 nov. 2002.

SHAMSI, F. A.; HADI, S. M. Photoinduction of strand scission in DNA by uric acid and Cu(II). **Free radical biology & medicine**, v. 19, n. 2, p. 189–96, ago. 1995.

SHI, Y.; EVANS, J. E.; ROCK, K. L. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. **Nature**, v. 425, n. 6957, p. 516–21, 2 out. 2003.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative Stress. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, n. 1, p. 715–748, 20 jun. 2017.

SILVA, R. P.; CARVALHO, L. A. C.; PATRICIO, E. S.; BONIFACIO, J. P. P.; CHAVES-FILHO, A. B.; MIYAMOTO, S.; MEOTTI, F. C. Identification of urate hydroperoxide in neutrophils: A novel pro-oxidant generated in inflammatory conditions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 126, p. 177–186, out. 2018.

SIMIC, M. G.; JOVANOVIĆ, S. V. Antioxidation mechanisms of uric acid. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, n. 15, p. 5778–5782, jul. 1989.

SKINNER, K. A.; WHITE, C. R.; PATEL, R.; TAN, S.; BARNES, S.; KIRK, M.; DARLEY-USMAR, V.; PARKS, D. A. Nitrosation of uric acid by peroxynitrite. Formation of a vasoactive nitric oxide donor. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 38, p. 24491–7, 18 set. 1998.

SO, A.; THORENS, B. Uric acid transport and disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 6, p. 1791–9, 1 jun. 2010.

SOARES MORETTI, A. I.; MARTINS LAURINDO, F. R. Protein disulfide isomerases: Redox connections in and out of the endoplasmic reticulum. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 617, p. 106–119, 1 mar. 2017.

SONG, J. L.; WANG, C. C. Chaperone-like activity of protein disulfide-isomerase in the refolding of rhodanese. **European journal of biochemistry**, v. 231, n. 2, p. 312–6, 15 jul. 1995.

SOUDI, M.; PAUMANN-PAGE, M.; DELPORTE, C.; PIRKER, K. F.; BELLEI, M.; EDENHOFER, E.; STADLMAYR, G.; BATTISTUZZI, G.; BOUDJELTIA, K. Z.; FURTMÜLLER, P. G.; VAN ANTWERPEN, P.; OBINGER, C. Multidomain human peroxidase 1 is a highly glycosylated and stable homotrimeric high spin ferric peroxidase. **The Journal of biological chemistry**, v. 290, n. 17, p. 10876–90, 24 abr. 2015.

STATHAKIS, P.; FITZGERALD, M.; MATTHIAS, L. J.; CHESTERMAN, C. N.; HOGG, P. J. Generation of angiotensin by reduction and proteolysis of plasmin. Catalysis by a plasmin reductase secreted by cultured cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 33, p. 20641–5, 15 ago. 1997.

STOCKER, R.; KEANEY, J. F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiological reviews**, v. 84, n. 4, p. 1381–478, out. 2004.

SUZUKI, T.; YAMAMOTO, H.; PFLEIDERER, W. Nitrosation of N-methyl derivatives of uric acid and their transnitrosation ability to N-acetylcysteine. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 58, n. 9, p. 1271–5, set. 2010.

SWIATKOWSKA, M.; SZYMAŃSKI, J.; PADULA, G.; CIERNIEWSKI, C. S. Interaction and functional association of protein disulfide isomerase with $\alpha V\beta 3$ integrin on endothelial cells. **FEBS Journal**, v. 275, n. 8, p. 1813–1823, abr. 2008.

TAMARIZ, L.; AGARWAL, S.; SOLIMAN, E. Z.; CHAMBERLAIN, A. M.; PRINEAS, R.; FOLSOM, A. R.; AMBROSE, M.; ALONSO, A. Association of Serum Uric Acid With Incident Atrial Fibrillation (from

the Atherosclerosis Risk in Communities [ARIC] Study). **The American Journal of Cardiology**, v. 108, n. 9, p. 1272–1276, 1 nov. 2011.

TANAKA, L. Y.; ARAÚJO, H. A.; HIRONAKA, G. K.; ARAUJO, T. L. S.; TAKIMURA, C. K.; RODRIGUEZ, A. I.; CASAGRANDE, A. S.; GUTIERREZ, P. S.; LEMOS-NETO, P. A.; LAURINDO, F. R. M. Peri/Epicellular Protein Disulfide Isomerase Sustains Vascular Lumen Caliber Through an Anticonstrictive Remodeling Effect. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 67, n. 3, p. 613–22, mar. 2016.

THOMAS, M. J. Urate causes the human polymorphonuclear leukocyte to secrete superoxide. **Free radical biology & medicine**, v. 12, n. 1, p. 89–91, 1992.

TONCEV, G.; MILICIC, B.; TONCEV, S.; SAMARDZIC, G. Serum uric acid levels in multiple sclerosis patients correlate with activity of disease and blood-brain barrier dysfunction. **European journal of neurology**, v. 9, n. 3, p. 221–6, maio 2002.

TURANO, C.; COPPARI, S.; ALTIERI, F.; FERRARO, A. Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. **Journal of cellular physiology**, v. 193, n. 2, p. 154–63, nov. 2002.

TURNER, R.; BRENNAN, S. O.; ASHBY, L. V.; DICKERHOF, N.; HAMZAH, M. R.; PEARSON, J. F.; STAMP, L. K.; KETTLE, A. J. Conjugation of urate-derived electrophiles to proteins during normal metabolism and inflammation. **The Journal of biological chemistry**, v. 293, n. 51, p. 19886–19898, 21 dez. 2018.

VALLON, M.; AUBELE, P.; JANSSEN, K.-P.; ESSLER, M. Thrombin-induced shedding of tumour endothelial marker 5 and exposure of its RGD motif are regulated by cell-surface protein disulfide-isomerase. **The Biochemical journal**, v. 441, n. 3, p. 937–44, 1 fev. 2012.

VANACORE, R.; HAM, A.-J. L.; VOEHLER, M.; SANDERS, C. R.; CONRADS, T. P.; VEENSTRA, T. D.; SHARPLESS, K. B.; DAWSON, P. E.; HUDSON, B. G. A Sulfilimine Bond Identified in Collagen IV. **Science**, v. 325, n. 5945, p. 1230–1234, 4 set. 2009.

VOLK, K. J.; YOST, R. A.; BRAJTER-TOTH, A. On-line electrochemistry/thermospray/tandem mass spectrometry as a new approach to the study of redox reactions: the oxidation of uric acid. **Analytical chemistry**, v. 61, n. 15, p. 1709–17, 1 ago. 1989.

VUORI, K.; PIHLAJANIEMI, T.; MYLLYLÄ, R.; KIVIRIKKO, K. I. Site-directed mutagenesis of human protein disulphide isomerase: effect on the assembly, activity and endoplasmic reticulum retention of human prolyl 4-hydroxylase in *Spodoptera frugiperda* insect cells. **The EMBO journal**, v. 11, n. 11, p. 4213–7, nov. 1992.

WAN, S.-W.; LIN, C.-F.; LU, Y.-T.; LEI, H.-Y.; ANDERSON, R.; LIN, Y.-S. Endothelial cell surface expression of protein disulfide isomerase activates β 1 and β 3 integrins and facilitates dengue virus infection. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 113, n. 5, p. n/a-n/a, maio 2011.

WANG, C. C.; TSOU, C. L. Protein disulfide isomerase is both an enzyme and a chaperone. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 7, n. 15, p. 1515–7, dez. 1993.

WANG, C.; LI, W.; REN, J.; FANG, J.; KE, H.; GONG, W.; FENG, W.; WANG, C.-C. Structural insights into the redox-regulated dynamic conformations of human protein disulfide isomerase. **Antioxidants & redox signaling**, v. 19, n. 1, p. 36–45, 1 jul. 2013.

WANG, C.; YU, J.; HUO, L.; WANG, L.; FENG, W.; WANG, C. Human protein-disulfide isomerase is a redox-regulated chaperone activated by oxidation of domain a'. **The Journal of biological chemistry**, v. 287, n. 2, p. 1139–49, 6 jan. 2012.

WANG, L.; WANG, X.; WANG, C. Protein disulfide-isomerase, a folding catalyst and a redox-regulated chaperone. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 83, p. 305–313, 1 jun. 2015.

WATANABE, M. M.; LAURINDO, F. R. M.; FERNANDES, D. C. Methods of measuring protein disulfide isomerase activity: a critical overview. **Frontiers in chemistry**, v. 2, p. 73, 3 set. 2014.

WAYNER, D. D.; BURTON, G. W.; INGOLD, K. U.; BARCLAY, L. R.; LOCKE, S. J. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping

antioxidant activity of human blood plasma. **Biochimica et biophysica acta**, v. 924, n. 3, p. 408–19, 22 jun. 1987.

WHITEMAN, M.; KETSAWATSAKUL, U.; HALLIWELL, B. A reassessment of the peroxynitrite scavenging activity of uric acid. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 962, p. 242–59, maio 2002.

WHO. WORD HEALTH ORGANIZATION. **No Title.** Disponível em: <https://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/>. Acesso em: 11 fev. 2019.

WILKINSON, B.; GILBERT, H. F. Protein disulfide isomerase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1699, n. 1–2, p. 35–44, 1 jun. 2004.

WILLEMS, S. H.; TAPE, C. J.; STANLEY, P. L.; TAYLOR, N. A.; MILLS, I. G.; NEAL, D. E.; MCCAFFERTY, J.; MURPHY, G. Thiol isomerases negatively regulate the cellular shedding activity of ADAM17. **The Biochemical journal**, v. 428, n. 3, p. 439–50, 27 maio 2010.

WINTER, J.; KLAPPA, P.; FREEDMAN, R. B.; LILIE, H.; RUDOLPH, R. Catalytic activity and chaperone function of human protein-disulfide isomerase are required for the efficient refolding of proinsulin. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 1, p. 310–7, 4 jan. 2002.

WINTERBOURN, C. C.; HAMPTON, M. B. Redox biology: signaling via a peroxiredoxin sensor. **Nature chemical biology**, v. 11, n. 1, p. 5–6, 17 jan. 2015.

WINTERBOURN, C. C.; METODIEWA, D. Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. **Free radical biology & medicine**, v. 27, n. 3–4, p. 322–8, ago. 1999.

WINTERBOURN, C. C.; PARSONS-MAIR, H. N.; GEBICKI, S.; GEBICKI, J. M.; DAVIES, M. J. Requirements for superoxide-dependent tyrosine hydroperoxide formation in peptides. **The Biochemical journal**, v. 381, n. Pt 1, p. 241–8, 1 jul. 2004.

WOO, H. A.; JEONG, W.; CHANG, T.-S.; PARK, K. J.; PARK, S. J.; YANG, J. S.; RHEE, S. G. Reduction of Cysteine Sulfinic Acid by Sulfiredoxin Is Specific to 2-Cys Peroxiredoxins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 5, p. 3125–3128, 4 fev. 2005.

XIMENES, V. F.; MAGHZAL, G. J.; TUERNER, R.; KATO, Y.; WINTERBOURN, C. C.; KETTLE, A. J. Serotonin as a physiological substrate for myeloperoxidase and its superoxide-dependent oxidation to cytotoxic tryptamine-4,5-dione. **The Biochemical journal**, v. 425, n. 1, p. 285–93, 14 dez. 2009.

YAO, Y.; ZHOU, Y.; WANG, C. Both the isomerase and chaperone activities of protein disulfide isomerase are required for the reactivation of reduced and denatured acidic phospholipase A2. **The EMBO journal**, v. 16, n. 3, p. 651–8, 3 fev. 1997.

ZAI, A.; RUDD, M. A.; SCRIBNER, A. W.; LOSCALZO, J. Cell-surface protein disulfide isomerase catalyzes transnitrosation and regulates intracellular transfer of nitric oxide. **The Journal of clinical investigation**, v. 103, n. 3, p. 393–9, 1 fev. 1999.

APÊNDICES

Apêndice A – Identificação de todos os peptídeos encontrados em amostras de PDI submetidas à digestão com tripsina e análise nLC-MS/MS

Tabela A1 - nLC-MS/MS de todos os peptídeos encontrados em amostras de PDI incubadas com veículo^a

Peptide ^b	Massa teórica (M + H)	<i>m/z</i> ^c	Massa experimental	Massa calculada	Erro (ppm)	Ion score ^d	Aminoácido modificado
KSNFAEALAAHK	1286,6857	429,5675	1285,6805	1285,6778	2,09	93	
SNFAEALAAHK	1158,5908	386,8678	1157,5817	1157,5829	-1,03	89	
YLLVEFYAPWCGHK	1942,8985	648,3054	1941,8943	1941,8906	1,93	58	C ⁵³ e C ⁵⁶ - Carbamidometilação
ALAPEYAK	862,4675	431,7364	861,4582	861,4596	-1,64	55	
VDATEESDLAQQYGVR	1780,8354	890,9237	1779,8328	1779,8275	2,99	155	
EADDIVNWLK	1202,6058	601,8057	1201,5968	1201,5979	-0,90	80	
EADDIVNWLK	1218,6007	609,8057	1217,5967	1217,5928	3,24	57	W ¹²⁸ - Hidroxilação
RTGPAATTLPGAAAESLVESSEVAVIGFFK	3091,5952	1031,2077	3090,6013	3090,5873	4,51	142	
DVESDSAK	850,3795	425,6899	849,3653	849,3716	-7,43	50	
QFLQAAEAIDDPFGITSNSDVFSK	2713,3362	905,1218	2712,3435	2712,3283	5,59	135	
YQLDKDGVVLFK	1424,7790	475,5970	1423,7692	1423,7711	-1,32	94	
DGVVLFK	777,4512	389,2278	776,4411	776,4433	-2,74	73	
NNFEGEVTKENLLDFIK	2010,0184	670,6803	2009,0191	2009,0105	4,24	113	
NNFEGEVTK	1037,4904	519,2468	1036,4791	1036,4825	-3,30	64	
NNFEGEVTKENLLDFIK	2010,0184	670,6797	2009,0174	2009,0105	3,39	49	

NNFEGEVTK	1037,4904	519,2486	1036,4827	1036,4825	0,13	48	
ENLLDFIK	991,5465	496,2750	990,5354	990,5386	-3,24	70	
HNQLPLVIEFTEQTAPK	1965,0446	655,6885	1964,0437	1964,0367	3,57	128	
IFGGEIK	763,4355	382,2195	762,4244	762,4276	-4,16	38	
THILLFLPK	1081,6774	361,2317	1080,6732	1080,6695	3,40	66	
SVSDYDGK	870,3846	435,6941	869,3736	869,3767	-3,49	46	
TAAESFK	753,3784	377,1912	752,3679	752,3705	-3,38	52	
ILFIFIDSDHTDNQR	1833,9136	611,9786	1832,9138	1832,9057	4,42	96	
ILEFFGLK	966,5665	483,7865	965,5584	965,5586	-0,17	67	
EECPAVR	860,3937	430,6983	859,3821	859,3858	-4,26	39	C ³¹² - Carbamidometilação
LITLEEEMTK	1222,6241	611,8150	1221,6154	1221,6162	-0,65	80	M ³²⁴ - Oxidação
LITLEEEMTK	1206,6292	603,8174	1205,6203	1205,6213	-0,83	75	
YKPESEELTAER	1451,7018	484,5729	1450,6970	1450,6939	2,10	97	
IKPHLMSQELPEDWDKQPVK	2418,2492	605,3196	2417,2492	2417,2413	3,28	111	
IKPHLMSQELPEDWDK	1965,9745	655,9978	1964,9716	1964,9666	2,55	106	
IKPHLMSQELPEDWDKQPVK	2434,2441	609,3168	2433,2381	2433,2362	0,78	62	M ³⁵⁶ - Oxidação
NFEDVAFDEK	1213,5378	607,2728	1212,5311	1212,5299	1,00	68	
KNVFVEFYAPWCGHCK	2041,9418	511,2460	2040,9418	2040,9339	3,90	78	C ³⁹⁷ e C ⁴⁰⁰ - Carbamidometilação
NVFVEFYAPWCGHCK	1913,8468	638,6238	1912,8496	1912,8389	5,57	63	C ³⁹⁷ e Cys ⁴⁰⁰ - Carbamidometilação
QLAPIWDK	970,5363	485,7727	969,5309	969,5284	2,66	57	
QLAPIWDK	986,5312	493,7675	985,5205	985,5233	-2,84	42	W ⁴⁰⁷ - Hidroxilação
LGETYKDHENIVIAK	1729,9125	433,2335	1728,9049	1728,9046	0,16	71	

DHENIVIAK	1038,5584	519,7813	1037,5481	1037,5505	-2,34	59	
MDSTANEVEAVK	1309,5946	655,3000	1308,5855	1308,5867	-0,95	107	M ⁴²⁵ - Oxidação
MDSTANEVEAVK	1293,5997	647,3004	1292,5862	1292,5918	-4,35	105	
VHSFPTLK	928,5257	464,7626	927,5106	927,5178	-7,76	39	
FFPASADR	910,4424	455,7233	909,4320	909,4345	-2,72	62	
TVIDYNGER	1066,5170	533,7588	1065,5030	1065,5091	-5,72	60	
KFLESGGQDGAGDDDDLEDLEEAEPPDMEED DDQK	3885,5417	972,1471	3884,5592	3884,5338	6,55	63	
FLESGGQDGAGDDDDLEDLEEAEPPDMEED DDQK	3757,4467	1879,2390	3756,4634	3756,4388	6,56	128	
FLESGGQDGAGDDDDLEDLEEAEPPDMEED DDQK	3773,4416	944,1203	3772,4522	3772,4337	4,90	90	M ⁴⁹⁵ - Oxidação

^aPDI reduzida (10 µM) foi incubada com veículo em tampão fosfato (100 mM, pH 7,4) contendo DTPA (0,1 mM), a 25 °C por 10 min. As amostras foram alquiladas em tampão desnaturante, digeridas com tripsina e submetidas a análise nLC-MS/MS conforme descrito nos procedimentos experimentais;

^b Apenas os peptídeos modificados estão mostrados. A porcentagem de cobertura da sequência da proteína foi, em média, 84 %;

^c Todos os peptídeos foram carregados com 3 cargas, exceto KNVFEFYAPWCGHCK que foi carregado com 4 cargas.

^d *Ion score* é $-10 \log(P)$ onde P é a probabilidade do sinal observado ser um evento aleatório. Em média, para esse experimento, *ion score* individual > 59 indica extensa identidade ou homologia ($p < 0,01$).

Tabela A2 - nLC-MS/MS de todos os peptídeos encontrados em amostras de PDI tratadas com H₂O₂ (40 μM)^a

Peptídeo ^b	Massa teórica (M + H)	<i>m/z</i> ^c	Massa experimental	Massa calculada	Erro (ppm)	Ion score ^d	Aminoácido modificado
KSNFAEALAAHK	1286,6857	429,5648	1285,6725	1285,6778	-4,17	92	
SNFAEALAAHK	1158,5908	386,867	1157,5791	1157,5829	-3,31	79	
YLLVEFYAPWCGHCK	1826,8399	609,6174	1825,8305	1825,832	-0,86	82	C ⁵³ - C ⁵⁶ - Dissulfeto
LKAEGSEIR	1002,5584	334,855	1001,5431	1001,5505	-7,43	77	
VDATEESDLAQQYGVR	1780,8354	890,9224	1779,8301	1779,8275	1,48	155	
EADDIVNWLK	1202,6058	601,8026	1201,5907	1201,5979	-5,96	75	
EADDIVNWLK	1218,6007	609,8002	1217,5859	1217,5928	-5,68	60	W ¹²⁸ – Hidroxilação
EADDIVNWLKK	1330,7007	444,2366	1329,6879	1329,6928	-3,73	49	
RTGPAATTLPGAAAESLVESSEVAVIGFFK	3091,5952	1031,2033	3090,5881	3090,5873	0,24	147	
TGPAATTLPGAAAESLVESSEVAVIGFFK	2935,4941	979,1711	2934,4916	2934,4862	1,81	158	
QFLQAAEAIDDIPFGITSNSDVFSK	2713,3362	905,1141	2712,3204	2712,3283	-2,9	151	
YQLDKDGVVLFK	1424,779	475,5965	1423,7676	1423,7711	-2,48	88	
DGVVLFK	777,4512	389,2256	776,4365	776,4433	-8,64	73	
NNFEGEVTKENLLDFIK	2010,0184	670,6722	2008,9949	2009,0105	-7,78	116	
NNFEGEVTK	1037,4904	519,2439	1036,4732	1036,4825	-8,99	54	
ENLLDFIK	991,5465	496,2717	990,5288	990,5386	-9,88	57	
HNQLPLVIEFTEQTAPK	1965,0446	655,6879	1964,0418	1964,0367	2,58	133	
IFGGEIK	763,4355	382,218	762,4214	762,4276	-8,15	37	

THILLFLPK	1081,6774	361,2301	1080,6685	1080,6695	-0,96	63	
ILFIFIDSDHTDNQR	1833,9136	611,9744	1832,9014	1832,9057	-2,34	118	
ILEFFGLK	966,5665	483,7832	965,5518	965,5586	-7,03	61	
LITLEEEMTK	1222,6241	611,8121	1221,6096	1221,6162	-5,4	83	M ³²⁴ - Oxidação
LITLEEEMTK	1206,6292	603,8126	1205,6106	1205,6213	-8,91	80	
YKPESEELTAER	1451,7018	484,5702	1450,6887	1450,6939	-3,64	97	
ITEFCHR	962,4519	321,4858	961,4355	961,444	-8,81	31	C ³⁴³ - Carbamidometilação
IKPHLMSQELPEDWDK	1965,9745	655,9963	1964,9669	1964,9666	0,18	107	
IKPHLMSQELPEDWDK	1981,9694	661,3233	1980,9481	1980,9615	-6,74	59	M ³⁵⁶ - Oxidação
IKPHLMSQELPEDWDKQPVK	2418,2492	806,7554	2417,2444	2417,2413	1,3	96	
IKPHLMSQELPEDWDKQPVK	2434,2441	609,3187	2433,2457	2433,2362	3,88	77	M ³⁵⁶ - Oxidação
NFEDVAFDEK	1213,5378	607,2686	1212,5225	1212,5299	-6,04	71	
KNVFEFYAPWCGHCK	1925,8832	482,2555	1924,876	1924,8753	0,35	38	C ³⁹⁷ e C ⁴⁰⁰ - Dissulfeto
NVFEFYAPWCGHCK	1797,7883	599,9351	1796,7834	1796,7804	1,67	62	C ³⁹⁷ e C ⁴⁰⁰ - Dissulfeto
QLAPIWDK	970,5363	485,7682	969,5218	969,5284	-6,75	62	
QLAPIWDK	986,5312	493,7666	985,5187	985,5233	-4,63	44	W ⁴⁰⁷ - Hidroxilação
LGETYKDHENIVIAK	1729,9125	577,3069	1728,899	1728,9046	-3,25	119	
DHENIVIAK	1038,5584	346,8541	1037,5405	1037,5505	-9,64	54	
MDSTANEVEAVK	1309,5946	655,2946	1308,5746	1308,5867	-9,23	104	M ⁴²⁵ - Oxidação
MDSTANEVEAVK	1293,5997	647,297	1292,5794	1292,5918	-9,6	97	
VHSFPTLK	928,5257	464,7618	927,509	927,5178	-9,51	59	
FFPASADR	910,4424	455,7206	909,4266	909,4345	-8,68	49	

TVIDYNGER	1066,517	533,7584	1065,5022	1065,5091	-6,43	60	
KFLESGGQDGAGDDDDLEDLEEAEPPDME EDDDQK	3885,5417	972,1436	3884,5455	3884,5338	3,02	65	
KFLESGGQDGAGDDDDLEDLEEAEPPDME EDDDQK	3901,5366	976,1421	3900,5393	3900,5287	2,72	50	M ⁴⁹⁵ - Oxidação
FLESGGQDGAGDDDDLEDLEEAEPPDME DDDQK	3757,4467	1879,2191	3756,4236	3756,4388	-4,04	131	
FLESGGQDGAGDDDDLEDLEEAEPPDME DDDQK	3773,4416	944,1187	3772,4455	3772,4337	3,13	95	M ⁴⁹⁵ - Oxidação

^aPDI reduzida (10 μ M) foi incubada com H₂O₂ (40 μ M) em tampão fosfato (100 mM, pH 7,4) contendo DTPA (0,1 mM), a 25 °C por 10 min. As amostras foram alquiladas em tampão desnaturante, digeridas com tripsina e submetidas a análise nLC-MS/MS conforme descrito nos procedimentos experimentais;

^bTodos os peptídeos com *ion score* acima de 30 estão mostrados. A porcentagem de cobertura da sequência da proteína foi, em média, 84 %;

^cTodos os peptídeos foram carregados com 3 cargas, exceto KNVFVEFYAPWCGHCK que foi carregado com 4 cargas.

^d*Ion score* é $-10 \log(P)$ onde P é a probabilidade de o sinal observado ser um evento aleatório. Em média, para esse experimento, *ion score* individual > 59 indica extensa identidade ou homologia ($p < 0,01$).

Apêndice B - Espectros de MS e MS/MS do peptídeo referente ao domínio a' com um *missed cleavage*, alquilado e oxidado

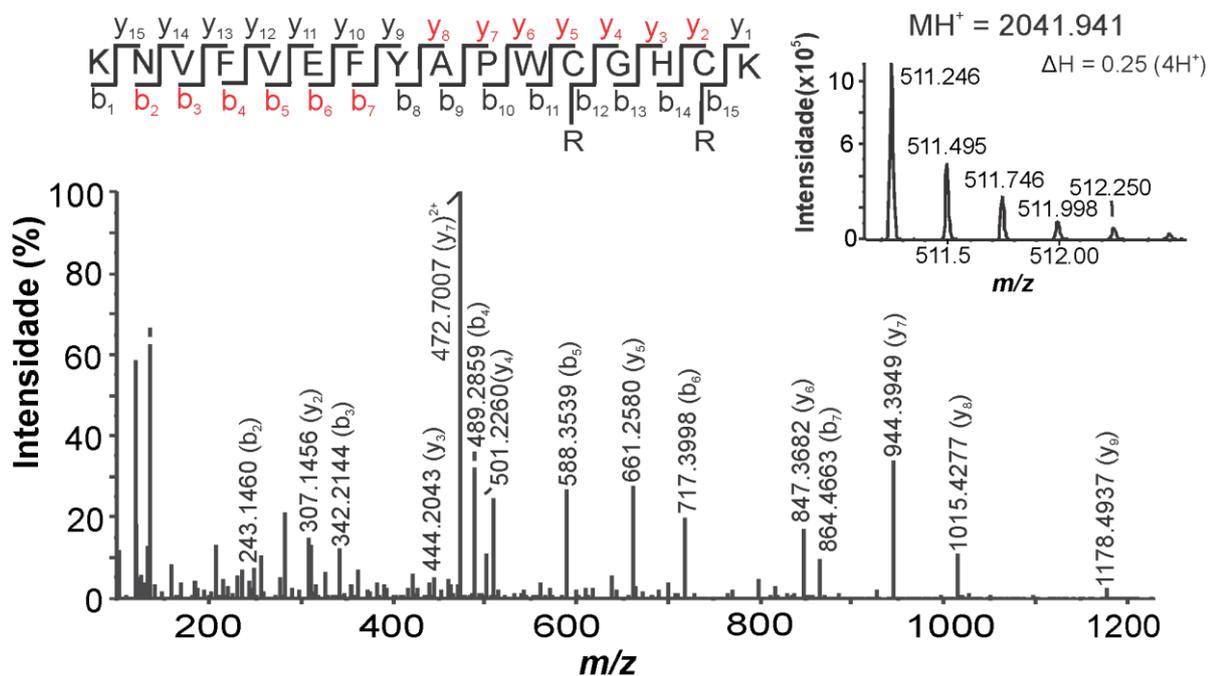


Figura B1. Caracterização do peptídeo $^{386}\text{KNVFVEFYAPWCRGHC}^{\text{R}}\text{K}^{401}$ contendo cisteínas catalíticas alquiladas. PDI reduzida (10 μM) foi incubada com veículo (acetato de amônio), em tampão fosfato (100 mM, pH 7,4) contendo DTPA (0,1 mM), a 25°C, por 10 min. Em seguida, as amostras foram submetidas à digestão com tripsina e submetidas à análise por nLC-MS/MS (A). Sequenciamento por MS/MS do pico com m/z igual a 511,2460, correspondente ao peptídeo alquilado (massa monoisotópica 2040,9418 Da) com 4 cargas. 100% intensidade = 6×10^3 . Os insertos à esquerda representam os fragmentos das series b e y previstos teoricamente. Os fragmentos encontrados no espectro experimental estão destacados em vermelho. Os insertos à direita mostram a distribuição monoisotópica do peptídeo com 4 cargas. O espectro é representativo de triplicatas experimentais.

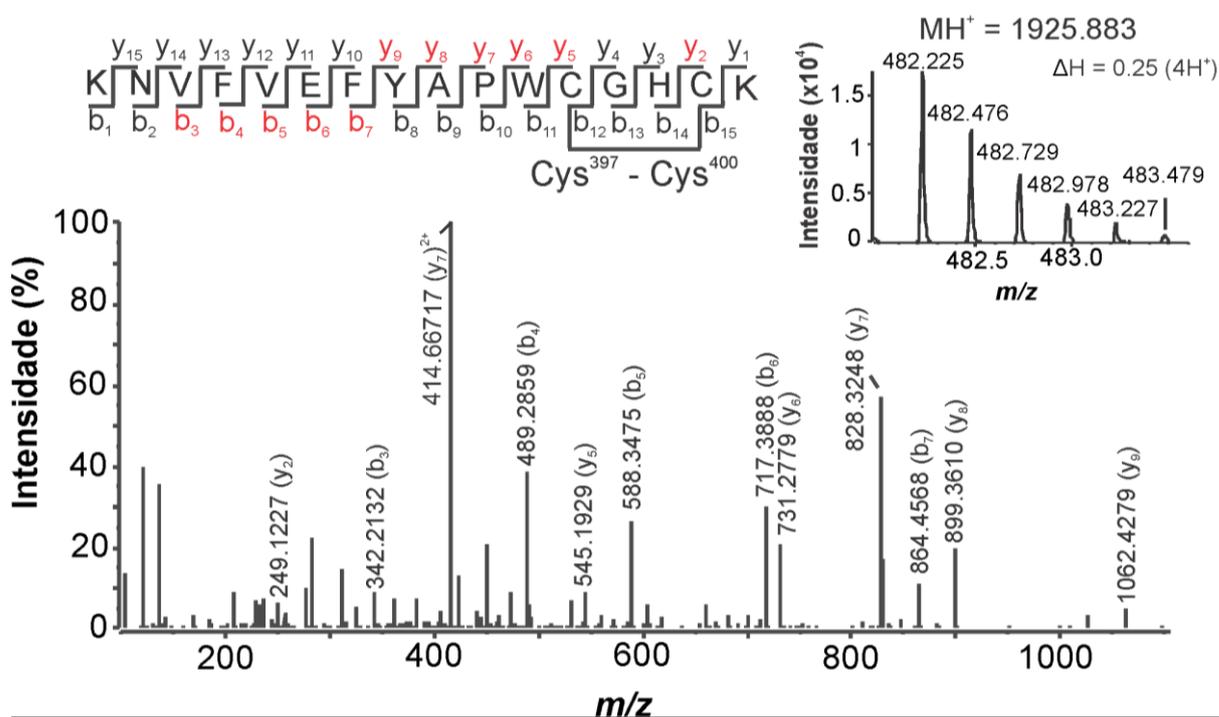


Figura B2. Caracterização do peptídeo $^{386}\text{KNVFVEFYAPWCGHCK}^{401}$ – 2H contendo cisteínas catalíticas alquiladas. PDI reduzida (10 μM) foi incubada com veículo (acetato de amônio), em tampão fosfato (100 mM, pH 7,4) contendo DTPA (0,1 mM), a 25°C, por 10 min. Em seguida, as amostras foram submetidas à digestão com tripsina e submetidas à análise por nLC-MS/MS (A). Sequenciamento por MS/MS do pico com m/z igual a 482,2555, correspondente ao peptídeo alquilado (massa monoisotópica 1924,8760 Da) com 4 cargas. 100% intensidade = 6×10^3 . Os insertos à esquerda representam os fragmentos das series b e y previstos teoricamente. Os fragmentos encontrados no espectro experimental estão destacados em vermelho. Os insertos à direita mostram a distribuição monoisotópica do peptídeo com 4 cargas. O espectro é representativo de triplicatas experimentais.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Marcela Franco Mineiro

Local e data de nascimento: Uberlândia, 3 de março de 1988

EDUCAÇÃO

- 1) Graduação em Ciências Biológicas (Licenciatura e Bacharelado nas modalidades ambiental e molecular)
 - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

- 2) Mestrado em Ciências Médicas
 - Título da dissertação: "Identificação de Receptores do tipo Nod (NLRs) em placas de ateroma humano e investigação do papel inflamatório de NLRP3 e IL-1 beta
 - Orientação: Profa. Dra. Maria Heloisa Souza Lima Blotta
 - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

RESUMOS PUBLICADOS EM CONGRESSOS

MINEIRO, M. F.; PATRICIO, E. S. ; LIMA, F. S. ; ARAUJO, T. L. S. ; SILVA, R. P. ; MORETTI, A. I. S. ; LAURINDO, F. R. M. ; MEOTTI, F. C. . Urate hydroperoxide causes endothelial cell disturbances and oxidizes cell surface protein disulfide isomerase. In: 46a Reuniao Anual da Sociedade Brasileira de Bioquimica e Biologia Molecular, 2017, Águas de Lindoia. 46a Reuniao Anual da Sociedade Brasileira de Bioquimica e Biologia Molecular, 2017.

MINEIRO, M. F.; PATRICIO, E. S.; LIMA, F. S.; ARAUJO, T. L. S.; MORETTI, A. I. S.; LAURINDO, F. R. M.; MEOTTI, F.C. Oxidation of Pericellular Endothelial Protein Disulfide Isomerase by Urate Hydroperoxide: Implications on Vascular Homeostasis. In: 23rd Annual Meeting of the Society for Redox Biology and Medicine's (SfRBM), 2016, San Francisco. 23rd Annual Meeting of the Society for Redox Biology and Medicine's (SfRBM), 2016.

OLIVEIRA, R. T. D. ; MINEIRO, M. F. ; SILVA, R. M. ; PAIAO, M.R. ; MAMONI, R. L.; MENEZES, F. H. ; BLOTTA, M. H. S. L. Identification of NOD Like Receptors (NLRs) in Human Atheroma Lesions. In: 15th International Congress of Immunology, 2013, Milão. 15th International Congress of Immunology, 2013.

OLIVEIRA, R. T. D.; MINEIRO, M. F. ; SILVA, R. M. ; PAIAO, M.R. ; MAMONI, R. L.; MENEZES, F. H. ; BLOTTA, M. H. S. L. Identification of NOD like receptors (NLRs) in human atheroma lesions. In: XXXVII Congress of the Brazilian Society of Immunology, 2012, Campos do Jordão. XXXVII Congress of the Brazilian Society of Immunology, 2012.

THOME, R.; MINEIRO, M. F.; FERNANDES, L. G. R.; SIMINONI, P. U.; JOAZEIRO, P. P.; TAMASHIRO, W. M. S. C. Tolerogenic dendritic cells can modulate experimental arthritis in mice. In: 15th International Congress of Mucosal Immunology, 2011, Paris. 15th International Congress of Mucosal Immunology, 2011.

MINEIRO, M. F.; ROOS, E. L.; OLIVEIRA, R. T. D.; SILVA, R. M.; MENEZES, F. H.; BLOTTA, M. H. S. L. mRNA and protein expression of NLRs components in human atherosclerotic plaques. In: XXXVI Congress of the Brazilian Society of Immunology, 2011, Foz do Iguaçu. XXXVI Congress of the Brazilian Society of Immunology, 2011.

THOME, R.; MINEIRO, M. F.; SIMIONI, P. U.; TAMASHIRO, W. M. S. C. Experimental arthritis can be modulated by oral tolerance to ovalbumin with the putative participation of tolerogenic dendritic cells. In: XXXV Congress of the Brazilian Society of Immunology, 2010, Porto Alegre. XXXV Congress of the Brazilian Society of Immunology, 2010.

THOME, R.; MINEIRO, M. F.; SIMIONI, P. U.; JOAZEIRO, P. P.; TAMASHIRO, W. M. S. C. Oral tolerance to ovalbumin reduces the severity of collagen-induced arthritis in BALB/c mice. In: 3rd Latin American Congress of Autoimmunity, 2010, Buenos Aires. 3rd Latin American Congress of Autoimmunity.

MINEIRO, M. F.; THOME, R.; SIMINONI, P. U.; TAMASHIRO, W. M. S. C. Avaliação do possível papel modulador de células dendríticas na artrite experimental induzida pela associação de colágeno tipo II e ovalbumina. In: XVIII Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP, 2010, Campinas. XVIII Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP, 2010.

PUBLICAÇÕES (Artigos Completos e Submetidos)

MINEIRO, M. F.; PATRICIO, E. S.; LIMA, F. S.; PEIXOTO, A. S.; ARAUJO, T. L. S.; MORETTI, A. I. S.; LAURINDO, F. R. M. L.; MEOTTI, F. C. Urate hydroperoxide oxidizes endothelial cell surface protein disulfide isomerase-A1 and impairs adherence. **Biochemical Journal** (submetido)

DOS SANTOS, A. F.; TERRA, L. F.; WAILEMAN, R. A. M.; OLIVEIRA, T. C.; GOMES, V. M.; MINEIRO, M. F.; MEOTTI, F. C.; BRUNI-CARDOSO, A.; BAPTISTA, M. S.; LABRIOLA, L. Methylene blue photodynamic therapy induces selective and massive cell death in human breast cancer cells. **BMC CANCER**, v. 17, p. 1-15, 2017.

OLIVEIRA, R. T. D.; SILVA, R. M.; TEO, F. H.; MINEIRO, M. F.; FERREIRA, M. C.; ALTEMANI, A.; MAMONI, R. L.; MENEZES, F. H.; BLOTTA, M. H. S. L. Detection of TCD4+ subsets in human carotid atheroma. **Cytokine**, v. 62, p. 131-140, 2013.

THOMÉ, R.; FERNANDES, L. G. R.; MINEIRO, M. F.; SIMIONI, P. U.; JOAZEIRO, P. P.; TAMASHIRO, W. M. S. C. Oral tolerance and OVA-induced tolerogenic dendritic cells reduce the severity of collagen/ovalbumin-induced arthritis in mice. **Cellular Immunology**, v. 280, p. 113-123, 2012.

MONITORIAS

- 1) **Estágio didático pelo Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE)**
 Disciplina QBQ1453 - Bioquímica Experimental
 Instituto de Química - Universidade de São Paulo (USP)
 Supervisão: Profs. Drs. Sandro Marana e Maria Teresa Machini
- 2) **Estágio didático pelo Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE)**
 Disciplina QBQ211 Bioquímica: Estrutura de Biomoléculas e Metabolismo
 Instituto de Química - Universidade de São Paulo (USP)
 Supervisão: Profs. Drs. Alicia J Kowaltowski, Leticia Labriola e Frederico G Filho.
- 3) **Monitoria X Curso de Verão de Bioquímica e Biologia Molecular**
 Instituto de Química – Universidade de São Paulo (USP)
 Supervisão: Profs. Drs. Nadja S Pinto, Leticia Labriola e Guilherme A Menegon

SUPERVISÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

- 1) **Supervisão de trabalho de conclusão de curso (TCC)**
 Alunos Bruno H. F. Delmondes, Geovanna S. Araújo e Lucas Segura
 Curso Técnico em Química, ETEC Getúlio Vargas- Centro Paula Souza.
 Título: Avaliação da capacidade antioxidante do composto Selênio Diacetato de Etila frente aos oxidantes H₂O₂, HOCl e HOOH.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Curso Docência no Ensino Superior: uma primeira aproximação (EAD)

Promovido pela Comissão de Formação Didático Pedagógica da Pró Reitoria de Pós-Graduação da Universidade de São Paulo (PRPG USP) visando auxiliar o Pós-graduando em sua preparação para a docência no Ensino Superior.

Seminário “Avaliação no Ensino Superior”

Promovido pela Comissão de Formação Didático Pedagógica da Pró Reitoria de Pós-Graduação da Universidade de São Paulo (PRPG USP)

Workshops

“Competência Comunicativa na Pós-Graduação: o impacto da comunicação interpessoal consciente no ambiente profissional”

“Construindo E-books com a Saitebooker”

Promovido pela Pró Reitoria de Pós-Graduação da Universidade de São Paulo -PRPG USP