

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**Guilherme Vargas Bochi**

**FORMAÇÃO DE PRODUTOS PROTEICOS DE OXIDAÇÃO  
AVANÇADA A PARTIR DA REAÇÃO DE FENTON E COLÁGENO:  
EFEITOS SOBRE PROCESSOS INFLAMATÓRIOS EM  
NEUTRÓFILOS E CÉLULAS RENAIIS EMBRIONÁRIAS**

Santa Maria, RS  
2016

**Guilherme Vargas Bochi**

**FORMAÇÃO DE PRODUTOS PROTEICOS DE OXIDAÇÃO AVANÇADA A  
PARTIR DA REAÇÃO DE FENTON E COLÁGENO: EFEITOS SOBRE  
PROCESSOS INFLAMATÓRIOS EM NEUTRÓFILOS E CÉLULAS RENAIAS  
EMBRIONÁRIAS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Farmacologia**.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Noal Moresco

Santa Maria, RS  
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bochi, Guilherme Vargas

Formação de produtos proteicos de oxidação avançada a partir da reação de Fenton e colágeno: efeitos sobre processos inflamatórios em neutrófilos e células renais embrionárias / Guilherme Vargas Bochi.- 2016.

140 f.; 30 cm

Orientador: Rafael Noal Moresco

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, RS, 2016

1. Albumina 2. Colágeno 3. Inflamação 4. Oxidação Proteica 5. Reação de Fenton I. Moresco, Rafael Noal II. Título.

---

© 2016

Todos os direitos autorais reservados a Guilherme Vargas Bochi. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: guilherme.bochi@yahoo.com.br

**Guilherme Vargas Bochi**

**FORMAÇÃO DE PRODUTOS PROTEICOS DE OXIDAÇÃO AVANÇADA A  
PARTIR DA REAÇÃO DE FENTON E COLÁGENO: EFEITOS SOBRE  
PROCESSOS INFLAMATÓRIOS EM NEUTRÓFILOS E CÉLULAS RENAI  
EMBRIONÁRIAS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação  
em Farmacologia, da Universidade Federal de  
Santa Maria (UFSM, RS), como requisito  
parcial para obtenção do título de **Doutor em  
Farmacologia**.

**Aprovado em 05 de julho de 2016:**

---

**Rafael Noal Moresco, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

---

**Gabriela Trevisan dos Santos, Dra. (UNESC)**

---

**Rodrigo de Almeida Vaucher, Dr. (UNIFRA)**

---

**Ana Flávia Furian, Dra. (UFSM)**

---

**Sara Marchesan de Oliveira, Dra. (UFSM)**

Santa Maria, RS  
2016

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho a minha família, pelo exemplo e amor incondicional, ao meu orientador, pelo incentivo e orientações que servirão para minha vida toda, aos amigos, colegas e professores, que me acompanham nessa minha caminhada.*

## AGRADECIMENTOS

*Este trabalho é o resultado de uma caminhada muito importante na minha vida, pois acompanhado de maturidade, muitos aprendizados e de pessoas fundamentais para a minha formação e para concretização do meu sonho de fazer doutorado.*

*Agradeço primeiramente a Deus por ter me proporcionado essa vida maravilhosa;*

*Ao meu orientador, Prof. Rafael Noal Moresco, que durante todos esses anos de orientação, com certeza me ajudou a me tornar a pessoa que sou hoje. Sou muito grato por todos ensinamentos transmitidos, pelo voto de confiança na execução deste trabalho e, acima de tudo, pela amizade que espero manter por toda vida. Agradeço muito a oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa. Espero sempre poder retribuir a confiança, o carinho e o empenho no meu desenvolvimento, e estejamos sempre contando com o apoio um do outro. Falando em carinho, quero agradecer a Prof<sup>ª</sup>. Patrícia Gomes, que também me acompanhou nessa trajetória e por quem tenho grande respeito e admiração.*

*À minha primeira orientadora a qual tenho muita consideração, Prof<sup>ª</sup>. Maribel Antonello Rubin, pela acolhida no LabNeuro desde a época da minha iniciação científica e pelos ensinamentos ao longo da minha trajetória acadêmico-científica os quais considero de total importância para que eu chegasse até aqui. No período que fiz parte do LabNeuro, tive a oportunidade de conhecer e conviver com a Ana Flávia, a Gabriela, a Sara e o Mauro, hoje professores que fazem parte da banca examinadora desta Tese. Obrigado por fazerem parte desse momento tão importante para mim;*

*Ao professor Rodrigo Vaucher, pela disposição constante em ajudar, sempre com ótimas ideias, e também por compor a banca examinadora desta Tese;*

*Ao professor Roberto Christ Vianna, por estar acompanhando a minha caminhada ao longo do mestrado e do doutorado, contribuindo de forma exponencial ao meu crescimento;*

*Aos professores queridos Dr<sup>ª</sup>. Ivana, Dr<sup>ª</sup>. Marta, Dr<sup>ª</sup>. Melissa e Dr. Fábio, que de alguma maneira sempre fazem parte da nossa família LaBiClin;*

*Um agradecimento muito especial a todos meus amigos e colegas que fizeram parte do LaBiClin. Considero vocês a minha segunda família e o laboratório a minha segunda casa. Agradeço por toda convivência, cumplicidade e discussões científicas (e não científicas). Agradeço a todos pela amizade verdadeira e por tornarem essa caminhada tão prazerosa. Contem sempre com a minha amizade e com o que precisarem.*

*Em especial, agradeço eternamente aos meus pais, as pessoas mais importantes da minha vida, que me ensinaram, principalmente, a importância da construção e coerência de meus*

*próprios valores. Obrigado pelo amor, pela compreensão e confiança em mim depositada. Vocês são meus exemplos. Sinto-me grato aos meus irmãos, minhas cunhadas e meus sobrinhos, pelo amor, companheirismo, amizade, pelos conselhos e pelo carinho.*

*Agradeço, enfim, à Universidade Federal de Santa Maria, e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, em especial a todos os professores do programa e também aos funcionários, especialmente a Zeli; aos mestres que compartilharam seus conhecimentos e que dedicam suas vidas em prol do nosso desenvolvimento; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos. A todos aqueles que, de uma forma ou outra, compartilham de meus ideais, a minha gratidão e respeito. A todos meu muito obrigado!*

*“Se as coisas são inatingíveis... ora!  
Não é motivo para não querê-las...  
Que tristes os caminhos, se não fora  
A presença distante das estrelas!”*

Mario Quintana



## RESUMO

### FORMAÇÃO DE PRODUTOS PROTEICOS DE OXIDAÇÃO AVANÇADA A PARTIR DA REAÇÃO DE FENTON E COLÁGENO: EFEITOS SOBRE PROCESSOS INFLAMATÓRIOS EM NEUTRÓFILOS E CÉLULAS RENAIAS EMBRIONÁRIAS

AUTOR: Guilherme Vargas Bochi  
ORIENTADOR: Prof. Dr. Rafael Noal Moresco

Os produtos proteicos de oxidação avançada (AOPPs) são uma nova classe de compostos formados em consequência do estresse oxidativo e considerados biomarcadores úteis na detecção de dano oxidativo proteico. No entanto, o papel desses produtos não se limita apenas a refletir o grau oxidativo de proteínas, mas também podem participar de forma ativa no processo inflamatório, promovendo diferentes perturbações celulares, incluindo a indução de apoptose e alterações nos processos de proliferação e diferenciação celular. O principal mecanismo de formação dos AOPPs é através do ácido hipocloroso (HOCl) produzido pela enzima mieloperoxidase (MPO), sendo a albumina, a principal fonte proteica para a formação desses produtos. No entanto, a via MPO/HOCl parece não ser a única responsável pela formação de AOPPs, e uma série de estudos indicam que há vias alternativas que podem contribuir para formação de AOPPs. Outro fator importante, que também não está totalmente esclarecido, é se a albumina é a única proteína suscetível a formação dos AOPPs, uma vez que a composição molecular desses produtos ainda não está totalmente definida. Além dessas questões, é de interesse avaliar se os AOPPs formados por outra via mantêm as características pró-inflamatórias e pró-apoptóticas dos AOPPs originados pela via MPO/HOCl. Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar se a reação de Fenton, importante geradora de radicais hidroxilas ( $\text{OH}^\bullet$ ), é uma potencial via de formação de AOPPs, bem como se o colágeno, principal proteína da matriz extracelular, é uma proteína suscetível a formação desses produtos. Em um primeiro momento, foi demonstrado que a reação de Fenton induziu a formação de AOPPs e esse processo foi inibido por agentes antioxidantes, como N-acetilcisteína (NAC) e frutose-1,6-bisfosfato (FBP). Além disso, os AOPPs gerados através da reação de Fenton induziram um aumento da transcrição gênica de agentes envolvidos no processo inflamatório, incluindo o fator de transcrição  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ), a ciclooxigenase-2 (COX-2) e a interleucina-6 (IL-6), em células renais embrionárias (HEK 293) através de ensaio de transfecção celular e atividade da Luciferase. Outro importante achado deste estudo foi demonstrar que o colágeno exposto ao HOCl também é uma fonte proteica para a formação de AOPPs. Os AOPPs formados a partir do colágeno estimularam a produção de oxidantes, como o HOCl e radical ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), e de agentes inflamatórios, como óxido nítrico (NO) e AOPPs, em neutrófilos humanos isolados. Além disso, os AOPPs derivados do colágeno induziram uma diminuição da viabilidade celular e um aumento do processo apoptótico nessas células. Por fim, o alfa-tocoferol inibiu a liberação de oxidantes, preveniu a diminuição da viabilidade celular e o aumento do processo apoptótico, sugerindo que esse composto pode ser uma potencial ferramenta terapêutica para prevenir os efeitos deletérios promovidos pelos AOPPs. Do mesmo modo, esses achados indicam que os AOPPs podem ser formados por vias alternativas, e esses novos produtos podem contribuir na fisiopatogênese de diversas condições clínicas relacionadas com o acúmulo de AOPPs.

**Palavras-chave:** Albumina. Colágeno. Inflamação. Oxidação Proteica. Reação de Fenton.

## ABSTRACT

### ADVANCED OXIDATION PROTEIN PRODUCTS FORMATION THROUGH THE FENTON REACTION AND COLLAGEN: EFFECTS ON INFLAMMATORY PROCESSES IN NEUTROPHILS AND EMBRYONIC KIDNEY CELLS

AUTHOR: Guilherme Vargas Bochi  
ADVISOR: Prof. Dr. Rafael Noal Moresco

The advanced oxidation protein products (AOPPs) are a new class of compounds identified as markers of oxidative damage to proteins. The physiology role of these products is not limited to assess the oxidative stress, and these products may actively participate in the inflammatory process, promoting different cell disorders, including induction of apoptosis and alterations in the processes of cell proliferation and differentiation. Myeloperoxidase (MPO)-derived hypochlorous acid (HOCl) produced by activated neutrophils contribute significantly to AOPP formation, and human serum albumin (HSA) is considered the main protein responsible for the generation of AOPPs. However, the molecular composition of AOPPs is unclear. Additional pathways and protein targets for AOPP formation are largely unknown. The aim of this study was to induce the formation of AOPPs *in vitro* through Fenton reaction and to investigate whether this generation could be counteracted by N-acetylcysteine (NAC) and fructose-1,6-bisphosphate (FBP). In addition, this study aimed to examine whether AOPPs produced by Fenton reaction may induce the activation of the gene transcription of inflammatory molecules, including the nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), cyclooxygenase-2 (COX-2) and interleukin-6 (IL-6) in human embryonic kidney cells (HEK 293). Additionally, it was investigated the collagen as a potential source of AOPPs via its exposure to HOCl. The HOCl-modified collagen stimulated the production of oxidants, such as HOCl and superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot-}$ ), and pro-inflammatory agents, such as nitric oxide (NO) and AOPPs in human neutrophil. Furthermore, HOCl-modified collagen induced a decrease in cell viability and an increase of apoptosis in these cells. Finally, alpha-tocopherol inhibited the release of oxidants, decreased cell viability and apoptosis, suggesting a therapeutic potential means to prevent deleterious effects caused by AOPPs. Furthermore, these findings indicate that alternative pathways can form AOPPs, and these new products may contribute to the pathogenesis of several clinical conditions related to the accumulation of AOPPs.

**Keywords:** Albumin. Collagen. Inflammation. Protein oxidation. Fenton Reaction.

## **LISTAS DE TABELAS**

### **ARTIGO CIENTÍFICO III**

Table 1 - Effects of unmodified (Col) and modified collagen (Collagen-AOPPs) on LDH release into the cell supernatant.....	106
--	-----

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### INTRODUÇÃO

Figura 1 - Vias envolvidas na geração de espécies reativas em situações fisiológicas e patológicas.....	21
Figura 2 - Ação da NADPH oxidase e da MPO presentes nos neutrófilos durante o burst oxidativo.....	31
Figura 3 - Complexo da NADPH oxidase nos estados inativado e ativado.....	32
Figura 4 - Via de sinalização mediada pelo NF-κB ativada pelos AOPPs em células mesangiais.....	46
Figura 5 - Via de sinalização, dependente da PKC, envolvida na elevação de O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> e de matriz extracelular promovida pelos AOPPs em células mesangiais.....	47
Figura 6 - Papel patogênico dos AOPPs na progressão da DRC.....	50

### ARTIGO CIENTÍFICO I

Figure 1 - Influence of the Fenton system components on HSA-AOPPs formation.....	68
Figure 2 - Spectral changes in HSA treated with Fenton reaction and chlorinated oxidants...	69
Figure 3 - Antioxidative protection of NAC and FBP on the formation of HSA-AOPPs induced by Fenton reaction.....	70
Figure 4 - Influence of the Fenton system components on AOPPs formation.....	71
Figure 5 - Schematic illustration depicting some possible pathways of AOPPs formation linked with the effects promoted by this mediator.....	71

### ARTIGO CIENTÍFICO II

Figure 1 - The effect of unmodified and modified HSA (AOPP-FR and AOPP-HOCl) to induce NF-κB (A), COX-2 (B), IL-6 (C) gene transcription activation in HEK 293 cells by promoter-luciferase transfection assay.....	85
Figure 2 - The effect of unmodified and modified HSA (AOPP-FR and AOPP-HOCl) to induce COX-2 activation in HEK 293 cells by promoter-luciferase transfection assay.....	86
Figure 3 - The effect of unmodified and modified HSA (AOPP-FR and AOPP-HOCl) to induce IL-6 activation in HEK 293 cells by promoter-luciferase transfection assay.....	87

### ARTIGO CIENTÍFICO III

Figure 1 - Collagen-AOPP formation was induced by HOCl and reduced by alpha-tocopherol.....	107
Figure 2 - Neutrophils were activated after exposure to collagen-AOPPs. Neutrophils were treated with different concentrations of collagen-AOPPs (50, 100, and 200 μ/mL) for 1 h at 37 °C.....	108
Figure 3 - Effect of alpha-tocopherol on collagen-AOPP-induced neutrophil activation. Neutrophils (2 × 10 <sup>6</sup> cells/mL) were incubated with in vitro preparations of collagen-AOPPs (200 μg/mL) or unmodified collagen (200 μg/mL) along with PBS or alpha-tocopherol (0.4 mM) for 1 h at 37 °C.....	109

Figure 4 - Cytotoxicity of collagen-AOPPs on neutrophils was assessed by a trypan blue exclusion assay. Neutrophils ( $2 \times 10^6$  cells/mL) were treated with PBS, unmodified collagen (200  $\mu\text{g/mL}$ ), or different concentrations of collagen-AOPPs (50, 100, and 200  $\mu\text{g/mL}$ ) for 1 h at 37  $^\circ\text{C}$ ..... 110

Figure 5 - Effect of collagen-AOPPs on apoptosis in neutrophils was analyzed using the Annexin V assay..... 111

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGEs:	<i>Advanced glycation end products</i> (Produtos finais de glicação avançada)
AOPP-RF:	AOPPs formados via reação de Fenton
AOPPs:	<i>Advanced oxidation protein products</i> (Produtos proteicos de oxidação avançada)
CAT:	Catalase
Cl <sup>-</sup> :	Íons cloreto
COX-2:	Ciclooxigenase-2
DAC:	Doença arterial coronariana
DRC:	Doença renal crônica
eNOS:	Óxido nítrico sintase endotelial
EREs:	Espécies reativas do enxofre
ERK 1/2:	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i> (Quinase regulada por sinal extracelular)
ERNs:	Espécies reativas de nitrogênio
EROs:	Espécies reativas de oxigênio
FBP:	Frutose-1,6-bisfosfato
Fe <sup>2+</sup> :	Ferro II
FPLC:	Cromatografia líquida de desempenho rápido
G-CSF:	Fator estimulador de colônia de granulócitos
GPx:	Glutathione peroxidase
GSH:	Glutathione reduzida
H <sub>2</sub> O:	Água
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Peróxido de hidrogênio
HbA <sub>1c</sub> :	Hemoglobina glicada
HNO <sub>2</sub> :	Ácido nitroso
HO <sub>2</sub> <sup>·</sup> :	Radical hidroperoxila
HOBr:	Ácido hipobromoso
HOCl:	Ácido hipocloroso
IAM:	Infarto agudo do miocárdio
ICAM-1:	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i> (Molécula de Adesão Intercelular-1)
IKK:	<i>IκB kinase</i> (Quinase IκB)
IL-6:	Interleucina-6
iNOS:	Óxido nítrico sintase induzível
IRA:	Insuficiência renal aguda
IκB:	<i>Inhibitory protein of NF-κB</i> (Proteína inibidora do NF-κB)
JNK:	<i>c-Jun N-terminal kinase</i> (Via Quinase c-JUN N-Terminal)
LDL:	Lipoproteína de baixa densidade
MAPK:	<i>Mitogen activated protein kinase</i> (Proteína quinase ativada por mitógeno)
MCP-1:	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i> (Proteína quimiotática de monócitos-1)
MetO:	Metionina sulfóxido
MPO:	Mieloperoxidase
NAC:	N-acetilcisteína
NADPH:	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NETs:	<i>Neutrophils extracellular traps</i>
NF- $\kappa$ B:	<i>Factor nuclear kappa B</i> (Fator nuclear de transcrição $\kappa$ B)
nNOS:	Óxido nítrico sintase neuronal
NO:	Óxido nítrico
NO $\cdot$ :	Radical óxido nítrico
NO $_2\cdot$ :	Dióxido de nitrogênio
NOS:	Óxido nítrico sintase
O $_2^{\cdot-}$ :	Radical ânion superóxido
OH $\cdot$ :	Radical hidroxila
OONO $^-$ :	Peroxinitrito
oxLDL:	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
PARP:	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i> (Poli-(ADP-ribose) Polimerase)
PCR:	Proteína C reativa
PI3K/Akt:	Fosfatidilinositol-3-quinase/serina-teronina Quinase
PKC:	Proteína quinase C
RAGE:	<i>Receptor for AGEs</i> (Receptor para AGEs)
RO $\cdot$ :	Radical alcóxil
RO $^-$ :	Radical alcóxila
ROO $\cdot$ :	Radical peróxil
ROO $^-$ :	Radical peróxila
SH:	Grupo tiol
SO $_3$ H:	Ácido sulfônico
SOD:	Superóxido dismutase
sTNFR:	TNF- $\alpha$ solúvel
TBARS:	Ácido tiobarbitúrico
TNF- $\alpha$ :	Fator de necrose tumoral $\alpha$
VCAM-1:	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i> (Molécula de adesão celular vascular 1)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	16
<b>2</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
2.1	ESTRESSE OXIDATIVO .....	18
2.2	MODIFICAÇÕES OXIDATIVAS EM PROTEÍNAS .....	24
2.3	INFLAMAÇÃO E <i>BURST</i> OXIDATIVO .....	29
2.4	O PAPEL DOS NEUTRÓFILOS NO PROCESSO INFLAMATÓRIO.....	36
2.5	PRODUTOS PROTEICOS DE OXIDAÇÃO AVANÇADA E SUA ASSOCIAÇÃO COM DOENÇAS.....	38
2.6	ALTERAÇÕES CELULARES PROMOVIDAS PELOS PRODUTOS PROTEICOS DE OXIDAÇÃO AVANÇADA .....	43
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	52
3.1	OBJETIVO GERAL .....	52
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	52
<b>4</b>	<b>PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS</b> .....	53
4.1	ARTIGO CIENTÍFICO I.....	53
4.2	ARTIGO CIENTÍFICO II.....	72
4.3	ARTIGO CIENTÍFICO III .....	88
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	112
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	117
<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	118
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	119
	<b>ANEXOS</b> .....	131
	<b>ANEXO A – PARECER DO CEP</b> .....	131
	<b>ANEXO B – PARECER DO CEP</b> .....	135
	<b>ANEXO C – PARECER DO CEP</b> .....	138



## 1 APRESENTAÇÃO

Esta Tese de Doutorado segue as recomendações do Manual de Dissertações e Teses (MDT) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) do ano de 2015. Esta Tese compreende três estudos que investigaram a reação de Fenton e o colágeno como novas vias de formação de produtos proteicos de oxidação avançada (AOPPs). Os dois primeiros estudos avaliaram a hipótese da reação de Fenton como uma nova via de formação de AOPPs e se esses novos produtos mantém a ação pró-inflamatória em um modelo celular renal, sendo que os resultados obtidos geraram dois artigos científicos publicados no periódico *Inflammation* (ARTIGOS CIENTÍFICOS I e II). O terceiro estudo que compõe esta Tese investigou o colágeno como uma nova fonte proteica de AOPPs, bem como seus efeitos sobre ativação de neutrófilos humanos isolados, e os resultados obtidos geraram um artigo científico publicado no periódico *Inflammation* (ARTIGO CIENTÍFICO III). As seções MATERIAIS E MÉTODOS, RESULTADOS e DISCUSSÃO encontram-se nos **ARTIGOS CIENTÍFICOS I, II e III**, os quais representam a íntegra deste estudo. Os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES**, encontrados no final desta tese, apresentam interpretações e comentários gerais sobre os artigos científicos contidos neste trabalho. As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO, DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES** desta tese, uma vez que as referências utilizadas para a elaboração dos artigos e manuscrito estão mencionadas nos mesmos.

## 2 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o papel dos radicais livres em processos fisiopatológicos relacionados ao estresse oxidativo e a inflamação tem sido intensamente investigado (ROBERTS et al., 2010). Os radicais livres podem ser descritos como moléculas altamente reativas que contém um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica (VALKO et al., 2007). Essas moléculas reativas são geralmente instáveis e se originam a partir do oxigênio, nitrogênio ou enxofre (PANASENKO et al., 2013). Quando a geração de radicais livres excede a capacidade antioxidante do organismo, ocorre um desequilíbrio no estado *redox* celular, promovendo o estresse oxidativo e o dano oxidativo posterior (HALLIWELL, 2006).

As proteínas são os principais alvos do dano oxidativo devido sua alta concentração nos tecidos e sua habilidade de neutralizarem algumas espécies reativas (DAVIES, 2005). Reações de oxidação proteica induzem modificações nos resíduos de aminoácidos, alterando a estrutura e função da proteína (BACHI et al., 2013). O acúmulo de produtos de proteínas oxidadas é um fenômeno característico de processos fisiológicos e patológicos, incluindo o envelhecimento e doenças crônicas (BARAIBAR et al., 2012). Himmelfarb e MacMonagle (2001) demonstraram em pacientes urêmicos que a albumina plasmática é o principal alvo proteico de espécies reativas no plasma. Outra importante proteína suscetível à modificação oxidativa é o colágeno, componente majoritário da matriz extracelular (NOWOTNY et al., 2014). As proteínas modificadas por oxidantes não servem apenas como marcadores sensíveis do estresse oxidativo, mas, em algumas situações, também podem participar de forma ativa no processo inflamatório, promovendo diferentes perturbações celulares (GALLI, 2007). Então, a oxidação dessas macromoléculas biológicas está associada à patogênese e progressão de uma série de desordens crônicas, incluindo diabetes *mellitus*, aterosclerose, síndrome metabólica, doença renal crônica (DRC), entre outras (COLOMBO et al., 2012). Associado ao estresse oxidativo, a inflamação também é um fator de fundamental importância na gênese e progressão dessas condições patológicas.

Em 1996 foi descrito um novo marcador do estresse oxidativo proteico em pacientes com DRC, o qual foi denominado produtos proteicos de oxidação avançada (AOPPs). Os AOPPs são considerados uma família heterogênea de compostos modificados estruturalmente, provenientes do estresse oxidativo, principalmente a partir da ação do ácido hipocloroso (HOCl) sintetizado pela mieloperoxidase (MPO) (WITKO-SARSAT et al., 1996). Em algumas situações clínicas nas quais há um quadro inflamatório envolvido, essa enzima pode

estar constantemente ativa, levando a um aumento da produção de HOCl e ao acúmulo de AOPPs. A formação *in vitro* deste biomarcador é possível através da exposição da albumina ao HOCl (WITKO-SARSAT et al., 1996; BOCHI et al., 2012). Uma característica importante dos AOPPs é o fato que além de serem marcadores do processo oxidativo proteico, também atuam como mediadores do processo inflamatório, ativando células inflamatórias, como monócitos e neutrófilos (WITKO-SARSAT et al., 2003). Desse modo, os AOPPs diferenciam-se dos demais marcadores usualmente mensurados com a finalidade de refletir o estresse oxidativo, uma vez que podem desempenhar papéis importantes na fisiopatogênese de diferentes doenças (WITKO-SARSAT et al., 2003).

A compreensão do mecanismo de ação, bem como das vias de formação dos AOPPs, é de suma relevância. Tem sido demonstrado que a via MPO-HOCl não é a única via capaz de formar os AOPPs (CAPEILLÈRE-BLANDIN et al., 2006). Assim, é possível sugerir que os AOPPs podem ser formados por outras vias, envolvendo oxidantes que não apenas o HOCl, que podem contribuir para a manutenção dos altos níveis desse mediador nas diferentes desordens clínicas. Nesse contexto, a reação de Fenton, importante fonte de radical hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ) tanto *in vitro* quanto *in vivo*, parece ser uma potencial via na formação de AOPPs. Outro importante fator que deve ser investigado é se a albumina é a única proteína alvo para formação destes produtos. Estudos recentes indicam que o fibrinogênio também parece ser uma molécula chave na formação de AOPPs (SELMECI et al., 2006; COLOMBO et al., 2015; TORBITZ et al., 2015). Esses achados tornam possível a hipótese que outras proteínas podem estar relacionadas à formação desses mediadores. Considerando a importância tecidual, a susceptibilidade à oxidação, bem como a alta concentração nos tecidos, o colágeno pode ser um possível alvo proteico a servir de fonte para a formação de AOPPs. Além disso, é de grande aplicabilidade clínica a avaliação de possíveis compostos que possam inibir a síntese e, conseqüentemente, os efeitos desencadeados pelos AOPPs.

## 2.1 ESTRESSE OXIDATIVO

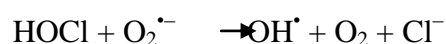
O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a capacidade de defesa do organismo contra essas espécies, levando a um progressivo dano oxidativo (VALKO et al., 2007). Os radicais livres são todas as espécies químicas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica, conferindo um alto poder de reatividade a essas espécies (HALLIWELL, 2006). Os radicais livres são produzidos de forma contínua em concentrações fisiológicas pelo metabolismo celular. Estas

espécies reativas desempenham um importante papel fisiológico quando produzidos em baixas concentrações, participando em diversas respostas celulares, tais como na resposta a agentes infecciosos e na sinalização celular (VALKO et al., 2006). Nesse contexto, tem sido proposto que pequenas concentrações de espécies reativas produzidas no interior da célula, particularmente no espaço intramitocondrial, pode estimular respostas benéficas no cenário de estresse induzido pelo envelhecimento (HEKIMI et al., 2011). Além disso, muitas modificações oxidativas reversíveis induzidas por baixas concentrações de radicais livres desempenham um papel crítico na regulação das funções celulares, incluindo mecanismos subjacentes a proliferação e sobrevivência celular (TRACHOOTHAM et al., 2008). No entanto, sob condições inflamatórias e também em situação de desequilíbrio entre a formação e a remoção de radicais livres, decorrentes da diminuição dos antioxidantes endógenos, ou ainda, do aumento da geração de espécies oxidantes, é gerado um estado pró-oxidante característico do estresse oxidativo (VALKO et al., 2007). Esse estado oxidativo pode resultar em prejuízo dos mecanismos celulares normais, podendo comprometer a viabilidade celular (KOSKENKORVA-FRANK et al., 2013).

Os radicais livres endógenos, produzidos *in vivo*, podem ser categorizados em primários, secundários e terciários (PANASENKO et al., 2013). Os radicais primários, como exemplo o radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), são formados através de reações enzimáticas e são fundamentais no funcionamento normal das células. Entre os radicais secundários, incluem-se o  $OH^{\cdot}$  e radicais lipídicos, e esses tendem a aumentar através de reações não enzimáticas que envolvem precursores moleculares como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e hidroperóxidos lipídicos. De maneira geral, as espécies secundárias estão frequentemente envolvidas com atividades citotóxicas (PANASENKO et al., 2013). Uma reação de grande importância na geração de  $OH^{\cdot}$  que envolve o  $H_2O_2$  como precursor é a reação de Fenton (HALLIWELL et al., 1992). Nessa reação ocorre redução do  $H_2O_2$  na presença de um metal de transição, como o ferro II ( $Fe^{2+}$ ), conforme a equação demonstrada abaixo:



Outra molécula precursora importante na formação de radicais secundários é o HOCl. Devido sua alta reatividade, interage prontamente com outras espécies reativas para formar radicais livres altamente deletérios (NORDBERG e ARNER, 2001). O  $OH^{\cdot}$  também pode ser formado através do HOCl como molécula precursora (CANDEIAS et al., 1994), conforme a reação demonstrada abaixo:



As espécies terciárias resultam da interceptação, principalmente das espécies secundárias, com moléculas antioxidantes (PANASENKO et al., 2013).

Os principais e mais reativos radicais livres são representados pelas espécies reativas de oxigênio (EROs), espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e espécies reativas de enxofre (EREs). Exemplos de EROs e ERNs incluem os  $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$ , peroxil ( $ROO^{\cdot}$ ), alcoxil ( $RO^{\cdot}$ ), hidroperoxil ( $HO_2$ ), radical óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) e dióxido de nitrogênio ( $NOO_2^{\cdot}$ ). As EREs são facilmente originadas através da reação entre EROs e compostos tióis (-SH). Além dessas, existem espécies reativas não radicalares, incluindo o  $H_2O_2$ , HOCl, ácido hipobromoso (HOBr) e peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (PHAM-HUY et al., 2008).

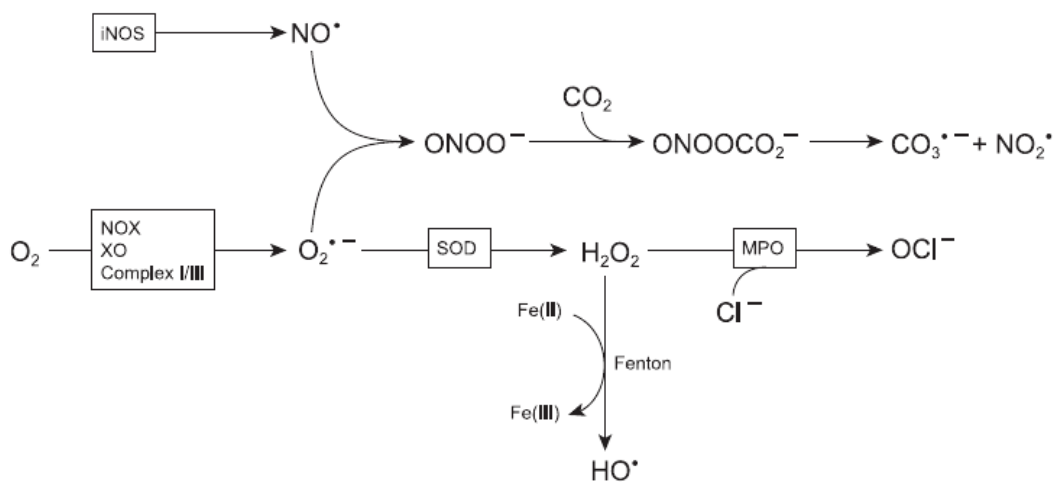
A atividade de algumas enzimas, incluindo a xantina oxido-redutase, ciclooxigenase (COX), lipoxigenase, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, citocromo P450 e peroxidases podem gerar grandes concentrações de  $O_2^{\cdot-}$  (NORDBERG; ARNÉR, 2001). Esse radical é considerado pouco reativo, porém é rapidamente convertido a outras espécies reativas. Em circunstâncias específicas como a inflamação, as células produzem  $O_2^{\cdot-}$  e  $NO^{\cdot}$ , que inicialmente reagem entre si para gerar um potente oxidante, o  $ONOO^-$  (MONCADA; BOLAÑOS, 2006). O  $NO^{\cdot}$  é gerado nos tecidos a partir da L-arginina pela ação de três isoformas descritas da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Sob condições fisiológicas, o  $NO^{\cdot}$  é produzido em concentrações nanomolares, principalmente pelas isoformas endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS), para exercer funções regulatórias. Entretanto, algumas células do sistema imunológico, incluindo macrófagos, monócitos e neutrófilos, produzem e respondem ao  $NO^{\cdot}$  quando estimuladas, uma vez que vias de sinalizações envolvidas no processo inflamatório induzem o aumento da expressão da isoforma induzível da NOS (iNOS) (BOGDAN, 2001). Muitos dos efeitos tóxicos atribuídos ao  $NO^{\cdot}$  são de fato mediados pelo  $ONOO^-$ . Esse importante oxidante e agente nitrificante é muito mais reativo quando comparado ao  $NO^{\cdot}$  e pode causar fragmentação do ácido desoxirribonucleico (DNA), oxidação do colesterol de baixa densidade (LDL-colesterol), bem como hidroxilação e nitração de tirosina para resultar em 3-nitrotirosina (AMIR ASLANI; GHOBADI, 2016).

O  $O_2^{\cdot-}$  também serve de substrato para formação de  $H_2O_2$ . Essa espécie é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, sendo responsável pela síntese de  $OH^{\cdot}$ . O  $H_2O_2$  é relativamente estável e capaz de atravessar membranas lipídicas, sendo altamente tóxico para as células, podendo ser gerado através da atividade da superóxido dismutase (SOD) que reduz o  $O_2^{\cdot-}$ , resultando em  $H_2O_2$  e  $O_2$ . Além da SOD, outras enzimas também são

fontes de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , incluindo a glicolato oxidase, aminoácido oxidase e urato oxidase (BATTIN; BRUMAGHIM, 2009).

Contudo, dentre as EROs, o  $\text{OH}^\bullet$  é a mais reativa em sistemas biológicos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). A principal via de geração do  $\text{OH}^\bullet$  é através da reação de Fenton. Essa reação é uma importante fonte de  $\text{OH}^\bullet$  tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Considerando a curta meia vida do  $\text{OH}^\bullet$  ( $10^{-9}$  segundos) esse radical interage instantaneamente após sua geração (BATTIN; BRUMAGHIM, 2009). O  $\text{H}_2\text{O}_2$  também é importante na geração de HOCl pela enzima MPO (NORDBERG; ARNÉR, 2001). A MPO faz parte de uma família de heme peroxidase, na qual incluem-se ainda mais três principais enzimas: peroxidase de eosinófilos, lactoperoxidase e tireoperoxidase. A MPO é a principal enzima encontrada em grânulos azurófilos de neutrófilos, correspondendo de 2 a 5% do total proteico celular (CHANG et al., 2011). Essa enzima é também encontrada, em menores concentrações, em lisossomos de monócitos, e sua expressão é gradualmente diminuída no decorrer da diferenciação dessas células em macrófagos (PANASENKO et al., 2013). Durante a estimulação de leucócitos, especialmente neutrófilos, aproximadamente 20 a 70% do  $\text{H}_2\text{O}_2$  é utilizado na geração de HOCl (SOKOLOV et al., 2015). Algumas das principais reações envolvidas na geração de oxidantes são ilustradas na Figura 1.

Figura 1 - Vias envolvidas na geração de espécies reativas em situações fisiológicas e patológicas



Fonte: Adaptado de Koskenkorva-Frank et al., 2013. Complexo I, nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) desidrogenase; Complexo III, ubiquinol-citocromo c redutase; iNOS, óxido nítrico sintase induzível; MPO, mieloperoxidase; NOX, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase; SOD, superóxido dismutase; XO, xantina oxidase.

Os antioxidantes são definidos como quaisquer substâncias que retardem ou previnam o dano oxidativo a uma molécula (HALLIWELL, 2006). As defesas antioxidantes inerentes a uma célula para manter a homeostase *redox* incluem defesas enzimáticas e não enzimáticas. As principais defesas enzimáticas de que uma célula dispõe são glutathiona peroxidase (GPx), catalase (CAT) e SOD. Essa última, é considerada um dos mais efetivos antioxidantes enzimáticos intracelulares, pois catalisa a dismutação do  $O_2^{\bullet -}$  em oxigênio molecular e em  $H_2O_2$ . Diferentes isoformas da SOD são encontradas nos compartimentos celulares: SOD1 (CuZnSOD) é encontrada no citoplasma, no interior da mitocôndria, no núcleo e nos lisossomos, enquanto a SOD2 (MnSOD) e SOD3 são encontradas na mitocôndria e na matriz extracelular, respectivamente (FARACI; DIDION, 2004). Contudo, o  $H_2O_2$  deve ser convertido a produtos menos citotóxicos por enzimas como CAT e/ou peroxidases. A CAT presente nos peroxissomos é muito eficiente na conversão do  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e em oxigênio molecular, sendo capaz de capturar aproximadamente 6 milhões de moléculas de  $H_2O_2$  por minuto (VALKO et al., 2006). A GPx também catalisa a redução do  $H_2O_2$  e peróxidos orgânicos para seus correspondentes álcoois à custa da oxidação de uma molécula de glutathiona reduzida (GSH) (BRIGELIUS-FLOHÉ, 2006). Além do sistema de defesa antioxidante enzimático, as defesas antioxidantes não-enzimáticas são de fundamental importância para as células. Algumas defesas não enzimáticas são constituídas pelas vitaminas C e E,  $\beta$ -caroteno e antioxidantes tíolicos como a GSH e o sistema tioredoxina (VALKO et al., 2007). O sistema tioredoxina, aliado a GSH, desempenha um papel importante na redução de proteínas oxidadas contendo grupos SH (BOURDON; BLACHE, 2001).

A vitamina E, desde que foi descoberta como um importante antioxidante lipofílico de ocorrência natural, é reconhecida por possuir muitas funções biológicas o que justifica seu uso na prevenção e no tratamento de uma série de condições envolvidas com o processo inflamatório, incluindo doenças neurodegenerativas, aterosclerose e doenças cardiovasculares (VARGA et al., 2008). A vitamina E representa uma família de compostos classificados em dois grupos: tocoferóis e tocotrienóis. Essa família compreende oito diferentes isoformas, sendo quatro análogos tocoferóis (alfa, beta, gama e delta) e quatro análogos tocotrienóis (alfa, beta, gama e delta). Os tocoferóis são as formas saturadas de vitamina E, enquanto os tocotrienóis correspondem as formas insaturadas. Embora todos os tocoferóis e tocotrienóis sejam potentes antioxidantes, o alfa-tocoferol é a isoforma mais estudada em situações patológicas relacionadas aos processos oxidativo e inflamatório (AHSAN et al., 2014). A respeito de sua atividade antioxidante, alguns estudos demonstraram que o alfa-tocoferol

neutraliza a formação de  $ROO^{\bullet}$  e suas subsequentes reações em cadeia (TRABER e ATKINSON, 2007), bem como inibe a oxidação do LDL-colesterol induzida pelo  $OH^{\bullet}$  (KONTUSH et al., 1996). Além de desempenhar um papel direto na captura de espécies reativas (PACKER et al., 2002), o alfa-tocoferol também pode exercer um papel antioxidante através do controle da geração de oxidantes provenientes da ativação de células inflamatórias, como monócitos e neutrófilos (CHAN et al., 2001). Esse papel regulador desempenhado pelo alfa-tocoferol parece envolver a inibição da proteína quinase C (PKC) e através desse mecanismo esse composto foi capaz de inibir a agregação plaquetária, a produção de  $NO^{\bullet}$  em células endoteliais e, por fim, a geração de  $O_2^{\bullet-}$  em macrófagos e neutrófilos (AZZI et al., 2002).

A GSH é um tripeptídeo, formado por ácido glutâmico, glicina e cisteína, que desempenha um importante papel na manutenção do balanço redox intracelular (HADDAD & HARB et al., 2005). Essa molécula antioxidante está presente na maioria das células, podendo estar livre ou ligada a proteínas, sendo considerado o grupamento -SH mais abundante no meio intracelular (ARTEEL; SIES, 2001). A N-acetilcisteína (NAC) é um composto exógeno que atua como precursor direto da síntese de GSH (SATANGELO, 2003). Na prática clínica, a NAC é amplamente utilizada devido a suas características mucolíticas e detoxificantes na intoxicação por paracetamol (SANTUS et al., 2014). Além disso, esse composto é também reconhecido por ser um potente antioxidante e essa ação pode ser resultado de sua capacidade de captura direta de  $OH^{\bullet}$  e  $O_2^{\bullet-}$  (ATKURI, et al., 2007). Outro exemplo de molécula com propriedades antioxidantes inclui a frutose-1,6-bisfosfato (FBP), um metabólito endógeno da via glicolítica. A atividade antioxidante e citoprotetora da FBP tem sido documentada em várias desordens relacionadas com o estresse oxidativo, incluindo choque séptico (SANTOS et al., 2012), lesão hepática promovida por isquemia (MORESCO et al., 2004), complicações diabéticas (XU et al., 2010) e lesão induzida pela hipotermia (GÁMEZ et al., 2008). A FBP reduz a formação de EROs e a ativação de neutrófilos (SOLA et al., 2003), além de reduzir a proliferação de linfócitos T (NUNES et al., 2003).

Importantes consequências do estresse oxidativo são as alterações oxidativas a todos os tipos de biomoléculas presentes no organismo, incluindo proteínas, carboidratos, lipídios, bem como ácidos nucleicos (HÖHN et al., 2014). Essa oxidação pode resultar em alterações estruturais e perda da função dessas biomoléculas. O dano oxidativo aos carboidratos podem resultar em alteração funcional de qualquer receptor celular, como aqueles envolvidos nas respostas hormonais e na neurotransmissão, na atividade de interleucinas e na formação de prostaglandinas (ASLANI; GHOBADI, 2016). Os ácidos nucleicos, especialmente o DNA,



também são suscetíveis ao dano oxidativo. As modificações oxidativas que afetam a estrutura e a função do DNA incluem alterações de bases nitrogenadas, clivagem simples e duplas, assim como formação de ligações cruzadas (DIZDAROGLU, 2012). Nos lipídios, as ligações insaturadas são também altamente suscetíveis ao dano por espécies reativas. A peroxidação lipídica pode levar ao dano na membrana celular, que inicialmente modifica a fluidez, permeabilidade, as propriedades de transporte e ancoragem de proteínas (VICTOR et al., 2004). No entanto, as proteínas são consideradas o principal alvo para o dano oxidativo, uma vez que essas são componentes preponderantes nos sistemas biológicos e podem neutralizar de 50 a 75% dos radicais livres (DAVIES, 2005). O dano oxidativo proteico pode prejudicar o funcionamento de receptores, transportadores e enzimas, afetando processos celulares essenciais. Além disso, proteínas oxidadas podem ser identificadas como moléculas estranhas, podendo atuar como antígenos e estimular a formação de anticorpos (HÖHN et al., 2014).

## 2.2 MODIFICAÇÕES OXIDATIVAS EM PROTEÍNAS

As modificações oxidativas de proteínas são alterações covalentes que podem ocorrer na cadeia principal e/ou nas cadeias laterais de resíduos de aminoácidos. Essas alterações podem ser induzidas diretamente pelas espécies reativas ou indiretamente através de reações com produtos secundários do estresse oxidativo. Espécies reativas não radicalares reagem lentamente com a cadeia principal da proteína, causando pequenos danos nessa posição (DAVIES, 2005). Em contrapartida, espécies radicalares reagem rapidamente com a cadeia principal da proteína, ocorrendo primariamente abstração de átomo de hidrogênio no carbono alfa da cadeia e reação com oxigênio molecular para dar origem ao ROO<sup>•</sup> (HÖHN et al., 2014).

As EROs são capazes de modificar aminoácidos, peptídeos e proteínas de diferentes maneiras, envolvendo reações que incluem abstração de átomo de hidrogênio, reações de substituição (eliminação ou adição de uma molécula), além de reações de rearranjo, fragmentação e dimerização (HÖHN et al., 2014). Essas modificações oxidativas podem ser reversíveis ou irreversíveis (STADTMAN; LEVINE, 2000). Modificações proteicas reversíveis são processos cruciais a fim de proteger as células contra danos irreversíveis e também podem fazer parte do funcionamento celular normal (COLOMBO et al., 2012). Por outro lado, modificações proteicas irreversíveis são geralmente associadas com a perda permanente de função da proteína (KAWAKAMI et al., 2006). Um exemplo típico de modificação reversível é a oxidação dos grupos -SH, produzindo ácido sulfênico e S-

nitrotois, os quais são processos comuns na regulação de processos celulares (CABALLAL et al., 2003). Uma modificação irreversível, nesse contexto, é a formação de ácido sulfônico ( $\text{SO}_3\text{H}$ ), ocasionando perda de função e subsequente degradação da proteína (HÖHN et al., 2014). Outros intermediários da oxidação proteica incluem modificação do resíduo de metionina a metionina sulfóxido (MetO), a oxidação de tirosina pelo HOCl ou HOBr a derivados halogenados ou pelo ONOO<sup>-</sup> a nitrotirosina (DALLE-DONNE et al., 2005).

Uma vez que existem muitos mecanismos para indução de oxidação proteica e que todos os resíduos de aminoácidos são, teoricamente, suscetíveis a alteração oxidativa, há numerosos tipos diferentes de modificações proteicas. No entanto, para alguns oxidantes, o dano oxidativo é limitado e específico a certos resíduos de aminoácidos, enquanto para outras espécies oxidantes, como o OH<sup>•</sup>, o dano é considerado generalizado e promove modificações não específicas (STADTMAN; LEVINE, 2000). Além disso, muitos outros fatores determinam o grau de oxidação proteica, incluindo a localização da proteína, a estrutura proteica, bem como a concentração de oxidantes e antioxidantes (HÖHN et al., 2014). A susceptibilidade a modificações oxidativas difere entre os aminoácidos, sendo que os resíduos de cisteína, metionina e leucina, bem como, aminoácidos aromáticos como triptofano, tirosina e fenilalanina são os mais vulneráveis (HÖHN et al., 2014). Particularmente, os resíduos de aminoácidos mais propensos à oxidação são os de cisteína e metionina, ambos contendo átomos de enxofre (SHAROV et al., 1999). Todas espécies oxidantes podem induzir alterações nesses resíduos de aminoácidos. Em relação à cisteína, o principal produto derivado da sua oxidação é a formação de pontes dissulfeto, sendo que essas podem ser intra ou intermoleculares (WARDMAN; VON SONNTAG, 1995). Consequências funcionais da perda de -SH incluem o mal dobramento da proteína, inativação catalítica e diminuição da capacidade antioxidante (SOHAL, 2002).

Em questão do aminoácido metionina, o principal produto é a metionina sulfóxido (SHAROV et al., 1999). Outros resíduos de aminoácidos podem requerer condições mais rigorosas de estresse oxidativo. A oxidação da leucina, como exemplo, resulta na formação de hidroxileucina, enquanto a oxidação da histidina leva a formação de 2-oxihistidina, aspartato e asparagina. A oxidação do triptofano forma N-formilquinurenina, quinurenina, hidroxitriptofano, entre outros. A reação entre tirosina e vários oxidantes origina o radical tirosil. Um caminho possível desse radical tirosil é a dimerização e a formação de ditirosina (DEAN et al., 1997), o que pode levar a ligações cruzadas intra e intermoleculares de tirosina. Além disso, a oxidação da tirosina resulta em muitos outros produtos, incluindo 3,4-diidrofenilalanina e 3-clorotirosina através de reações com oxidantes clorados, e

3-nitrotirosina, que é induzido por espécies nitrogenadas (HAWKINS e DAVIES, 2001). A fenilalanina também é suscetível a modificações resultando em orto- ou meta-tirosina e nitrofenilalanina (DEAN et al., 1997).

Outra modificação importante, particularmente nos resíduos de prolina, arginina, treonina e lisina, é a formação de derivados carbonílicos (HAWKINS; DAVIES, 2001). A formação de grupos carbonílicos é uma modificação pouco específica, pois envolve a oxidação de diferentes resíduos de aminoácidos. No entanto, é uma das modificações oxidativas que mais ocorre quando comparada a outros tipos de modificações. Por essa razão, a determinação de proteína carbonilada tornou-se amplamente difundida para estimar o grau oxidativo proteico (DALLE-DONNE et al., 2005). Os grupos carbonil (aldeídos ou cetonas) são produzidos através de diferentes mecanismos. As EROs podem reagir diretamente com as proteínas ou com moléculas de açúcares e lipídios, gerando compostos carbonílicos altamente reativos que, então, interagem com as proteínas (HAWKINS; DAVIES, 2001). A formação de proteína carbonil pode alterar a conformação da proteína, podendo resultar em aumento da hidrofobicidade, aumento de interações não específicas proteína-proteína, e formação de agregados, o que compromete a viabilidade celular e prejudica o *turnover* proteico (SHRINGARPURE; DAVIES, 2002).

Está bem estabelecido que a oxidação de proteínas pode, por fim, resultar em muitas consequências. A oxidação pode resultar em mudanças físicas estruturais na proteína, resultando em fragmentação da sua cadeia principal e oxidação das cadeias laterais. Esse último fator, pode resultar em dimerização ou agregação proteica. Além disso, a oxidação tanto da cadeia principal, quanto das cadeias laterais, podem resultar na formação de mais espécies reativas, incluindo hidroperóxidos, cloraminas e brominas, além de outros intermediários de meias-vidas curtas (DAVIES, 2005). Um ponto importante é o fato que se há um desequilíbrio no balanço entre a geração de proteínas modificadas e sua reparação/remoção pelo sistema de reparo ou de degradação, o resultado final é de acumulação e agregação. Proteínas oxidadas, não dobradas (*unfolded*) ou mal dobradas (*misfolded*), tendem a formar complexos oligoméricos através de ligações covalentes e interações não covalentes reversíveis (hidrofóbicas e eletrostáticas), resultando finalmente em agregados (SHRINGARPURE; DAVIES, 2002).

A agregação proteica é um processo complexo e segue de maneira hierárquica algumas etapas. Primeiro, ocorre a oxidação de cadeias laterais através da exposição de uma proteína nativa a oxidantes. Caso não haja o reparo adequado, ocorrem oxidações posteriores que são acompanhadas pelo aumento de proteínas mal dobradas (BUCHBERGER et al.,

2010), resultando em perda de função e atividade. Além disso, o aumento da hidrofobicidade da superfície da proteína oxidada é um fator chave para o seu reconhecimento para degradação proteolítica pelo proteossoma, principalmente mediado pelo lisossomo. Se essas proteínas modificadas não forem degradadas ou recuperadas, agregados maiores são formados através da interação entre estruturas hidrofóbicas com o objetivo de minimizar a área de contato com o meio hidrofílico. Reações secundárias podem acontecer, como a ubiquitinação, a formação de produtos de glicação avançada (AGEs) e de ligações cruzadas. A ocorrência de agregação proteica ativa múltiplas reações intracelulares, incluindo o processo inflamatório e de morte celular (HÖHN et al., 2014).

Uma importante via de modificações oxidativas proteicas é através da interação com o HOCl. As proteínas são os principais alvos para as modificações oxidativas do HOCl devido à elevada reatividade dessas biomoléculas com esse oxidante (PANASENKO et al., 2013). Foi demonstrado que o tratamento de proteínas isoladas com o HOCl resultou principalmente em alterações nas cadeias laterais de aminoácidos, podendo promover tanto a fragmentação quanto o aparecimento de ligações cruzadas e agregação (HAWKINS et al., 2003). O HOCl reage com aminas para formar N-cloraminas (HAWKINS et al., 2003). De maneira geral, N-cloraminas são formadas *in vivo* através da reação entre o HOCl e o grupo amino ( $\text{NH}_3^+$ ) de aminoácidos (PANASENKO et al., 2013), sendo que N-cloraminas mantêm o potencial oxidante do HOCl, porém, apresentam maior seletividade em suas reações quando comparadas ao HOCl (PESKIN e WINTERBOURN, 2006). A exposição de diferentes tipos celulares a concentrações fisiológicas e patológicas de HOCl pode resultar em lise celular e depleção dos níveis de GSH e  $-\text{SH}$ , uma vez que esse oxidante penetra facilmente nas membranas celulares (PULLAR et al., 1999). Estima-se que aproximadamente 25 a 50 mM de HOCl é produzido *in vivo* nos sítios onde há um processo inflamatório instalado (WEISS, 1989). Acredita-se que concentrações elevadas desse oxidante são responsáveis pela iniciação do dano tecidual, desempenhando um importante papel na progressão de uma série de doenças, incluindo aterosclerose (HEINECKE, 1999), fibrose cística (VAN DER VLIET et al., 2000), sepse (GAUT et al., 2001) e doença renal (MALLE et al., 2003).

A albumina apresenta muitos sítios suscetíveis a oxidação pelo HOCl e os principais resíduos de aminoácidos afetados por essa oxidação incluem-se, um resíduo de cisteína, quatro resíduos de metionina, dois resíduos triptofano, cinquenta e nove resíduos de lisina, totalizando um total de sessenta e seis sítios de ataque do HOCl (COLOMBO et al., 2012). A albumina sérica humana é a proteína preponderante no plasma, sendo responsável pela regulação da pressão osmótica e também pelo transporte de compostos endógenos e exógenos.

A albumina é uma proteína de cadeia simples, com um peso molecular de aproximadamente 67 kDa, e contém 585 aminoácidos, dentre os quais, 35 são resíduos de cisteína que formam 17 ligações de pontes-dissulfetos intramoleculares (ANRAKU et al., 2013). A estrutura secundária da albumina é dominada por alfa hélices (68%), sem a presença de folhas beta, e assume uma conformação globular organizada em três domínios homólogos (I, II e III), sendo que cada um desses domínios consiste de dois subdomínios, A e B (FANALI et al., 2012). A atividade antioxidante tem sido reconhecida como uma importante função da albumina. Essa propriedade resulta das propriedades *redox* do resíduo de cisteína na posição 34 da cadeia peptídica (Cis-34) e também da sua capacidade de ligar-se com metais. Aproximadamente 80% de grupos -SH do sangue são derivados do Cis-34, sendo esse o único no estado livre na molécula de albumina (ANRAKU et al., 2013). Em condições fisiológicas, Cis-34 se encontra sob a forma reduzida ou livre (70% a 80% do total de albumina), sendo denominada de mercapto-albumina, e também sob a forma oxidada (20% a 30%), sendo essa última denominada de não mercapto-albumina. As principais modificações da mercapto-albumina referem-se a alterações oxidativas reversíveis. Uma pequena fração do Cis-34 (2% a 5%) sofre alteração oxidativa irreversível, sendo o ácido sulfônico o principal produto (FANALI et al., 2012), e durante algumas condições patológicas essa fração pode aumentar (TURELL et al., 2009). Assim, o estado redox da albumina tem sido utilizado como um marcador para investigar o estado de estresse oxidativo em algumas condições clínicas, como na DRC e doenças cardiovasculares (TERAWAKI et al., 2010). O Cis-34 também pode sofrer nitrosilação (TSIKAS et al., 2002).

Outras modificações oxidativas importantes que acometem a albumina incluem a glicação, nitração, oxidação catalisada por metais e carbonilação (ROCHE et al., 2008). A glicação é uma modificação estrutural induzida por açúcares redutores, podendo resultar na formação irreversível de AGEs (HÖHN et al., 2014). A nitração acomete principalmente resíduos de tirosina, sendo que os resíduos de tirosina nas posições 138 e 411, dos 18 resíduos de tirosina contidos na albumina, os mais suscetíveis a sofrerem nitração (JIAO et al., 2001). O sistema de oxidação catalisado por metais, que emprega pequenas concentrações de íons metálicos, é capaz de modificar uma série de aminoácidos da albumina, como cisteína, arginina e triptofano (ANRAKU et al., 2013). Em relação a carbonilação, muitos estudos têm demonstrado a presença de níveis elevados de albumina carbonilada em algumas condições patológicas, incluindo DRC (MERA et al., 2005) e doença renal do diabetes (AGARWAL et al., 2006). Um fato importante é que a carbonilação da albumina está associada tanto com o

aumento da oxidação do Cis-34 (OETTL et al., 2008) e com a formação de ditirosina (LIM et al., 2007), sendo que ambas as modificações alteram a estrutura e a função da albumina.

Além da albumina, também há outras proteínas que são suscetíveis à oxidação induzida pelo HOCl, incluindo o colágeno (OLSZOWSKI et al., 2003). Se for comparado com o que ocorre com a estrutura da albumina quando exposta ao HOCl, observa-se que ocorre processos distintos. A albumina exposta ao HOCl, ocorre a prevalência de agregação proteica (SUMMERS et al., 2008), enquanto no colágeno é verificado a fragmentação (OLSZOWSKI et al., 2003). O colágeno compreende uma ampla família de proteínas tripla hélice e são as proteínas mais abundantes nos vertebrados, representando aproximadamente 30% do total de proteínas. Até o momento, há descrição de 29 tipos distintos geneticamente de colágeno, os quais são codificados a partir de pelo menos 44 genes (CARTER et al., 2009). Dependendo da estrutura molecular, o colágeno pode ser dividido em muitos subgrupos. Colágenos formadores de fibras compreendem o maior subgrupo e incluem os colágenos tipo I, II, III, V, XI, XXIV e XXVII. Dentre esses, o colágeno fibrilar do tipo I é o mais abundante, sendo responsável pela forma, estabilidade e conectividade nos órgão e tecidos no qual ele esta presente. Além da função estrutural, o colágeno também serve como ligante de receptores específicos, incluindo integrinas, receptores com domínio discoidina, glicoproteína do tipo VI e família de receptores de manose, para controlar a atividade celular e remodelamento da matriz extracelular (LEITINGER, 2011). O colágeno tipo II é o principal componente da cartilagem articular e o auto-antígeno melhor caracterizado na artrite reumatóide. Nesse contexto, foi demonstrado que a formação de  $\text{OH}^\bullet$  no sítio inflamatório resulta em modificações oxidativas no colágeno tipo II, levando a geração de novos epítomos antigênicos que dão início a uma resposta autoimune. Nesse sentido, Shahab et al. (2012) observaram que a exposição do colágeno tipo II ao  $\text{OH}^\bullet$ , formado através da reação de Fenton, resultou na formação de antígenos e também em um extensivo dano a proteína, incluindo a fragmentação proteica.

### 2.3 INFLAMAÇÃO E BURST OXIDATIVO

A inflamação é uma resposta do organismo a diversos agentes lesivos, incluindo microrganismos, trauma físico ou células neoplásicas (DEJANA et al., 1995). Uma definição clássica para inflamação a descreve como um processo patológico caracterizado por lesão ou destruição de tecidos, causada por uma variedade de reações químicas e citológicas, além de reações sistêmicas. A resposta inflamatória consiste basicamente de dois componentes

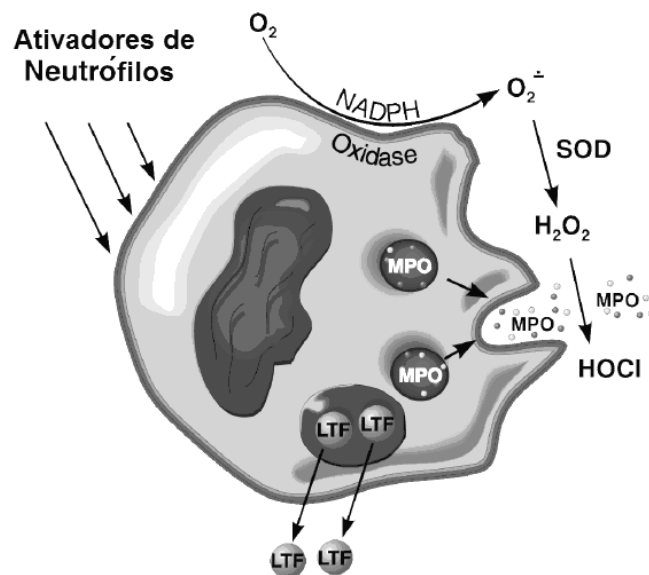
principais: uma reação vascular e uma reação celular/tecidual (LAWRENCE; GILROY, 2007). O evento celular caracteriza-se pela migração de diferentes tipos celulares. As células circulantes incluem os neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos, basófilos e plaquetas, além das células do tecido conjuntivo, incluindo mastócitos, fibroblastos e macrófagos locais. A matriz extracelular consiste de proteínas fibrosas estruturais (colágeno, elastina), glicoproteínas de adesão (fibronectina, laminina, colágeno não fibrilar, tenascina e outras) e proteoglicanos (GRUYS et al., 2005). Os leucócitos polimorfonucleares, principalmente os neutrófilos, são as células fagocíticas mais abundantes na circulação e também as primeiras a serem ativadas na defesa pelo sistema imunológico inato contra infecções. Essas células migram por quimiotaxia até o local da infecção, onde realizam o reconhecimento, fagocitam e destroem microrganismos invasores através da liberação de enzimas hidrolíticas, proteolíticas e de EROs (LIBBY, 2002). Durante a ativação do sistema imune inato, defesas antioxidantes, enzimáticas e não enzimáticas, devem atuar com o propósito de proteger o organismo contra a toxicidade dessas espécies pró-oxidantes que são geradas neste processo (HÖHN et al., 2014).

As características fisiológicas do processo inflamatório são iniciadas e reguladas por substâncias denominadas mediadores inflamatórios. Na maioria das vezes, os mediadores inflamatórios agem localmente no sentido de restringir a extensão do dano tecidual. Neste caso, o processo inflamatório tem apenas repercussões locais. No entanto, quando esta capacidade homeostática local é superada, seja pela magnitude do estímulo agressor ou pela insuficiência dos mecanismos reguladores, a resposta inflamatória pode se manifestar de modo sistêmico em todo o organismo, gerando graves consequências (KARIN, 2006). Os mediadores inflamatórios incluem proteases, constituintes do sistema complemento, sistema de cininas, sistema fibrinolítico e sistema de coagulação; mediadores liberados por fosfolípídios (prostaglandinas, leucotrienos e fator ativador de plaqueta); e outros mediadores como histamina, serotonina, substância P, neurocinina, fatores de transcrição, NO, proteína C reativa (PCR) e MPO, além das citocinas (LAWRENCE; GILROY, 2007).

A geração de oxidantes pelos leucócitos está baseada na produção de EROs via redução da molécula de oxigênio molecular. Durante a exposição dessas células a um estímulo apropriado, ambos macrófagos e neutrófilos ativados aumentam o consumo de oxigênio. O sistema enzimático NADPH oxidase, que está ligado às membranas celulares, reduz o oxigênio molecular a  $O_2^{\bullet -}$ , o qual é altamente instável, e logo que é formado, é convertido a  $H_2O_2$  por ação catalítica da SOD, sendo ambos os radicais precursores para a produção de mais oxidantes (LOCATELLI et al., 2003). Assim, quando essas células inflamatórias são ativadas, ocorre uma série de eventos metabólicos, iniciando-se um processo

de respiração não mitocondrial que resulta, inicialmente, na produção de  $O_2^{\cdot-}$  e também na síntese de outras EROs. Esta produção excessiva de EROs é suficiente para depletar a capacidade antioxidante local, favorecendo o processo conhecido como *burst* oxidativo ou *burst* respiratório (CADENAS; DAVIES, 2000). A ativação de células fagocíticas tanto *in vivo* como *in vitro* resulta na geração de grandes concentrações de  $H_2O_2$  e  $O_2^{\cdot-}$  através do *burst* respiratório e também na liberação da enzima MPO (NUSSBAUM et al., 2012). Portanto, a produção de espécies reativas por fagócitos faz parte da defesa imunológica do hospedeiro contra organismos invasores e, durante este processo, ocorre a ativação do complexo enzimático da NADPH oxidase e da MPO (Figura 2).

Figura 2 - Ação da NADPH oxidase e da MPO presentes nos neutrófilos durante o *burst* oxidativo

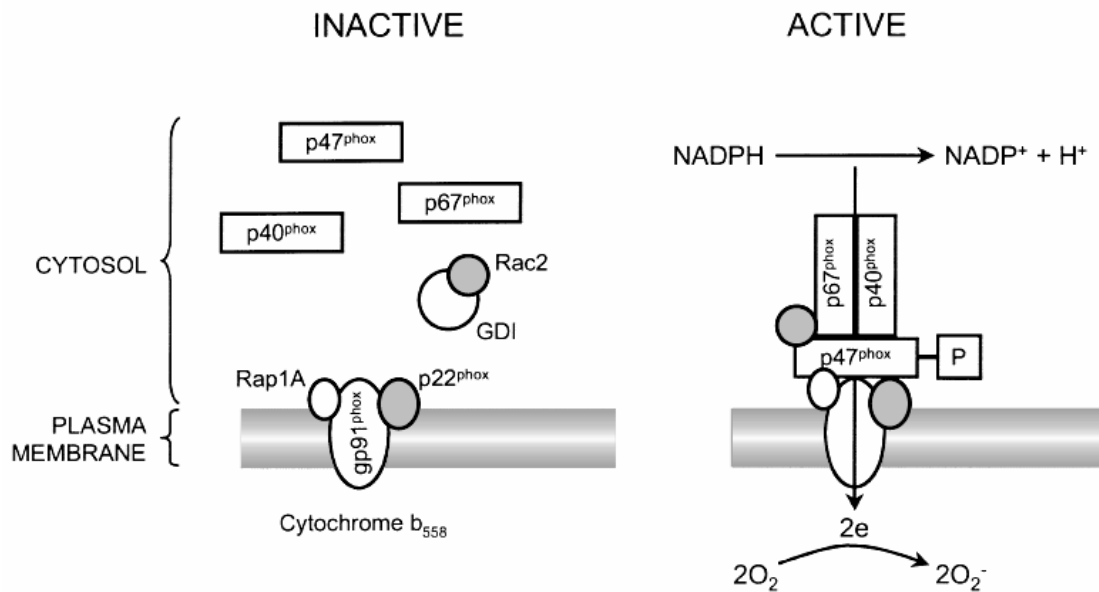


Fonte: Adaptado de BRENNAN et al., 2003.  $O_2$ , oxigênio molecular; NADPH oxidase, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase;  $O_2^{\cdot-}$ , radical ânion superóxido; SOD, superóxido dismutase;  $H_2O_2$ , peróxido de hidrogênio; MPO, mieloperoxidase; HOCl, ácido hipocloroso; LTF, lactoferrina.

Sob condições normais, o complexo da NADPH oxidase encontra-se inativado e as subunidades que compõem esse complexo estão sob a forma desacoplada distribuídas no citosol ( $p40^{phox}$ ,  $p47^{phox}$ ,  $p67^{phox}$ , Rac-2) e na membrana plasmática (citocromo b558,  $gp91^{phox}$ ,  $p22^{phox}$  e Rap1A) (BABIOR, 1999). Após ativação por algum estímulo, a subunidade regulatória  $p47^{phox}$  sofre fosforilação, com subsequente translocação das subunidades citosólicas para a membrana plasmática, onde se associam com o citocromo b558 para formar a oxidase ativa (BABIOR, 1999), conforme a Figura 3.



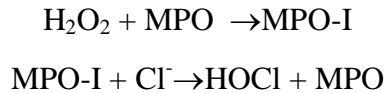
Figura 3 - Complexo da NADPH oxidase nos estados inativado e ativado



Fonte: Adaptado de WARD et al., 2003.  $O_2$ , oxigênio molecular;  $O_2^-$ , radical ânion superóxido; NADPH, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato.

A ativação do complexo também requer duas proteínas de ligação de guanina de baixo peso molecular, Rac-2 e Rap1A. Rac-2 está localizada no citosol na forma de dímero com Rho-inibidor da dissociação do nucleotídeo guanina (Rho-GDI), enquanto Rap1A é uma proteína associada a membrana (TESHIMA et al., 2014). A NADPH oxidase pode estar ancorada na membrana em diferentes compartimentos no interior da célula, incluindo núcleo, retículo endoplasmático, endossomo e fagossomo, mitocôndria, bem como no espaço extracelular (LASSÈGUE; GRIENGLING, 2010).

Outra enzima envolvida no processo de defesa imunológica e no *burst* respiratório é a MPO, que é uma heme enzima com peso molecular de 144 kD encontrada predominantemente no interior de grânulos azurófilos em neutrófilos, monócitos e alguns subtipos de macrófagos teciduais. Embora ocorra uma perda da expressão desta enzima durante a diferenciação de monócitos a macrófagos no meio tecidual, esta enzima pode persistir e ser reativada em algumas situações, incluindo aterosclerose e doenças neurodegenerativas (CHANG et al., 2011). Contudo, os monócitos contêm somente um terço da concentração presente nos neutrófilos polimorfonucleares. A MPO é prontamente liberada para o meio extracelular por estas células inflamatórias ativadas e catalisa a produção de moléculas oxidantes, sendo o HOCl a principal delas. A síntese do HOCl ocorre através da reação entre o  $H_2O_2$  e íons cloreto ( $Cl^-$ ), conforme as reações demonstradas abaixo:



Essas reações envolvem a interação entre MPO na forma férrica com  $\text{H}_2\text{O}_2$ , levando a formação da MPO-I através da transferência de dois elétrons (ABU-SOUD e HAZEN, 2000). A MPO-I pode oxidar íons  $\text{Cl}^-$ , formando o HOCl. Além disso, a MPO também pode utilizar íons brometo e tiocianeto como substrato para converter o  $\text{H}_2\text{O}_2$  a ácido hipobromoso e ácido hipotiocianoso, respectivamente (SUMMERS et al., 2012).

O HOCl é um potente agente bactericida e exerce um importante papel no sistema imunológico. No entanto, sob condições inflamatórias, os níveis elevados de HOCl resultam em dano tecidual, o que contribui para o desenvolvimento de inúmeras condições patológicas, incluindo aterosclerose, artrite reumatóide e alguns tipos de câncer (MALLE et al., 2003). Recentemente, foi verificado que a MPO mostrou ser um importante preditor de acidentes cardiovasculares, inclusive quando a concentração sérica de troponina cardíaca está dentro do valor normal (PEACOCK et al., 2011), reforçando a importância desta enzima na fisiopatogênese de processos inflamatórios crônicos. Neste sentido, a MPO também pode oxidar a lipoproteína de baixa densidade (LDL) em lipoproteína de baixa densidade oxidada (oxLDL), propagando a recaptação de oxLDL pelos macrófagos, perpetuando assim a formação de células espumosas (PODREZ, 2010). Além disso, a MPO mostrou-se capaz de ativar metaloproteinases e promover a desestabilização e ruptura da superfície da placa aterosclerótica (FU et al., 2001). A MPO também catalisa o consumo de NO derivado do endotélio, reduzindo a sua biodisponibilidade e prejudicando suas funções vasodilatadoras e anti-inflamatórias (ABU-SOUD; HAZEN, 2000). Quanto à atividade sérica desta enzima, foi demonstrado um aumento significativo em pacientes com angina instável e infarto agudo do miocárdio (IAM) (BALDUS et al., 2003).

Diferentes vias de sinalização estão envolvidas no processo inflamatório, incluindo a via mediada pelo fator de transcrição c-jun N-terminal quinase (JNK) e, principalmente, pelo fator de transcrição nuclear  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ). A ativação destes fatores medeia a transcrição de importantes agentes do processo inflamatório, incluindo as citocinas pró-inflamatórias (ODEGAARD; CHAWLA, 2013). Em particular, a interleucina-1 (IL-1), o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), a interleucina-6 (IL-6) e a interleucina-8 (IL-8) são alguns dos mediadores responsáveis por gerar um estado pró-inflamatório. O NF- $\kappa\text{B}$  é um regulador central de respostas celulares, tanto no contexto fisiológico quanto no patológico. O NF- $\kappa\text{B}$  desempenha um papel crucial no controle de muitos processos celulares, incluindo a resposta

imune e inflamatória, bem como a sobrevivência e a proliferação celular (HAYDEN; GHOSH, 2004). Este fator de transcrição é rapidamente ativado em resposta a uma ampla gama de estímulos relacionados ao estresse oxidativo e ao processo inflamatório. O NF- $\kappa$ B promove o aumento da expressão de genes pró-inflamatórios, que são importantes na ativação da resposta inflamatória, incluindo genes de citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, assim como genes de enzimas envolvidas na atividade microbicida. Mais de cem genes, pró-inflamatórios na sua maioria, são ativados por este fator de transcrição (LI; VERMA, 2002). Além disso, o NF- $\kappa$ B também está relacionado ao aumento de expressão de moléculas envolvidas no processo apoptótico (KARIN; LIN, 2002).

O NF- $\kappa$ B está implicado na patogênese de muitas doenças relacionadas a inflamação. Como esperado, manipulações genéticas que induzem um aumento da atividade de NF- $\kappa$ B resultam em patologias relacionadas com um aumento do processo inflamatório, confirmando o papel pró-inflamatório desse fator de transcrição. O NF- $\kappa$ B consiste de cinco membros: RelA (ou p65), Rel (ou c-Rel), RelB, p50 e p52, as quais podem estar na forma de homodímeros ou heterodímeros. Em uma célula em repouso, os dímeros de NF- $\kappa$ B são normalmente mantidos em um estado inativo através da associação com a proteína inibidora do NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B). A ativação NF- $\kappa$ B é controlada por um complexo enzimático, a quinase I $\kappa$ B (IKK). Após a estimulação celular, a IKK fosforila a proteína I $\kappa$ B, permitindo a translocação de dímeros NF- $\kappa$ B para núcleo e ativação da transcrição gênica.

Duas vias distintas de ativação do NF- $\kappa$ B podem ser descritas. A primeira é conhecida como clássica e é ativada por uma série de estímulos, incluindo citocinas inflamatórias, produtos de agentes invasores (vírus e bactérias) e também intermediários do estresse oxidativo (PANTANO et al., 2006). Esses estímulos induzem a inativação IKK e o acúmulo de NF- $\kappa$ B no núcleo, regulando a expressão de genes imunorregulatórios e envolvidos com apoptose. Assim, citocinas inflamatórias e EROs são importantes ativadores do NF- $\kappa$ B (MORGAN; LIU, 2011). Uma segunda via, dita alternativa, o NF- $\kappa$ B é ativado por receptores envolvidos na organogênese do tecido linfóide e desenvolvimento de linfócitos. Há estudos que descrevem uma terceira via de ativação do NF- $\kappa$ B, referindo-se a fatores que não se incluem na via clássica e via alternativa. Entre os fatores que ativam essa terceira via incluem agentes estressores genotóxicos (luz UV, irradiação gama, entre outros).

A ativação do NF- $\kappa$ B também é responsável pela transcrição gênica de outros mediadores inflamatórios, as prostaglandinas (PGs) derivadas do ácido araquidônico (LAVETI et al., 2013). O ácido araquidônico é um ácido graxo poliinsaturado de vinte carbonos amplamente distribuído na face intracelular da membrana plasmática,

correspondendo por mais de 85% do conteúdo de ácidos graxos das células (NAKAMURA; MURAYAMA, 2014). O ácido araquidônico é uma molécula chave no desenvolvimento do processo inflamatório, uma vez que sua ativação também propicia a formação de mediadores químicos envolvidos nas respostas inflamatórias. O ácido araquidônico é liberado de fosfolípidios derivados da membrana plasmática pela ação da fosfolipase A2 (NAKAMURA; MURAYAMA, 2014). Uma vez na forma livre no interior das células, o ácido araquidônico pode seguir diferentes vias metabólicas. Uma importante via é a conversão desse em PGs pela ação da enzima prostaglandina endoperóxido sintase (PTGS), também conhecida como ciclooxigenase (COX). Existem duas principais isoformas de PTGS, a constitutiva PTGS1 (COX-1) e a induzível PTGS2 (COX-2). Estruturalmente, COX-1 e COX-2 compartilham aproximadamente 60% de similaridade no padrão de aminoácidos e estão localizadas no espaço intracelular, especialmente no interior de compartimentos como o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi (SIMMONS et al., 2004).

Quanto a distribuição nos tecidos, as duas isoformas apresentam diferentes padrões de expressão. A COX-1 é expressa constitutivamente na maioria das células do organismo e desempenha um papel na homeostase tecidual. Diferentemente, a COX-2 apresenta uma expressão restrita à alguns tecidos, podendo estar constitutivamente expressa apenas nos rins e no pâncreas (QUILLEY et al. 2011), bem como no tecido cerebral (JI et al., 2013). No entanto, muitas condições patológicas estão relacionadas com o aumento da expressão da COX-2 e esse aumento é mantido quando a estimulação é persistente, como ocorre na inflamação crônica (ABRAHAO et al., 2014). De maneira geral, o aumento da expressão gênica da COX-2 e os níveis de PGS produzidas através da sua ação têm sido considerados fatores desencadeantes de uma série de alterações teciduais deletérias. Mais especificamente, as PGs têm papel fundamental na promoção do processo inflamatório e atuam de maneira conjunta com citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ , a IL-6, a IL-1 e a IL-8, para manter um estado pró-inflamatório sustentado (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011). A transcrição gênica da COX-2 é estimulada principalmente pelo NF- $\kappa$ B, que também regula a expressão de uma ampla variedade de genes, incluindo os envolvidos na codificação de moléculas de adesão, quimiocinas, citocinas inflamatórias, NOS e outras moléculas relacionadas à inflamação e proliferação celular (GUIJARRO e EGIDO, 2001).

## 2.4 O PAPEL DOS NEUTRÓFILOS NO PROCESSO INFLAMATÓRIO

Os neutrófilos são células leucocitárias pertencentes ao sistema imune inato, essenciais na resposta inflamatória e na defesa do hospedeiro frente à patógenos (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). Em humanos, representam a maioria dos leucócitos circulantes, correspondendo a aproximadamente 50 a 70% dessas células, enquanto que em ratos correspondem a apenas 10 a 25% (MESTAS; HUGHES, 2004). São gerados continuamente na medula óssea através de precursores mielóides, atingindo uma produção diária de até  $2.10^{11}$  células (BORREGAARD, 2010). Esse processo é regulado pelo fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF), o qual é produzido em resposta a interleucina-17 (IL-17) sintetizada por linfócitos T (BORREGAARD, 2010). Na corrente sanguínea, os neutrófilos maduros apresentam um diâmetro médio de 7 a 10  $\mu\text{m}$ , núcleo segmentado (polimorfonucleares) e citoplasma enriquecido com grânulos, repletos de proteínas pró-inflamatórias (MPO, catepsinas, defensinas, lactoferrina, lizosima, metaloproteinase de matriz tipo 9) e vesículas secretórias (BORREGAARD, 2010). O tempo de meia-vida na circulação é de aproximadamente 8 horas (PILLAY et al., 2010). No entanto, durante a inflamação, os neutrófilos se tornam ativados e sua meia-vida pode ser prolongada (SUMMERS, 2012). Esse fato é resultante da ativação por diferentes estímulos, como citocinas e fatores de crescimento, bem como substâncias estranhas. Esse aumento da longevidade dessas células permite que os neutrófilos assumam outras atividades complexas no tecido, como contribuir para a resolução da inflamação ou para moldar a resposta imune adaptativa, bem como permanecer no sítio inflamatório perpetuando o processo de lesão tecidual (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013).

Durante a inflamação, ocorre um aumento significativo no número de neutrófilos no tecido e, com o tempo, essas células morrem através de mecanismos pró-apoptóticos para serem removidas por macrófagos e células dendríticas (STARK et al., 2005). Alguns agentes que estimulam esse processo apoptótico no contexto inflamatório incluem o TNF- $\alpha$  liberado pelo macrófago e altas concentrações de EROs geradas pela NADPH oxidase do próprio neutrófilo (GEERING; SIMON, 2011). Assim, compostos antioxidantes podem inibir o processo apoptótico nessas células, como já foi demonstrado para o NAC (KASAHARA et al., 1997). Além disso, a GSH pode inibir diretamente a atividade da caspase-8 e da caspase-3, resultando em uma diminuição do processo apoptótico (WATSON et al., 1999).

Uma importante função desempenhada pelos neutrófilos é a eliminação de patógenos, tanto a nível intracelular quanto extracelular. Esta pode ocorrer por três mecanismos

principais: fagocitose, degranulação e liberação de redes extracelulares conhecidas como *neutrophils extracellular traps* (NETs).

A fagocitose de microrganismos é seguida pelo encapsulamento desses nos fagossomos. A morte do patógeno é então promovida pela célula utilizando mecanismos NADPH oxidase dependentes (produção de EROS) ou proteínas antibacterianas (catepsinas, defensinas, lactoferrina e lizosima) (BORREGARD, 2010). Nesse contexto, a geração de  $O_2^{\bullet -}$  a partir da ativação da NADPH oxidase é um fator importante para a produção de uma variedade de oxidantes reativos, incluindo oxidantes halogenados gerados através da MPO (WITKO-SARSAT et al., 2000). Outra importante enzima atuante no neutrófilo é a NOS, a qual produz  $NO^{\bullet}$ , que pode reagir  $O_2^{\bullet -}$  para formar  $ONOO^-$  (WHEELER et al., 1997). A degranulação, por sua vez, envolve a liberação de proteínas antibacterianas dos grânulos neutrófilos dentro dos fagossomos ou mesmo fora da célula, desta forma agindo contra microrganismos intra ou extracelulares, respectivamente. Finalmente, outro mecanismo envolve a liberação das NETs de neutrófilos altamente ativados, principalmente sob condições inflamatórias. A composição das NETs é de uma cromatina de DNA, histonas e proteínas granulares (por exemplo, lactoferrina, catepsinas e MPO). Estas estruturas imobilizam patógenos extracelulares, prevenindo sua propagação e facilitando a fagocitose dos microrganismos retidos. Além disso, as NETs podem matar diretamente os patógenos por meio de histonas e proteases antimicrobianas (PHILLIPSON; KUBES, 2011).

Além de seu papel na defesa contra patógenos, os neutrófilos estão integrados na ativação, regulação e em mecanismos efetores do sistema imune inato e adaptativo. São responsáveis pela expressão e/ou produção de numerosas citocinas, quimiocinas e fatores angiogênicos, espontaneamente ou sob estímulo. Através desses produtos, os neutrófilos agem sobre diversas outras células do sistema imune, regulando sua ativação, proliferação, maturação e produção de mediadores que, por sua vez, também irão promover a ativação dos neutrófilos e seu recrutamento para os tecidos (MANTOVANI et al., 2011). Os neutrófilos são tanto alvos quanto fontes produtoras de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e fatores de crescimento (FUTOSI et al., 2013). Citocinas como a IL-1 e TNF- $\alpha$ , quimiocinas como a IL-8 e fatores de crescimento como o fator estimulador de colônia de granulócitos, amplificam muitas das funções do neutrófilos, incluindo sua capacidade de aderência a células endoteliais e a produção de EROs. Os neutrófilos possuem muitos tipos de receptores expressos na membrana, incluindo receptores de reconhecimento a agentes patogênicos e receptores envolvidos no processo inflamatório. Dentre os receptores, são de importância os acoplados a proteína G, receptores Fc de imunoglobulinas, moléculas de adesão como selectinas e

integrinas, receptores para citocinas, bem como receptores da resposta imune inata, incluindo membros de receptores do tipo *Toll-like* (FUTOSI et al., 2013). A ativação desses receptores resulta em processos complexos como a fagocitose, exocitose de grânulos intracelulares, produção de EROs, liberação de NETs e, por fim, estimulação quimiotática e liberação de citocinas (GALLI et al., 2011).

Os neutrófilos são importantes na patogênese de um amplo espectro de doenças, incluindo infecções causadas por patógenos intracelulares, doenças autoimunes, doenças inflamatórias crônicas e neoplasias (MANTOVANI et al., 2011). Nesse sentido, cabe salientar a importância da modulação da resposta dessas células uma vez que a ausência de neutrófilos, decréscimo no seu número ou alguma disfunção em suas atividades pode resultar em distúrbios patológicos. Entretanto sua ativação excessiva ou inadequada pode acarretar em dano celular e tecidual ao hospedeiro (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013).

## 2.5 PRODUTOS PROTEICOS DE OXIDAÇÃO AVANÇADA E SUA ASSOCIAÇÃO COM DOENÇAS

A identificação e a caracterização de agentes oxidantes específicos responsáveis pelas modificações das biomoléculas em processos patológicos tem sido um desafio. Recentemente, foi descrita e caracterizada uma nova classe de compostos formados em consequência do estresse oxidativo, a qual foi designada como AOPPs (WITKO-SARSAT et al., 1996). Esses compostos são considerados uma família heterogênea de proteínas modificadas principalmente pela ação de oxidantes clorados, especialmente o HOCl (WITKO-SARSAT et al., 1996). Os níveis aumentados de AOPPs já foram relatados em muitas condições clínicas importantes, incluindo DRC (WITKO-SARSAT et al., 1996), diabetes *mellitus* (SEBEKOVÁ et al., 2012), obesidade (ATABEK et al., 2005), síndrome metabólica (ATABEK et al., 2006), doença arterial coronariana (SKVARILOVA et al., 2005), câncer (CHANG et al., 2008), cirrose hepática (ZUWALA-JAGIELLO et al., 2011), hepatite C crônica (OZENIRLER et al., 2011), doença inflamatória crônica do osso (BASKO et al., 2008), artrite reumatóide (BASKOL et al., 2006), entre outras. *In vivo*, a produção de oxidantes clorados é uma característica de células fagocíticas que contêm a enzima MPO, que catalisa a reação entre o Cl<sup>-</sup> e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para gerar grandes quantidades de HOCl, um potente agente oxidante e microbicida (CAO et al., 2014). *In vitro*, Witko-Sarsat et al. (1996) demonstraram que AOPPs podem ser formados através da exposição da albumina a uma solução de HOCl. De fato, existem evidências que tanto os AOPPs plasmáticos gerados *in*

*vivo*, quanto os produzidos *in vitro*, resultam principalmente do aumento da atividade da MPO e da ação do HOCl (CAPEILLÈRE-BLANDIN et al., 2004). No entanto, as vias de formação desses produtos não estão completamente elucidadas. Nesse contexto, existem estudos que sugerem que o HOCl não é o único oxidante capaz de formar os AOPPs (GORUDKO et al., 2014), e questionam se a via MPO/HOCl é a única responsável pela formação desses produtos (CAPEILLÈRE-BLANDIN et al., 2006; GORUDKO et al., 2014). Capeillère-blandin et al. (2006) demonstraram, pela primeira vez, que o mecanismo responsável pela formação de AOPPs em pacientes com DRC não submetidos à diálise era diferente do mecanismo em pacientes com DRC submetidos a diálise. No primeiro grupo de pacientes, não foi observada uma relação direta entre a atividade da MPO e os níveis aumentados de AOPPs, diferentemente do segundo grupo de pacientes, indicando que outros oxidantes poderiam estar envolvidos na formação desses produtos. Aliado a isso, alguns estudos observaram uma relação direta entre a administração intravenosa de ferro, como uma estratégia para corrigir anemia, e o aumento dos níveis de AOPPs (DRÜEKE et al., 2002; TOVBIN et al., 2002; ANRAKU et al., 2008). Considerando esses achados clínicos e o papel do ferro na reação de Fenton, é oportuna a hipótese que esse metal de transição pode promover o aumento da geração de  $OH^{\bullet}$ , podendo esse oxidante contribuir como uma via alternativa para a formação de AOPPs.

Outro ponto importante é que a composição molecular dos AOPPs também não está completamente elucidada (COLOMBO et al., 2015). A fim de investigar as propriedades moleculares dos AOPPs, foram realizadas análises moleculares e espectrais dos AOPPs gerados *in vivo* e *in vitro*, e essas análises indicaram que os AOPPs compreendem diferentes modificações estruturais na molécula proteica, incluindo a formação de grupamentos carbonílicos e de ditirosina (CAPEILLÈRE-BLANDIN et al., 2004). De fato, Capeillère-Blandin et al. (2004) identificaram, através de técnicas de fracionamento de proteínas presentes no plasma de pacientes hemodialisados e também de técnicas de cromatografia por exclusão de tamanho, que AOPPs são compostos de proteínas oxidadas de baixo peso molecular (80 kDa), representado principalmente pela albumina oxidada na forma monomérica, e alto peso molecular (600 kDa), representado por agregados de albumina através de ligações dissulfeto e/ou ligações cruzadas contendo ditirosina. Além disso, através de análise do sequenciamento de aminoácidos da albumina exposta ao HOCl, verificou-se que houve uma alteração no conteúdo de alguns resíduos de aminoácidos específicos quando comparado à albumina nativa, incluindo os resíduos de lisina, metionina e tirosina, sendo que a redução deste último ocorreu devido à formação de 3-clorotirosina, 3,5-diclorotirosina, bem



como de compostos ditirosina (CAPEILLÈRE-BLANDIN et al., 2004). Embora a maioria dos estudos apontem a albumina como única fonte de geração de AOPPs, já existem estudos sugerindo que outras proteínas também podem desempenhar esse papel. Esse questionamento surgiu a partir dos achados dos estudos de Selmeçci et al. (2006), que demonstraram que os níveis de AOPPs em amostra de plasma, tanto colhidas em tudo contendo anticoagulante EDTA e citrato, foram superiores aos níveis de AOPPs em amostras de soro, sem anticoagulante. Uma explicação para esse fato foi que na amostra de soro há o consumo de proteínas envolvidas na cascata de coagulação, indicando que o fibrinogênio também pode ser uma fonte na formação de AOPPs. Recentemente, foi demonstrado que o fibrinogênio exposto a uma alta concentração de HOCl também formou agregados de alto peso molecular (maiores que 200 kDa) mantidos através de ligações cruzadas de ditirosina, evidenciando que a oxidação desta molécula pode desempenhar um papel semelhante ao da albumina na formação de AOPPs (COLOMBO et al., 2015; TORBITZ et al., 2015).

A primeira descrição dos AOPPs foi em pacientes com DRC submetidos a hemodiálise (WITKO-SARSAT et al., 1996). A DRC consiste em uma lesão renal com perda progressiva e irreversível da função dos rins (glomerular, tubular e endócrina). Em sua fase mais avançada, chamada de fase terminal da DRC, os rins não conseguem mais manter a homeostase do meio interno do paciente, necessitando assim de uma terapia de substituição renal, sendo a hemodiálise a principal forma de terapia (JUNIOR, 2004). O estresse oxidativo é um fator importante e prevalente nesses pacientes, contribuindo na progressão da doença e de suas complicações (TUCKER et al., 2013). Os principais fatores responsáveis pelo aumento da geração das EROs em pacientes com DRC são o aumento da expressão e da atividade da NADPH oxidase, disfunção mitocondrial, estresse do retículo endoplasmático, além da diminuição de componentes antioxidantes intracelulares e circulatórios (GRANATA et al., 2009; TUCKER et al., 2013). Além disso, em pacientes com DRC submetidos a hemodiálise, a interação entre o sangue e a membrana de diálise promove a ativação de células do sistema imunológico (*burst* oxidativo), como os neutrófilos e os monócitos, bem como a geração subsequente de EROs, incluindo o  $O_2^{\bullet-}$ , bem como seus derivados  $H_2O_2$  e  $OH^{\bullet}$ , e o HOCl, via os complexos enzimáticos presentes nessas células, a NADPH oxidase e a MPO. De maneira geral, os fluídos contêm pequenas concentrações de enzimas antioxidantes e, por essa razão, as proteínas plasmáticas são suscetíveis a sofrerem oxidação pelas EROs. Assim, elevados níveis de AOPPs foram detectados no plasma de pacientes hemodialisados (WITKO-SARSAT et al., 1996; WITKO-SARSAT et al., 2003) e a albumina, principal proteína circulante, foi identificada como a principal fonte de AOPPs no plasma

(CAPEILLÈRE-BLANDIN et al., 2004). A fim de estabelecer uma relação entre a atividade de células fagocíticas e a geração de AOPPs, foi demonstrado, em pacientes com DRC, que a atividade oxidativa de neutrófilos circulantes foi relacionada com o aumento da produção de AOPPs, sugerindo que essas células desempenham um importante papel na geração de AOPPs (WITKO-SARSAT et al., 1996). Pacientes com DRC não submetidos a hemodiálise também apresentam níveis de AOPPs elevados, aproximadamente três vezes maiores quando comparados a indivíduos saudáveis (CAO et al., 2014). Alguns estudos têm sugerido que o acúmulo crônico de AOPPs desempenha um importante papel na patogênese, bem como na progressão, desta patologia, visto que há uma correlação inversa entre os níveis de AOPPs e a taxa de filtração glomerular (WITKO-SARSAT et al., 1998; WEI et al., 2008; ZHOU et al., 2009). Além disso, uma alta prevalência de lesões ateroscleróticas tem sido evidenciada em pacientes com DRC (SHLIPAK et al., 2003). No entanto, os fatores que promovem aterosclerose nesses pacientes não estão esclarecidos. Os AOPPs podem estar envolvidos nesses eventos cardiovasculares ateroscleróticos, uma vez que os níveis de AOPPs correlacionaram-se com a espessura da camada íntima da carótida (DRÜEKE et al., 2002; LIU et al., 2006).

Os níveis de AOPPs também se encontram aumentados em pacientes com insuficiência renal aguda (IRA), sendo que seus níveis estão associados com a gravidade desta patologia (LENTINI et al., 2010). Evidências epidemiológicas têm sugerido que não apenas o desenvolvimento de IRA após cirurgia cardíaca de revascularização, mas também a falta de recuperação de IRA após este processo cirúrgico são considerados desfechos adversos (SRISAWAT et al., 2010). Recentemente, com o propósito de avaliar o papel prognóstico dos níveis de AOPP para IRA associada a cirurgias cardíacas após processo de revascularização, Liang et al. (2012) observaram que o aumento dos níveis de AOPPs é um potencial preditor de efeitos adversos, incluindo a não recuperação de IRA nos pacientes deste estudo. A nefropatia mediada por IgA é outra enfermidade renal e é a principal causa de glomerulonefrite. Um estudo prospectivo demonstrou que níveis elevados de AOPPs no estágio precoce da doença foram importantes fatores de risco para desfecho renal adverso (início de diálise) (DESCAMPS-LATSCHA et al., 2004). Além disso, foi observado que os AOPPs estão fortemente associados com o aumento de proteinúria e um declínio da taxa de filtração glomerular em pacientes com nefropatia IgA (CAMILLA et al., 2011).

Estudos têm apontado o envolvimento do estresse oxidativo em pacientes com síndrome coronariana aguda (SCA). O termo SCA refere-se a um conjunto de sintomas clínicos que são compatíveis com isquemia aguda do miocárdio, englobando a angina instável

e o infarto agudo do miocárdio (IAM). Skvarilová et al. (2005) observaram que os pacientes com SCA têm níveis aumentados de AOPPs e que a concentração plasmática desses produtos difere significativamente de voluntários saudáveis. Neste contexto, Kaneda et al. (2002) demonstraram que os níveis de AOPPs também se apresentaram elevados em pacientes submetidos à angiografia coronária devido a suspeita de doença arterial coronariana (DAC) e observaram, através de modelos de análise multivariada, que a concentração plasmática de AOPPs constitui um fator de risco independente para DAC (KANEDA et al., 2002). Corroborando com estes achados, Barsotti et al. (2011) encontraram um aumento dos níveis plasmáticos de AOPPs tanto em pacientes com angina instável quanto em pacientes com IAM. Também foi demonstrado que o aumento dos níveis dos AOPPs, independentemente de fibrinogênio e de PCR, foi um preditor de eventos ateroscleróticos cardiovasculares em pacientes com elevado risco de aterotrombose (DESCAMPS-LATSCHA et al., 2005).

Os níveis de AOPPs também foram estudados em pacientes diabéticos. Diabetes *mellitus* é um grupo de distúrbios metabólicos associados ao metabolismo dos carboidratos no qual a glicose é subutilizada, produzindo hiperglicemia, sendo esta condição hiperglicêmica a principal responsável pelo estresse oxidativo e geração de EROs no diabetes (PANDEY et al., 2010). Piwowar et al. (2007) reportaram que os níveis plasmáticos de AOPPs apresentaram-se elevados em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2 quando comparados com indivíduos saudáveis. Além disso, também verificaram que os pacientes diabéticos com macroangiopatias e os pacientes diabéticos obesos (com o índice de massa corpórea maior que 30) eram os que apresentaram os maiores níveis de AOPPs (PIWOWAR et al., 2007). Pandey et al. (2010) também investigaram os níveis de AOPPs em pacientes com DM tipo 2 e demonstraram que, além destes pacientes apresentarem níveis elevados deste marcador de oxidação proteica, também obtiveram níveis plasmáticos reduzidos de -SH. Além disso, foi observada uma forte correlação negativa entre os níveis séricos de albumina e de hemoglobina glicada (HbA<sub>1c</sub>) e uma correlação positiva entre os níveis séricos de AOPPs e a concentração de HbA<sub>1c</sub> em pacientes diabéticos tipo 2. Estes achados demonstram que há uma íntima relação entre a oxidação proteica e a glicação nestes pacientes diabéticos (CAKATAY, 2005). Estes resultados confirmam a ideia de que o diabetes *mellitus* é uma desordem metabólica complexa com distúrbios entre a formação de EROs e as defesas antioxidantes, e que a obesidade também é uma condição que está relacionada com o estresse oxidativo, bem como com a oxidação de proteínas (CAKATAY et al., 2005; PIWOWAR et al., 2007; PANDEY et al., 2010). Outro estudo demonstrou em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2 uma correlação significativa entre os níveis de AOPPs e o índice de resistência insulínica

(HOMA-IR), LDL oxidado e os níveis de óxido nítrico, sugerindo que os AOPPs em combinação com o níveis de oxLDL e NO poderiam ser biomarcadores importantes para avaliar a associação entre o DM e distúrbios ateroscleróticos (GRADINARU et al., 2013).

## 2.6 ALTERAÇÕES CELULARES PROMOVIDAS PELOS PRODUTOS PROTEICOS DE OXIDAÇÃO AVANÇADA

Níveis sanguíneos elevados dos AOPPs foram descritos em muitas condições clínicas relacionadas com o processo inflamatório, indicando que esses produtos podem agir como preditores nessas doenças. Com o objetivo de avaliar o real papel dos AOPPs sobre o desenvolvimento dessas condições clínicas, uma série de estudos experimentais, utilizando modelos animais e/ou cultura de células, foram realizados para investigar os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na ação dos AOPPs. Um fator chave que deve ser evidenciado é que os AOPPs atuam de forma ativa como um mediador de muitos processos, incluindo o oxidativo e o inflamatório, bem como através de outras vias que podem resultar em diferentes desfechos, como uma exacerbação da resposta inflamatória ou até mesmo a indução de apoptose (WITKO-SARSAT et al., 2003; MARSCHE et al., 2007; ZHOU et al., 2009; CAO et al., 2013). Um fator importante é que as vias de sinalizações intracelulares ativadas pelos AOPPs, de maneira geral, são mediadas pela geração de EROs produzidos pela NADPH oxidase (WEI et al., 2009; ZHOU et al., 2009; XIE et al., 2014) e parecem envolver a ativação de mecanismos dependentes do NF- $\kappa$ B (ZHONG et al., 2009; ZHENG et al., 2013).

As células fagocíticas, além de desempenharem um papel fundamental no processo inflamatório, são uma importante fonte de oxidantes (ODAJIMA et al., 1998). Entre as enzimas que contribuem na geração de oxidantes, a MPO ocupa uma posição de destaque, uma vez que é amplamente expressa nessas células e é a principal geradora de oxidantes clorados *in vivo* (KETTLE et al., 1997). Nesse contexto, Witko-Sarsat et al. (1998) demonstraram que há uma forte correlação entre os níveis plasmáticos de neopterina, marcador de ativação de monócitos, e os níveis plasmáticos de AOPPs em pacientes com DRC. Nesse mesmo estudo, com a finalidade de determinar o papel dos AOPPs no desequilíbrio do sistema imunológico associado à DRC, foi verificado que tanto os níveis de TNF- $\alpha$ , quanto os níveis de receptores solúveis de TNF- $\alpha$  (TNF-Sr75), correlacionaram-se positivamente com as concentrações de AOPPs. Essa relação dos AOPPs com marcadores inflamatórios foi corroborada por experimentos *in vitro*, os quais demonstraram que os

AOPPs produzidos *in vitro* mantiveram a capacidade de ativar o *burst* oxidativo em monócitos humanos isolados (WITKO-SARSAT et al., 1998).

Posteriormente, foi observado que os AOPPs também são capazes de ativar neutrófilos através do aumento da geração de EROs dependentes das enzimas NADPH oxidase e MPO (WITKO-SARSAT et al., 2003). Para confirmar esses achados, frações plasmáticas enriquecidas de AOPPs (AOPPs derivados do plasma) extraídas de pacientes hemodialisados através de cromatografia líquida de desempenho rápido (FPLC) mantiveram a capacidade de ativar monócitos e os neutrófilos, e essa ativação foi semelhante à promovida por frações plasmáticas de indivíduos saudáveis tratadas com HOCl (WITKO-SARSAT et al., 1998; WITKO-SARSAT et al., 2003). Assim, os AOPPs gerados tanto *in vivo* quanto *in vitro* são potentes indutores do *burst* oxidativo *in vivo* (LIU et al., 2006) e *in vitro* (WITKO-SARSAT et al., 2003). Recentemente, foi demonstrado que a albumina humana exposta tanto ao HOCl, como ao HOBr, outro produto da MPO, são capazes de formar AOPPs, e ambos AOPPs induzem ativação da NADPH oxidase, a degranulação e mudança da forma estrutural de neutrófilos (GORUDKO et al., 2014). Esses achados indicam que os AOPPs são potenciais indutores do processo inflamatório e que AOPPs provenientes de outras vias, além da via clássica MPO/HOCl, também podem exercer ações sobre as células.

Sobre o papel pró-inflamatório dos AOPPs, foi demonstrado que a administração intravenosa de AOPPs, produzidos *in vitro*, promoveu um aumento significativo da infiltração de macrófagos no tecido renal de ratos nefrectomizados (LI et al., 2007). O recrutamento de macrófagos é considerado um evento precoce do processo inflamatório e, no tecido renal, está associado com dano glomerular e renal, bem como com fibrose renal (CHOW et al., 2004). O aumento da infiltração de macrófagos para o meio tecidual também foi observado em aorta de coelhos hipercolesterolêmicos tratados com AOPPs. Nesse estudo, observou-se um aumento dos níveis de AOPPs em homogeneizado de aorta dos animais tratados com AOPPs e também um aumento na deposição de oxLDL nesse tecido. Além disso, os animais controles (não-hipercolesterolêmicos) e que receberam administrações de AOPPs apresentaram um aumento dos níveis plasmáticos de AOPPs, uma redução na atividade da enzima GPx e um aumento dos níveis de oxLDL, bem como nos níveis de TNF- $\alpha$ , demonstrando o potencial oxidante, pró-inflamatório e pró-aterogênico desses produtos oxidados (LIU et al., 2006). A administração intravenosa de AOPPs também induziu um processo inflamatório nos rins em ratos diabéticos. Esse efeito resultou do aumento da infiltração tecidual de macrófagos, do aumento da expressão (a nível de RNA mensageiro e proteína) de citocinas inflamatórias, como MCP-1 e fator de crescimento transformador  $\beta$  (TFG- $\beta$ ), induzidos pelos AOPPs. Além

disso, através de análise imunohistoquímica do tecido renal, foi observado que os AOPPs promoveram alterações estruturais, incluindo hipertrofia glomerular e acúmulo de matriz extracelular, resultando em aumento de albuminúria (SHI et al., 2008). Todos esses efeitos induzidos pelos AOPPs derivam do aumento da produção de  $O_2^{\bullet-}$  dependentes da ativação da NADPH oxidase.

O complexo enzimático da NADPH oxidase, além de estar amplamente expresso em leucócitos, é considerado a principal fonte de EROs em células renais, incluindo células epiteliais tubulares e células mesangiais (GEISZT et al., 2004). Nesse contexto, foi demonstrado que os AOPPs induziram um aumento da geração de  $O_2^{\bullet-}$  produzido pela NADPH oxidase em homogeneizado renal de ratos diabéticos, além de promoverem um aumento da expressão de subunidades fundamentais para ativação desse complexo enzimático, como a  $p47^{phox}$  e a  $gp91^{phox}$ . Esses efeitos promovidos pela administração de AOPPs foram revertidos pela administração oral de apocinina, um inibidor da NADPH oxidase (SHI et al., 2008). Esses achados sugerem que os AOPPs são indutores do estresse oxidativo e da inflamação *in vivo*, via estimulação do complexo enzimático NADPH oxidase. Sugere-se ainda que as EROs geradas durante esse processo podem desempenhar um importante papel na sinalização celular, uma vez que promovem a ativação do NF- $\kappa$ B.

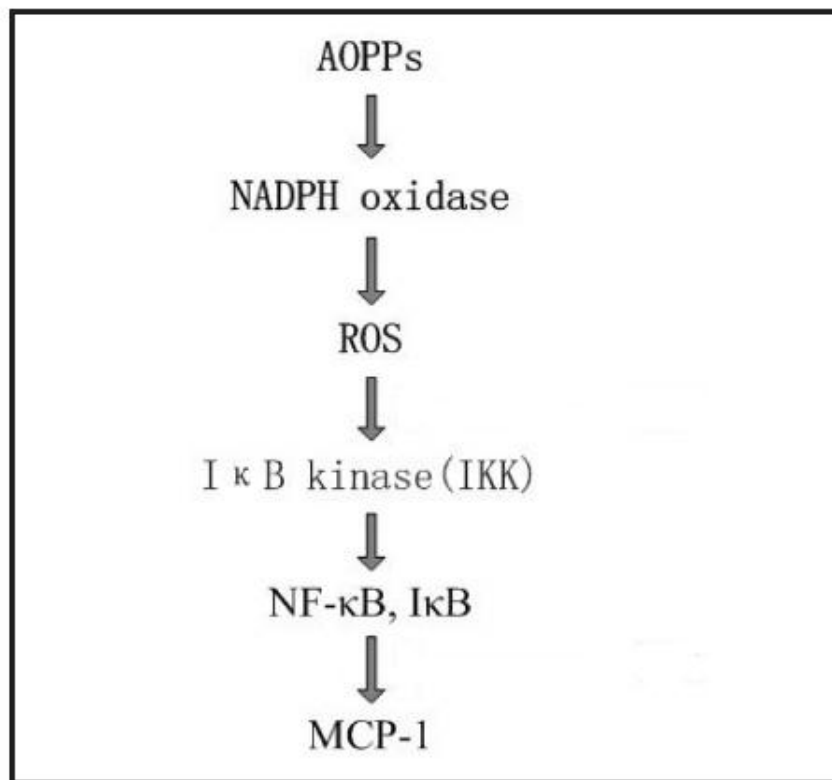
Considerando o papel de grande importância do NF- $\kappa$ B na regulação do processo inflamatório, foi demonstrado que os AOPPs inibiram significativamente a proliferação e diferenciação celular através da ativação de uma via de sinalização mediada por NF- $\kappa$ B em cultura de células ósseas (*cultured rat calvarial osteoblast-like*). Nesse estudo, o tratamento das células ósseas com AOPPs resultou na diminuição de marcadores indicativos de proliferação óssea, incluindo a atividade da fosfatase alcalina e a expressão de osteocalcina (tanto à nível de expressão proteica quanto de RNA mensageiro), no aumento da produção de EROs e também na ativação do NF- $\kappa$ B, verificado através da fosforilação da subunidade p65 (ZHONG et al., 2009). AOPPs também induziram inflamação em células mesangiais renais, promovendo um aumento da expressão de MCP-1 e da ativação do NF- $\kappa$ B, sendo esse último achado verificado através da fosforilação da quinase I $\kappa$ B o que resulta em degradação da proteína inibidora do NF- $\kappa$ B, a I $\kappa$ B, permitindo a translocação desse fator de transcrição até o núcleo. A ativação do NF- $\kappa$ B foi dependente da geração de EROs via NADPH oxidase (Figura 4) (WANG et al., 2013).

Resultados parecidos foram observados em podócitos renais. Os podócitos, ou células epiteliais glomerulares, são as principais células encontradas no glomérulo renal e são as responsáveis pela homeostase da permeabilidade glomerular, atuando como uma barreira a fim de impedir que concentrações excessivas de proteínas alcancem o lúmen tubular e

apareçam na urina. Zhao et al. (2015) demonstraram que AOPPs induziram um aumento da expressão de MCP-1 através da ativação da via mediada por NF- $\kappa$ B nessas células. Além disso, os AOPPs induziram ativação do sistema renina-angiotensina em células epiteliais tubulares renais e essa ação também foi mediada pela ativação do NF- $\kappa$ B (CAO et al., 2013).

Além de promover um estado pró-inflamatório sistêmico, os AOPPs também geram outras alterações celulares. Wei et al. (2009) investigaram os mecanismos pelos quais esses produtos podem causar alterações celulares e demonstraram que os AOPPs, quando incubados com células mesangiais renais, promoveram uma série de efeitos deletérios.

Figura 4 - Via de sinalização mediada pelo NF- $\kappa$ B ativada pelos AOPPs em células mesangiais

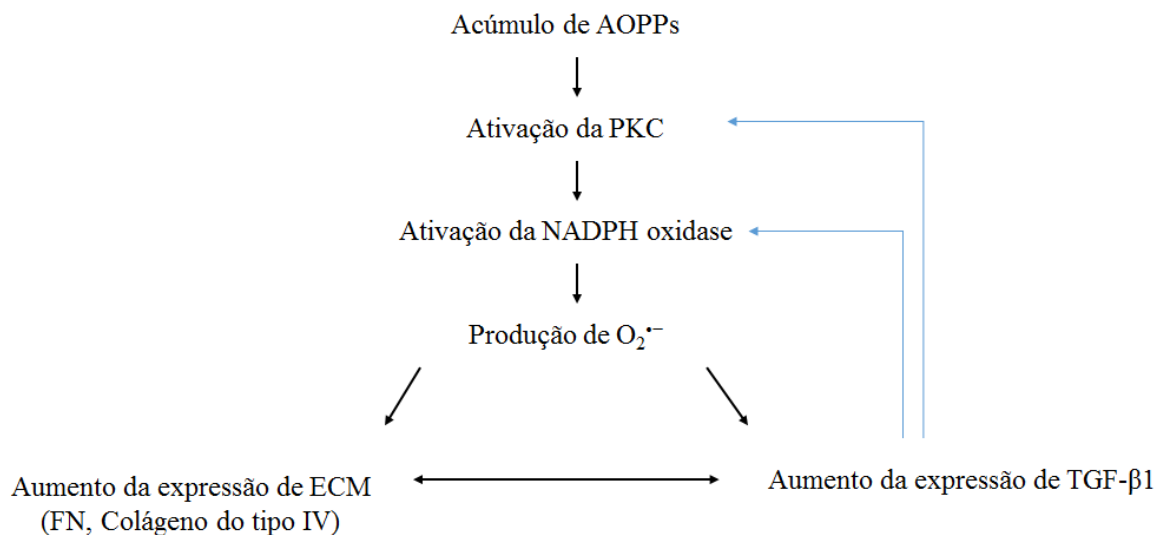


Fonte: Adaptado de Wang et al., 2013. AOPPs, produtos proteicos de oxidação avançada; nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase; EROs, espécies reativas de oxigênio; IKK, quinase I $\kappa$ B; I $\kappa$ B, proteína inibidora do NF- $\kappa$ B; MCP-1, molécula quimiotática de monócitos.

Primeiramente, os AOPPs induziram um aumento da geração de  $O_2^{\bullet-}$  citosólico através da ativação da NADPH oxidase das células mesangiais via fosforilação da subunidade  $p47^{\text{phox}}$  e, subsequentemente, translocação dessa subunidade para membrana plasmática. Também foi possível observar que os AOPPs promoveram a ligação entre as subunidades  $p47^{\text{phox}}$  e  $p22^{\text{phox}}$ , sendo esse processo imprescindível para ativação do complexo enzimático.

Além disso, o aumento da geração de  $O_2^{\bullet-}$  via NADPH oxidase é dependente da ativação da proteína quinase C (PKC), visto que os AOPPs estimularam a fosforilação dessa quinase e um inibidor da PKC (Ro-32-0432) bloqueou a ativação do complexo enzimático promovida pelos AOPPs. A ativação dessa via (PKC/NADPH oxidase) pelos AOPPs foi a responsável por resultar em um aumento da deposição de matriz extracelular, a qual é um dos sinais mais precoces de lesão glomerular. Essa deposição foi verificada através do aumento da expressão de fibronectina e colágeno do tipo IV em células mesangiais (Figura 5) (WEI et al., 2009). Corroborando com esses achados, Zhou et al. (2009), através de um estudo realizado *in vitro* e *in vivo*, também observaram que os AOPPs promovem alterações em outro tipo celular renal, os podócitos. Considerando que a depleção dessas células está envolvida no desenvolvimento de proteinúria (TOYODA et al., 2007), o estudo de Zhou et al., (2009) determinou que a administração crônica de AOPPs em ratos induziu apoptose de podócitos, resultando em redução do número e da densidade dessas células no tecido renal. Esse achado foi confirmado *in vitro* através de modelo de cultura de podócitos. Nesse sentido, foi observado que esse processo apoptótico induzido pelos AOPPs foi mediado pela ativação da NADPH oxidase e também pelo aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas, incluindo a p53, Bax e caspase-3 (ZHOU et al., 2009). O efeito pró-apoptótico promovido por AOPPs foi explorado para outros tipos celulares, incluindo células vasculares endoteliais (GUO et al., 2008) e células epiteliais intestinais (XIE et al., 2014).

Figura 5 - Via de sinalização, dependente da PKC, envolvida na elevação de  $O_2^{\bullet-}$  e de matriz extracelular promovida pelos AOPPs em células mesangiais



Fonte: Adaptado de WEI et al., 2009. AOPPs, produtos proteicos de oxidação avançada; nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase;  $O_2^{\bullet-}$ , radical ânion superóxido; ECM, matriz extracelular, FN, fibronectina; TGF- $\beta$ 1, fator de crescimento transformante  $\beta$ .



A apoptose é um processo de morte celular que é regulado através do balanço entre proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas. A família Bcl-2, um regulador chave da apoptose, consiste tanto em proteínas a favor do processo de apoptose, incluindo Bax e Bad, quanto contrárias a apoptose, representada pela Bcl-2 e Bcl-xL (DEJEAN et al., 2010). A proteína pró-apoptótica Bax é necessária para alterar a permeabilidade da membrana mitocondrial, induzindo a liberação do citocromo c o que leva a ativação de caspases. Entretanto, Bcl-2 inibe esse processo através da supressão da translocação do Bax (CHIPUK et al., 2008). Recentemente, foi demonstrado que os AOPPs induziram apoptose em cardiomiócitos (células H9c2). Apoptose de cardiomiócitos é um dos principais responsáveis pela fisiopatogênese de cardiomiopatia diabética (KUETHE et al., 2007), e esses achados sugerem que a apoptose induzida pelos AOPPs pode estar envolvida na gênese dessa complicação do diabetes. O mecanismo subjacente a esse efeito pró-apoptótico foi através da diminuição da inativação da fosforilação de Akt, redução da fosforilação de Bad, diminuição da expressão de Bcl-2, aumento da expressão de Bax e ativação da caspase-3 (ZHANG et al., 2016). O mecanismo pró-apoptótico induzido pelos AOPPs sobre as células epiteliais intestinais envolveu o aumento da produção de EROs mediada pela ativação da NADPH oxidase.

No entanto, a via pró-apoptótica ativada nessas células foi associada com a ativação da via de sinalização mediada pela c-jun N-terminal quinase (JNK) (XIE et al., 2014). JNK é uma proteína quinase pertencente à superfamília das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs). As MAPKs medeiam numerosos processos celulares, como crescimento, diferenciação e morte celular, em resposta a muitos estímulos extracelulares, incluindo fatores de crescimento, hormônios, citocinas e também espécies reativas do estresse oxidativo (YANG et al., 2013). A via MAPK pode ser categorizada em três subfamílias: proteína quinase ativada por sinal extracelular (ERK ½ ou p44/42 MAPK), JNK e p38 MAPK. No entanto, a exposição das células epiteliais intestinais com AOPPs induziu apoptose mediante ativação apenas da fosforilação da JNK, não apresentando efeito sobre a fosforilação da p38 MAPK e da ERK ½. Também foi observado que a morte celular induzida pelos AOPPs nessas células é um processo dependente da ativação da via pró-apoptótica independente de caspase, mediada por poli (ADP-ribose) polimerase-1 (PARP-1) (XIE et al., 2014).

Evidências crescentes indicam que os AOPPs podem desempenhar suas funções deletérias através da interação com receptores de membrana. Até o momento, foram reconhecidos dois receptores de membrana os quais podem interagir com os AOPPs e desencadear as vias de transdução de sinal estimuladas por esses produtos. Um possível alvo é

o receptor multi-ligante de AGEs (RAGE) (MARSCHE et al., 2007; GUO et al., 2008; ZHOU et al., 2009; XIE et al., 2014; WU et al., 2016). Esse receptor transmembranar está envolvido nas ações desempenhadas por muitos agentes biológicos, particularmente os AGEs, e estão expressos em células renais, endoteliais, bem como células do sistema imune, incluindo macrófagos e neutrófilos (COLLISON et al., 2002). O aumento da expressão desses receptores têm sido implicado na patogênese de uma série de condições clínicas que envolvem o processo inflamatório (CHANG et al., 2008; BUCCIARELLI et al., 2008). Considerando que os AOPPs e os AGEs apresentam muitas características patofisiológicas semelhantes (WITKO-SARSAT et al., 1998), foi hipotetizado que os AOPPs também poderiam desempenhar seus papéis através de RAGE. De fato, Witko-Sarsat et al. (1998) demonstraram que há uma forte correlação entre as concentrações plasmáticas de AOPPs e os níveis de AGEs em pacientes urêmicos. Assim, foi demonstrado que AOPPs promovem aumento da expressão de moléculas pró-aterogênicas, como a molécula de adesão intracelular (iCAM-1) e molécula de adesão da célula vascular (vCAM-1), em células endoteliais através da interação com os receptores RAGE.

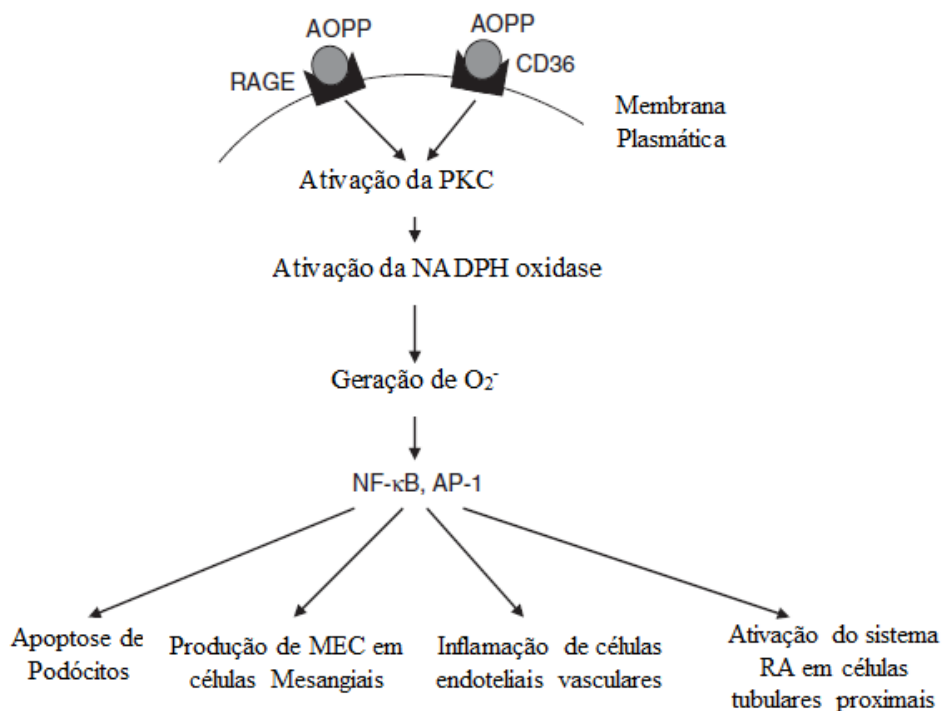
A via de sinalização ativada pelos AOPPs e que resulta na ativação das células endoteliais envolve o aumento da geração de radicais  $O_2^{\cdot-}$  dependente da NADPH oxidase, ativação da ERK 1/2 e ativação da MAPK p38 (GUO et al., 2008). Marsche et al. (2007) também investigaram o envolvimento dos AOPPs com os receptores RAGE, e nesse estudo foi verificado que os AOPPs exerceram um papel chave na indução de inflamação em células vasculares. Primeiramente, foi demonstrado, através de técnicas de imunohistoquímica, a co-localização de proteínas modificadas por HOCl e a expressão de RAGE em seções de aorta humana com lesões ateroscleróticas. Posteriormente, através de ensaios de *binding*, observaram que AOPPs apresentam grande afinidade por esse receptor e que essa interação promove ativação de uma cascata de sinalização via MAPK e um aumento da expressão de MCP-1, um importante mediador inflamatório envolvido no recrutamento de leucócitos para os sítios inflamatórios (MARSCHE et al., 2007).

No rim, especialmente nos podócitos renais, a expressão de RAGE é estimulada pelos AOPPs. A interação AOPPs/RAGE provoca aumento da geração de EROs, resultando na indução de apoptose dessas células (ZHOU et al., 2012). Os AOPPs também foram capazes de induzir danos em células tubulares renais através de uma via dependente de receptores *scavenger* CD-36 (IWAO et al., 2008). Nesse contexto, Cao et al., (2013) demonstraram que os AOPPs induziram um aumento da expressão de proteínas envolvidas na ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona intra-renal via receptores CD-36. A Figura 6 ilustra

alguns mecanismos envolvidos na ativação de receptores pelos AOPPs observados na DRC. Considerando que a ativação dessa via está envolvida na progressão da DRC, os achados sugerem que o acúmulo de AOPPs desempenha um papel chave na progressão desta patologia (CAPPEILÈRRE-BLANDIN et al., 2006; CAO et al., 2013).

A DRC frequentemente evolui para doença renal de estágio final e um dos mecanismos fisiopatológicos é a fibrose intersticial renal (LI et al., 2013). A transição celular de epitelial para mesenquimal e a hipertrofia renal parecem ser processos envolvidos na patogênese de DRC (WOLF et al., 2003; LIU, 2010). Pacientes com DRC, em estágio precoce da doença, apresentaram níveis plasmáticos elevados de AOPPs e esses níveis correlacionaram-se positivamente com o comprometimento da função renal (LIU et al., 2011), indicando que os AOPPs desempenham um papel na progressão da DRC (WEI et al., 2009). Perturbações celulares induzidos pelos AOPPs podem ser mecanismos subjacentes a patogênese e progressão das doenças renais. O retículo endoplasmático funciona como o maior centro de processamento celular, na qual proteínas são sintetizadas, secretadas, dobradas e montadas de maneira correta (TANGE et al., 2015).

Figura 6 - Papel patogênico dos AOPPs na progressão da DRC



Fonte: Adaptado de Cao et al., 2014. AOPPs, produtos proteicos de oxidação avançada; RAGE, receptor dos produtos finais de glicação avançada; CD36, receptores *scavenger* CD36; PKC, proteína quinase C, NADPH oxidase, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase;  $O_2^{\bullet-}$ , radical ânion superóxido; NF-κB, fator de transcrição κB; AP-1, fator de transcrição proteína ativadora-1. MEC, matriz extracelular; RA, sistema renina-angiotensina.

Condições adversas, incluindo hipóxia e estresse oxidativo, afetam as funções do retículo endoplasmático e resultam no acúmulo de proteínas mal dobradas (*misfolded*) ou não dobradas (*unfolded*) no lúmen do retículo endoplasmático, induzindo estresse do retículo endoplasmático. O estresse do retículo endoplasmático é um processo envolvido no desenvolvimento de muitas desordens renais, incluindo doença renal do diabetes (WU et al., 2010) e DRC (KIMURA et al., 2008). Tange et al. (2015) demonstraram que os AOPPs induziram hipertrofia tubular, avaliada através do aumento da expressão da p27, e transição celular de epitelial para mesenquimal, avaliada através da perda da expressão da E-caderina e o aumento da expressão da alfa-actina de músculo liso, ambas características fenotípicas de células mesenquimais, em cultura de células tubulares proximais renais humanas (células HK-2), e esses eventos foram associados com o estresse do retículo endoplasmático.

Embora existam uma série de estudos com o objetivo de investigar o papel dos AOPPs tanto à nível sistêmico, quanto à nível celular, ainda há muitas dúvidas e perguntas a serem respondidas. Entre essas, incluem-se: a via MPO/HOCl é a única via capaz de formar os AOPPs? A albumina é a única fonte proteica para a formação dos AOPPs? AOPPs formados por outras vias, além da via clássica MPO/HOCl, também podem desempenhar um papel na indução do processo inflamatório e apoptótico? Nenhuma dessas questões foram, até o momento, elucidadas, o que encoraja a investigação de novos estudos envolvendo os AOPPs. Dessa forma, no presente estudo buscou-se investigar novas vias de formação dos AOPPs, através da reação de Fenton, e do colágeno, como uma nova fonte proteica, e também verificar se esses novos produtos também são capazes de induzir um processo inflamatório.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de novas vias para a formação de AOPPs através da reação de Fenton e da utilização do colágeno como uma nova fonte proteica, assim como investigar os efeitos destes AOPPs sobre processos inflamatórios envolvendo neutrófilos e células embrionárias renais (HEK 293).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer um modelo experimental de indução da formação de AOPPs *in vitro* baseado na reação de Fenton;
- Investigar se a reação de Fenton é capaz de promover o aumento da produção de AOPP em amostras biológicas;
- Avaliar a capacidade da N-acetilcisteína (NAC) e da frutose-1,6-bisfosfato (FBP) em inibir a formação de AOPPs formados através da reação de Fenton;
- Verificar o efeito dos AOPPs formados através da reação Fenton (AOPP-RF) sobre a expressão de COX-2, IL-6 e NF-kB através do ensaio de transfecção em células renais embrionárias (HEK 293);
- Investigar a formação de AOPPs através da exposição do colágeno ao HOCl (colágeno-AOPP);
- Avaliar o efeito do colágeno-AOPP sobre a viabilidade celular em neutrófilos humanos isolados;
- Investigar as alterações induzidas pelo colágeno-AOPP sobre os níveis de marcadores oxidativos e inflamatórios, incluindo AOPPs, óxido nítrico,  $O_2^{\bullet-}$  e HOCl em neutrófilos humanos isolados;
- Verificar os efeitos do colágeno-AOPP sobre marcadores de apoptose celular em neutrófilos humanos isolados através de citometria de fluxo;
- Avaliar os efeitos do alfa-tocoferol sobre a viabilidade celular, os marcadores oxidativos e inflamatórios, bem como sobre marcadores de apoptose em neutrófilos humanos isolados.

## **4 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS**

### **4.1 ARTIGO CIENTÍFICO I**

#### **An alternative pathway through the Fenton reaction for the formation of advanced oxidation protein products, a new class of inflammatory mediators**

Guilherme Vargas Bochi, Vanessa Dorneles Torbitz, Lara Peruzzolo Cargni, José Antonio Mainardi de Carvalho, Patrícia Gomes, Rafael Noal Moresco

Publicado no Periódico: **Inflammation**

Inflammation. 2014 Apr;37(2):512-21. doi: 10.1007/s10753-013-9765-1.

**An alternative pathway through the Fenton reaction for the formation of advanced oxidation protein products, a new class of inflammatory mediators**

Guilherme Vargas Bochi<sup>1,2</sup>, Vanessa Dorneles Torbitz<sup>1</sup>, Lara Peruzzolo Cargini<sup>1</sup>, José Antonio Mainardi de Carvalho<sup>1,4</sup>, Patrícia Gomes<sup>3</sup>, Rafael Noal Moresco<sup>1,2,4,\*</sup>

<sup>1</sup>Research Laboratory of Clinical Biochemistry, Department of Clinical Analysis, Health Sciences Center, Federal University of Santa Maria, RS, Santa Maria, Brazil

<sup>2</sup>Pharmacology Postgraduate Program, Health Sciences Center, Federal University of Santa Maria, RS, Santa Maria, Brazil

<sup>3</sup>Nanosciences Postgraduate Program, Franciscan University Center, UNIFRA, RS, Santa Maria, Brazil

<sup>4</sup>Pharmaceutical Sciences Postgraduate Program, Health Sciences Center, Federal University of Santa Maria, RS, Santa Maria, Brazil

\*Corresponding Author: Rafael Noal Moresco

Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Avenida Roraima 1000, Prédio 26, Sala 1401, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

Tel.: +55 55 32208941; Fax: +55 55 32208018

E-mail: rnmoresco@yahoo.com.br

**Abstract**

The accumulation of advanced oxidation protein products (AOPPs) has been linked to several pathological conditions, and their levels are formed during oxidative stress as a result of reactions between plasma proteins and chlorinated oxidants produced by myeloperoxidase (MPO). However, it was suggested that the generation of this mediator of inflammation may also occur via an MPO-independent pathway. The aim of this study was to induce the formation of AOPPs *in vitro* through Fenton reaction and to investigate whether this generation could be counteracted by N-acetylcysteine (NAC) and fructose-1,6-bisphosphate (FBP). The complete Fenton system increased the AOPPs levels and both NAC and FBP were capable of inhibiting the formation of Fenton reaction–induced AOPPs. These data provide new hypothesis about another pathway of AOPPs formation, as well as report that NAC and FBP may be good candidates to neutralize pro-inflammatory and pro-oxidant effects of AOPPs in several diseases.

**Keywords:** Oxidative stress; Inflammation; Mediators; Fructose-1,6-bisphosphate; N-acetylcysteine.



## 1. Introduction

Under physiological conditions, animal cells produce certain amounts of reactive oxygen species (ROS) that participate in numerous metabolic processes and, generally, are required for life processes [1,2]. On the other hand, they are potentially very toxic, and when present in excess, they can damage macromolecules, such as proteins. Several chronic inflammatory diseases, including diabetes *mellitus*, atherosclerosis, and chronic kidney disease (CKD), are characterized by increased oxidative stress and enhanced tissue and systemic levels of oxidized protein [3-9]. It has been well documented that human serum albumin (HSA) is quite vulnerable to ROS [10]. Thereby, HSA is continuously exposed to oxidative stress so that alterations of the conformation and function of HSA could occur, resulting in modification of its properties, which acts as a pro-oxidant [11].

There are several mechanisms, which induce protein oxidation because all amino acid side chains can become oxidatively modified. Accordingly, there are numerous different types of protein oxidative modification, and new compounds and modified structures are formed. Recently, advanced oxidation protein products (AOPPs), new markers of protein oxidation, have begun to attract the attention of various investigators [12-15]. AOPPs are not only a marker of oxidative stress but also a mediator of inflammation [15]. More interesting is that AOPPs can be formed *in vitro* by the exposure of serum albumin to hypochlorous acid (HOCl) [7]. This biomarker comprises several chromophores, including pentosidine, carbonyls, and proteins cross-linked by dityrosine, which shows absorbance at a wavelength of 340 nm [15]. Until now, it is known that AOPPs are formed as a result of reaction between plasma proteins, mostly albumin, and chlorinated oxidants produced by myeloperoxidase (MPO), among which, HOCl is the most powerful compound [7]. MPO levels correlate with the AOPPs plasma content in hemodialysis patients, and approximately 50% of AOPPs are formed by MPO-dependent activities [16]. Thus, HOCl may represent one of the pathways for AOPPs production in plasma proteins exposed to activated phagocytes.

However, Capeillère-Blandin et al. (2006) demonstrated that there was a lack of association of plasma AOPPs concentration with circulating MPO activity in predialysis patients with CKD, in contrast to the strong association found in hemodialysis patients [16]. These observations suggest that the generation of AOPPs may also occur via an MPO-independent pathway and may involve other agents. Because Fenton reaction is an important source of ROS, especially during the inflammatory process and that hydroxyl radical (HO<sup>•</sup>) formed by this reaction is the most harmful free radical, this reaction may represent an alternative pathway for the generation of AOPPs. Furthermore, the assessment of impact of

antioxidants on protein oxidation is another approach. It has been shown that both N-acetylcysteine (NAC) as fructose-1,6-bisphosphate (FBP) were able to inhibit the formation of HOCl-induced AOPPs in a concentration-dependent manner [17]. Considering that AOPPs are a family of heterogeneous compounds with a diversity of structural modifications [15] and that Fenton reaction is frequently used to experimentally induce oxidative damage to macromolecules, we hypothesized that the Fenton reaction may contribute to the generation of AOPPs, indicating that HO<sup>•</sup> formed through this reaction may be an important pathway for the formation of AOPPs. However, the association between Fenton reaction and the formation of AOPPs has not been reported previously. Consequently, the purpose of the present study was to investigate the potential of an alternative pathway for the formation of AOPPs, a new class of inflammatory mediators, through the Fenton reaction, and evaluate whether this generation could be counteracted by FBP and NAC.

## 2. Methods

### 2.1 Chemicals and reagents

Human serum albumin was obtained from LFB Biomedicaments (Les Ulis, France). Potassium iodide (KI), acetic acid (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>), ferrous sulfate (FeSO<sub>4</sub>), and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) were purchased from Vetec Química (Rio de Janeiro, Brazil). The chloramine-T, NAC, and FBP were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration was determined spectrophotometrically at 240 nm ( $\epsilon = 43.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) after dilution with distilled deionized water [18]. Solutions of HOCl were prepared by diluting commercial sodium hypochlorite in 10 mM NaOH before use. The HOCl concentration was determined spectrophotometrically at 292 nm ( $\epsilon=350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) after dilution with 10 mM NaOH. All other chemicals used were of the highest grade available and were prepared daily in distilled deionized water. All experiments were performed in 50 mM phosphate buffer (PBS), pH 7.4.

### 2.2 Preparation of Fenton reaction and determination of AOPPs

Under *in vitro* conditions, Fe<sup>2+</sup> is able to generate the HO<sup>•</sup> by dismutation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> according to the Fenton-redox reaction:



Briefly, the HSA (30 mg/mL) was incubated, at room temperature, in the presence of either H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.05, 0.10, or 0.20 M) or FeSO<sub>4</sub> (20 mM) or in the presence of those two agents, namely, Fenton reaction, FeSO<sub>4</sub> (20 mM) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.05, 0.10, or 0.20 M) to produce albumin-AOPPs (HSA-AOPPs). A control HSA sample was incubated likewise without Fenton reaction reagents. The Fe<sup>3+</sup> generation was quantified using standard method on Cobas MIRA<sup>®</sup> automated analyzer (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). The concentration of HSA was used because it is close to the physiological albumin concentration, and we verified in preliminary experiments that 30 min was an optimal time of incubation [17]. The AOPPs concentration was measured by a spectrophotometric assay at 340 nm as described previously [7]. The content of AOPPs in the HSA or HSA-AOPPs preparations was expressed in µmol/L. In part of the experiments the absorbance spectrum was measured from 330 to 420 nm at 400 nm/min and 1 nm/point in a 1 cm light-path cuvette to rule out any possible changes in spectral absorbance of HSA. Briefly, HSA solution (30 mg/mL) was incubated for 30 min with HOCl 4 mM or with Fenton reaction (FeSO<sub>4</sub> 20 mM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.20 M) at room temperature. An untreated HSA was used as a control. Absorbance spectrum was performed using a Hitachi U-2800A spectrophotometer.

### *2.3 Effect of NAC and FBP on AOPPs formation*

The effect of NAC and FBP on the levels of HSA-AOPPs induced by Fenton reaction were evaluated by a concentration-effect curve. Briefly, HSA was incubated for 30 min with NAC (1 to 4 mg/mL) or FBP (4 to 20 mg/mL), along with Fenton reaction, FeSO<sub>4</sub> (20 mM) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.20 M), or PBS as control.

### *2.4 Effect of Fenton reaction on quantification of AOPPs levels in serum samples*

The possibility that Fenton reaction may induce AOPPs formation in biological/pathological samples was investigated. For this purpose, serum from healthy controls subjects, patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM), and patients with CKD were introduced in this study. Briefly, blood samples were collected into a serum separator tube (red-top Vacutainer<sup>®</sup>) and immediately centrifuged at 3000xg for 10 min at room temperature. Serum creatinine and albumin measurements were performed by use of standard methods on Cobas MIRA<sup>®</sup> (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) automated analyzer. For the analysis of glycosylated hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>) the whole blood was used and its levels were measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) method on D10<sup>®</sup> (Bio-Rad Laboratories,

California, USA). Mean (Standard Deviation) values for age, HbA<sub>1c</sub>, albumin, and creatinine in the different groups were as follows: healthy controls, n= 5, age= 47.2 (12.1) years, HbA<sub>1c</sub>= 5.7% (0.3%), albumin= 32.0 (2.4) g/L, creatinine= 0.9 (0.1) mg/dL; T2DM, n= 5, age= 57.7 (25.8) years, HbA<sub>1c</sub>= 10.5% (2.6%), albumin= 30.2 (4.2) g/L, creatinine= 0.9 (0.3) mg/ dL; and CKD, n= 5, age= 50.4 (12.9) years, HbA<sub>1c</sub>= 5.6% (0.2%), albumin= 25.6 (6.9) g/L, creatinine= 4.0 (1.9) mg/dL. The impact of Fenton reaction on measured AOPPs levels was investigated by comparing AOPPs levels in serum samples immediately before (pre-FR) and 30 min after (post-FR) the incubation with Fenton reaction (FeSO<sub>4</sub> 20 mM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.20 M) at room temperature. This study protocol was approved by the local ethics committee (number 12303113.0.0000.5346).

### 2.5 Statistical analysis

All analyses were conducted in replicates (n = 5). The values exhibited normal distribution on the basis of Kolmogorov-Smirnov test. All data, expressed as mean ± SEM, were compared using one-way analysis of variance, followed by the Tukey post test for multiple comparisons. Student's *t* paired test was performed to compare AOPPs levels in serum samples pre- and post-incubation with Fenton reaction. P < 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were carried out with GraphPad Prism version 4.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## 3. Results

As shown in Figure 1, the treatment of HSA with Fenton reaction induced a concentration-dependent increase in the AOPPs levels compared with native HSA (PBS) (Figure 1A). The content of AOPPs in the HSA exposed to the complete Fenton system Fe<sup>2+</sup> (20 mM)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.20 M) was 148.40 ± 19.29 μmol/L. The increased formation of Fe<sup>3+</sup> indicated that the Fenton reaction occurred (Figure 1B). The effects of oxidation on the structural properties of HSA were examined. The spectrum absorbance analysis of albumin samples indicated that oxidation of HSA promoted a peak at 340 nm as compared to untreated HSA (Figure 2). Interestingly, a similar absorbance spectrum is observed in HSA solutions obtained by incubation with HOCl or with Fenton reaction. These results suggest that the structure of HSA is significantly changed by oxidation with an increase in absorbance at 340 nm, indicating that these spectral changes may be associated with AOPP formation.

Because the reaction between  $\text{FeSO}_4$  (20 mM) and  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.20 M) appeared to be the most efficient oxidant concentration in inducing HSA-AOPPs formation, we further studied the antioxidant potential of NAC and FBP. The effect of the NAC and FBP on HSA oxidized by a Fenton system is shown in Figure 3. The incubation of HSA with NAC significantly reduced the formation of Fenton reaction-induced AOPPs ( $P < 0.001$ , Figure 3A). As shown in Figure 3A, NAC 2 and 4 mg/mL were able to prevent the AOPPs formation, and at a NAC concentration of 4 mg/mL, a 65% reduction of HSA-AOPPs formation was observed. At a lower concentration (1 mg/mL), NAC showed a tendency in reducing the formation of Fenton reaction-induced AOPPs but not significantly. Similarly, the treatment with FBP also significantly reduced the HSA-AOPPs formation when compared with the Fenton reaction group without FBP ( $P < 0.001$ , Figure 3B). FBP 20 mg/mL inhibited approximately 68% of HSA-AOPPs formation. However, FBP 4 mg/mL did not significantly inhibit the formation of AOPPs (Figure 3B).

To further confirm the impact of Fenton reaction on AOPPs formation, serum samples were incubated with indicated concentration of Fenton system reagents for 30 min. The exposure of serum to Fenton reaction induced increase in AOPPs levels, similarly as observed with HSA. AOPPs concentrations were significantly higher after incubation with Fenton reaction (post-FR) in healthy controls subjects ( $11.6 \pm 1.1$  vs  $17.9 \pm 1.2$   $\mu\text{mol/L}$ ,  $P = 0.037$ ), T2DM patients ( $14.0 \pm 1.1$  vs  $39.8 \pm 6.5$   $\mu\text{mol/L}$ ,  $P = 0.017$ ) and CKD patients ( $19.3 \pm 2.6$  vs  $37.2 \pm 7.7$   $\mu\text{mol/L}$ ,  $P = 0.037$ ), as shown in Figure 4.

Please add **Figure 1** here

Please add **Figure 2** here

Please add **Figure 3** here

Please add **Figure 4** here

Please add **Figure 5** here

#### 4. Discussion

The major finding of the present study is the association of AOPPs formation with the Fenton reaction. To the best of our knowledge, this study is the first attempt to check if Fenton reaction is also a pathway that generates AOPPs formation *in vitro*. Interestingly enough, based on this finding, we can speculate that the Fenton reaction may also contribute in the formation of AOPPs *in vivo*. In the present study, we demonstrate that the  $\text{Fe}^{2+}$  alone was unable to lead to a significant increase of the HSA-AOPPs levels. The  $\text{H}_2\text{O}_2$  increased

significantly the HSA-AOPPs levels in a concentration-dependent manner. However, we combined the individual substances to enhance their oxidative properties. When  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  were applied together with different concentrations of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , the level of HSA-AOPPs increased significantly. Thus, the complete Fenton system  $\text{Fe}^{2+}$  (20 mM)/ $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.20 M) increased the AOPPs levels, and simultaneously, it induced significant changes in  $\text{Fe}^{3+}$  production.

The pathophysiological relevance of plasma AOPPs has already been documented in the context of several clinical conditions, including chronic uremia [7,16,19], diabetes mellitus [20-22], and coronary artery disease in nonuremic subjects [23-24]. Some pathological effects and possible pathways of generating AOPPs are shown in Figure 5. Until the present moment, AOPPs formation is linked with the production of HOCl via MPO [15]. However, there are studies linking the formation of this biomarker with other sources of oxidative stress. In this context, Drüeke et al. (2002), found a significant relation between ferritin, AOPPs, and the cumulative annual dose of intravenous iron given to treat patients with anemia [25]. Thereby, even at the recommended dose and infusion duration, this iron supplementation leads to generation of redox-active iron, which is a potent pro-oxidant [26]. It has been suggested that iron intravenously may enhance the generation of  $\text{HO}^\bullet$  in the body through the inflammation process and the Fenton reaction [27-28]. Tovbin et al. (2002) also reported that iron intravenously in hemodialysis patients induced an increase in the level of protein oxidation products, as assessed by AOPPs levels and that this effect is positively related to the inflammatory condition of patients [29]. Similarly, Anraku et al. (2008) demonstrated that the intravenous higher frequency iron protocol significantly increased AOPPs levels compared with the lower frequency protocol [26]. These findings suggest that other sources of free radicals, beyond the HOCl derivative of MPO, may contribute to the formation of AOPPs.

In our experiments, we tried to find out optimal conditions for the formation of HSA-AOPPs induced by the Fenton system. Thus, we used separately the individual agents,  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  and their combinations, to induce an available extent of injury in the HSA for studying the protective effects of the antioxidants. The complete Fenton system  $\text{Fe}^{2+}$  (20 mM)/ $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.20 M) increased the AOPPs levels and simultaneously induced significant changes in  $\text{Fe}^{3+}$  production. The most harmful free radical is  $\text{HO}^\bullet$ , which is produced during this reaction. Both substrates of Fenton reaction are normally present in cells and possess important physiological roles [30]. Within cells, most iron is bound to chelating proteins, such as ferritin, preventing the iron from participating in the Fenton reaction. In this context, the

abundance and availability of free or labile iron is known to be critical for the production of HO<sup>•</sup> and cell damage because of oxidative stress [31]. Concerning the iron concentration *in vivo*, it was reported that if a level of total iron in plasma is reaching at least 40 μmol/L, the presence of catalytically effective iron is very probable. The concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was proposed to increase up to mM/L levels under pathological conditions [32]. Redox metal (iron, copper)–mediated oxidation of a protein may be a site-specific process. The Fe(II) protein complex reacts at the site with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> via the Fenton reaction to yield active oxygen species, like HO<sup>•</sup>, binding to high- and low-affinity metal binding sites of protein, involving sensitive amino acid residues: proline, histidine, arginine, lysine, and cysteine [33]. Recently, it was shown that the HO<sup>•</sup>, produced from the Fenton reaction, was able to induce a structural change in the N-terminal region of albumin, which occurs during ROS production or ischemia events, forming the ischemia-modified albumin [34]. Altogether, these findings suggest a new concept, making HO<sup>•</sup>, continuously produced by several sources of reactive species, a pathway that deserves attention for the formation of AOPPs. An interesting finding in the present study is that, when the HSA spectral was taken into account, the oxidation promoted by the HOCl and the Fenton reaction revealed an absorbance maximum at 340 nm, suggesting that both pathways share a similar mechanism of AOPPs formation.

Our study also shows that both antioxidants studied decreased the HSA-AOPPs formation. Among several potential antioxidant drugs, we showed that NAC was able to prevent the formation of HSA-AOPPs obtained by the exposure of HSA to Fenton reaction. It is known that NAC is a thiol-containing compound with antioxidant effects that can be attributed to its action as a free radical scavenger and as a reactive sulfhydryl compound that increases the reducing capacity of the cell [35]. More specifically, NAC is capable of directly scavenging ROS and HOCl [36]. Indeed, NAC has already been used therapeutically in certain disorders related to oxidative stress such as chronic bronchitis and acetaminophen poisoning, and it has also recently been shown to protect renal function in conditions of acute [37] and chronic renal failure [38]. It was demonstrated that NAC, at similar concentrations to those used in this study (0.5 to 1.0 mg/mL), inhibited AOPP-induced oxygenation activities via both NADPH oxidase and MPO-dependent pathways [35]. Other possible strategy is the use of new drugs, such as FBP, which is a high-energy glycolytic metabolite. This drug has shown to have therapeutic effects in several pathological conditions that involve the activation of the inflammatory process and the formation of ROS, such as ischemia, shock, and toxic injuries [39-40]. We showed that FBP significantly reduced the formation of HSA-AOPPs obtained by the exposure of HSA to Fenton reaction. This inhibitory effect of FBP on HSA-

AOPP formation may be due to its antioxidative potential through reactive species scavenging [41]. This hypothesis agrees with published reports that FBP stood out as having a surprisingly high antioxidative capacity against HO<sup>•</sup> production in the Fenton reaction. Moreover, it has been documented that FBP counteracts the Fenton system via both iron sequestration and radical scavenging [42]. Accordingly, a previous study developed by our research group has demonstrated that *in vitro* treatment of HSA with HOCl promotes the formation of AOPPs in a concentration-dependent manner of HOCl. In the same study, it was also observed that both NAC and FBP inhibited this formation of AOPPs [17].

It is important to note that Fenton reaction induced an increased formation of AOPPs in biological samples of healthy individuals as well as in samples of patients with T2DM and CKD, which are two clinical conditions associated with an increased content of AOPPs. In fact, the Fenton chemistry plays a crucial role in both physiological and pathological processes in living organisms [47]. In addition, there are studies that support the idea that the Fenton reaction occurs *in vivo* [48-50], and it is frequently used to explain the toxic effects of redox-active metals.

To summarize, our data suggest that Fenton reaction may be an important pathway to the formation of AOPPs, contributing to the deleterious effect of this biomarker/mediator. The strength of this study is represented by the assessment of a new route of formation of AOPPs that broadens the understanding about the formation of this inflammatory mediator. It must be emphasized that other routes may be capable of forming AOPPs and that there are other sources of HO<sup>•</sup> beyond the Fenton reaction. Moreover, it is important to point out that NAC and FBP may be useful as a potential therapeutic strategy to mitigate and neutralize proinflammatory and pro-oxidant effects of AOPPs in different clinical conditions.

### **Acknowledgments**

This study was supported by grants to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes, Brazil). We thank SPi Global Professional Editing Services for writing assistance.

### **Declaration of Interest**

There are no conflicts of interest to declare.



## References

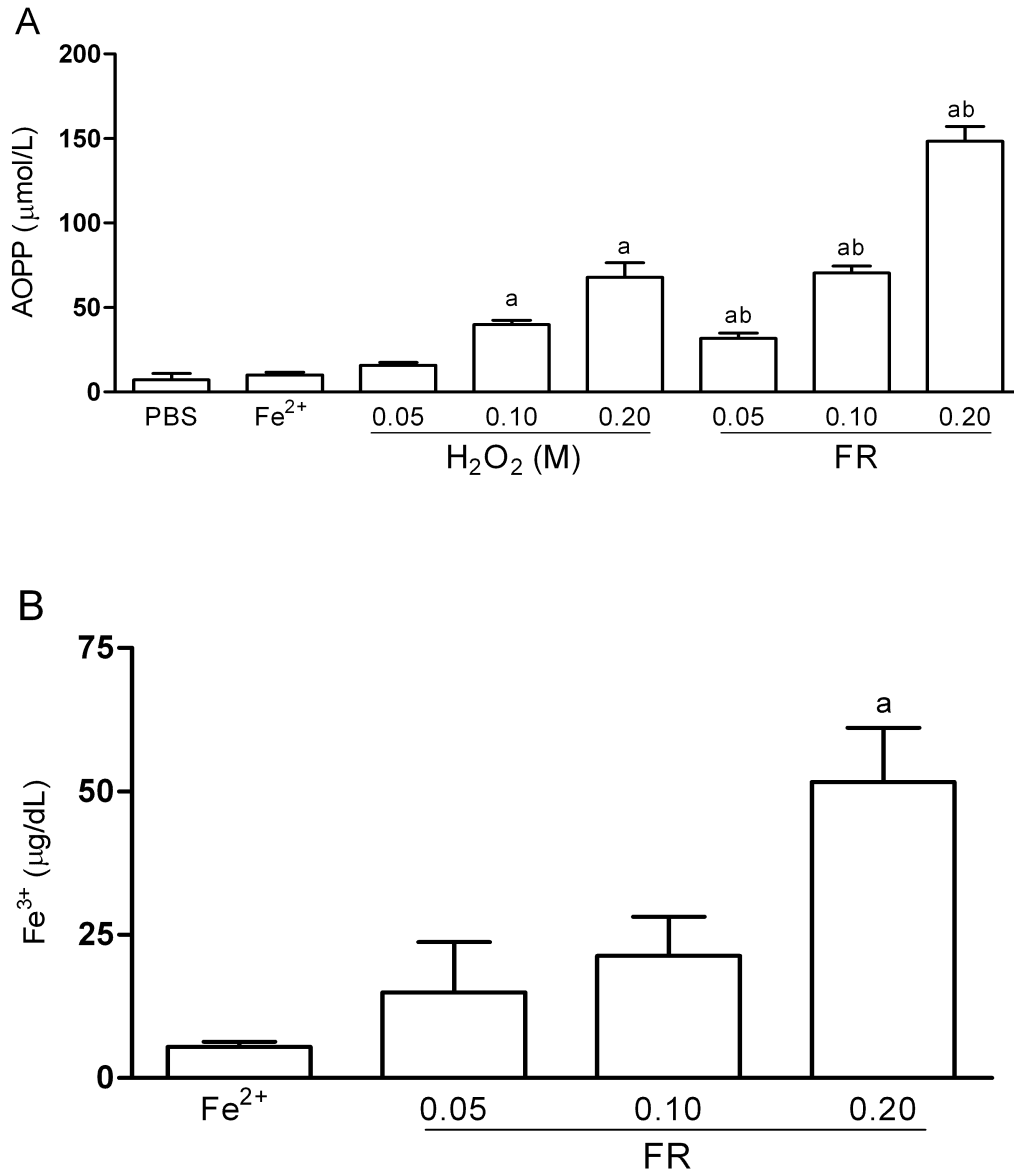
- [1] Halliwell, B. 2012. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition Reviews* 70: 257-265.
- [2] Ray, P.D., B.W. Huang, and Y. Tsuji. 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling* 24: 981-990.
- [3] Sorescu, D., D. Weiss, B. Lassegue, R.E. Clempus, K. Szocs, G.P. Sorescu, L. Valppu, M.T. Quinn, J.D. Lambeth, J.D. Vega, W.R. Taylor, and K.K. Griendling. 2002. Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation* 105: 1429-1435.
- [4] Brownlee, M. 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414: 813-820.
- [5] Kaneda, H., J. Taguchi, K. Ogasawara, T. Aizawa, and M. Ohno. 2002. Increased level of advanced oxidation protein products in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 162: 221-225.
- [6] Kalousova, M., J. Skrha, and T. Zima. 2002. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. *Physiological Research* 51: 597-604.
- [7] Witko-Sarsat, V., M. Friedlander, C. Capeillere-Blandin, T. Nguyen-Khoa, A.T. Nguyen, J. Zingraff, P. Jungers, and B. Descamps-Latscha. 1996. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney International* 49: 1304-1313.
- [8] Guo, Z.J., H.X. Niu, F.F. Hou, L. Zhang, N. Fu, R. Nagai, X. Lu, B.H. Chen, Y.X. Shan, J.W. Tian, R.H. Nagaraj, D. Xie, and X. Zhang. 2008. Advanced oxidation protein products activate vascular endothelial cells via a RAGE-mediated signaling pathway. *Antioxidants & Redox Signaling* 10: 1699-1712.
- [9] Zhou, L.L., W. Cao, C. Xie, J. Tian, Z. Zhou, Q. Zhou, P. Zhu, A. Li, Y. Liu, T. Miyata, F.F. Hou, and J. Nie. 2012. The receptor of advanced glycation end products plays a central role in advanced oxidation protein products-induced podocyte apoptosis. *Kidney International* 82: 759-770.
- [10] Himmelfarb, J., and E. McMonagle. 2001. Albumin is the major plasma protein target of oxidant stress in uremia. *Kidney International* 60: 358-363.
- [11] Mera, K., M. Anraku, K. Kitamura, K. Nakajou, T. Maruyama, and M. Otagiri. 2005. The structure and function of oxidized albumin in hemodialysis patients: Its role in elevated oxidative stress via neutrophil burst. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 334: 1322-1328.
- [12] Shi, X.Y., F.F. Hou, H.X. Niu, G. Wang, D. Xie, Z.J. Guo, Z.M. Zhou, F. Yang, J.W. Tian, and X. Zhang. 2008. Advanced oxidation protein products promote inflammation in diabetic kidney through activation of renal nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. *Endocrinology* 149: 1829-1839.
- [13] Zhou, L.L., F.F. Hou, G.B. Wang, F. Yang, D. Xie, Y.P. Wang, and J.W. Tian. 2009. Accumulation of advanced oxidation protein products induces podocyte apoptosis and deletion through NADPH-dependent mechanisms. *Kidney International* 76: 1148-1160.

- [14] Hanasand, M., R. Omdal, K.B. Norheim, L.G. Gøransson, C. Brede, and G. Jonsson. 2012. Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. *Clinica Chimica Acta* 413: 901-906.
- [15] Capeillère-Blandin, C., V. Gausson, B. Descamps-Latscha, and V. Witko-Sarsat. 2004. Biochemical and spectrophotometric significance of advanced oxidized protein products. *Biochimica et Biophysica Acta* 1689: 91-102.
- [16] Capeillère-Blandin, C., V. Gausson, A.T. Nguyen, B. Descamps-Latscha, T. Drüeke, and V. Witko-Sarsat. 2006. Respective role of uraemic toxins and myeloperoxidase in the uraemic state. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association – European Renal Association* 21: 1555-1563.
- [17] Bochi, G.V., V.D. Torbitz, L.P. Cargnin, M.B. Sangoi, R.C. Santos, P. Gomes, and R.N. Moresco. 2012. Fructose-1,6-bisphosphate and N-acetylcysteine attenuate the formation of advanced oxidation protein products, a new class of inflammatory mediators, *in vitro*. *Inflammation* 35: 1786-1792.
- [18] Holmes, R.S., and C.J. Masters. 1970. Epigenetic interconversion of the multiple forms of mouse liver catalase. *FEBS Letters* 11: 45-48.
- [19] Witko-Sarsat, V., T. Nguyen Khoa, P. Jungers, T. Drüeke, and B. Descamps-Latscha. 1998. Advanced oxidation protein products: oxidative stress markers and mediators of inflammation in uremia. *Advances in nephrology from the Necker Hospital* 28: 321-341.
- [20] Kalousová, M., J. Skrha, and T. Zima. 2002. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. *Physiological Research* 51: 597-604.
- [21] Martín-Gallán, P., A. Carrascosa, M. Gussinyé, and C. Domínguez. 2003. Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. *Free Radical Biology and Medicine* 34: 1563-1574.
- [22] Tabak, O., R. Gelisgen, H. Erman, F. Erdenen, C. Muderrisoglu, H. Aral, H. Uzun. 2011. Oxidative lipid, protein, and DNA damage as oxidative stress markers in vascular complications of diabetes mellitus. *Clinical and Investigative Medicine* 34: 163-171.
- [23] Chen, S., L. Liu, X. Sun, Y. Liu, and T. Son. 2005. Captopril restores endothelium-dependent relaxation induced by advanced oxidation protein products in rat aorta. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 46: 803-809.
- [24] Kaneda, H., J. Taguchi, K. Ogasawara, T. Aizawa, and M. Ohno. 2002. Increased level of advanced oxidation protein products in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* 162: 221-225.
- [25] Drüeke, T., V. Witko-Sarsat, Z. Massy, B. Descamps-Latscha, A.P. Guerin, S.J. Marchais, V. Gausson, and G.M. London. 2002. Iron therapy, advanced oxidation protein products, and carotid artery intima-media thickness in end-stage renal disease. *Circulation* 106: 2212-2217.
- [26] Anraku, M., K. Kitamura, R. Shintomo, K. Takeuchi, H. Ikeda, J. Nagano, T. Ko, K. Mera, K. Tomita, and M. Otagiri. 2008. Effect of intravenous iron administration frequency on AOPP and inflammatory biomarkers in chronic hemodialysis patients: a pilot study. *Clinical Biochemistry* 41: 1168-1174.

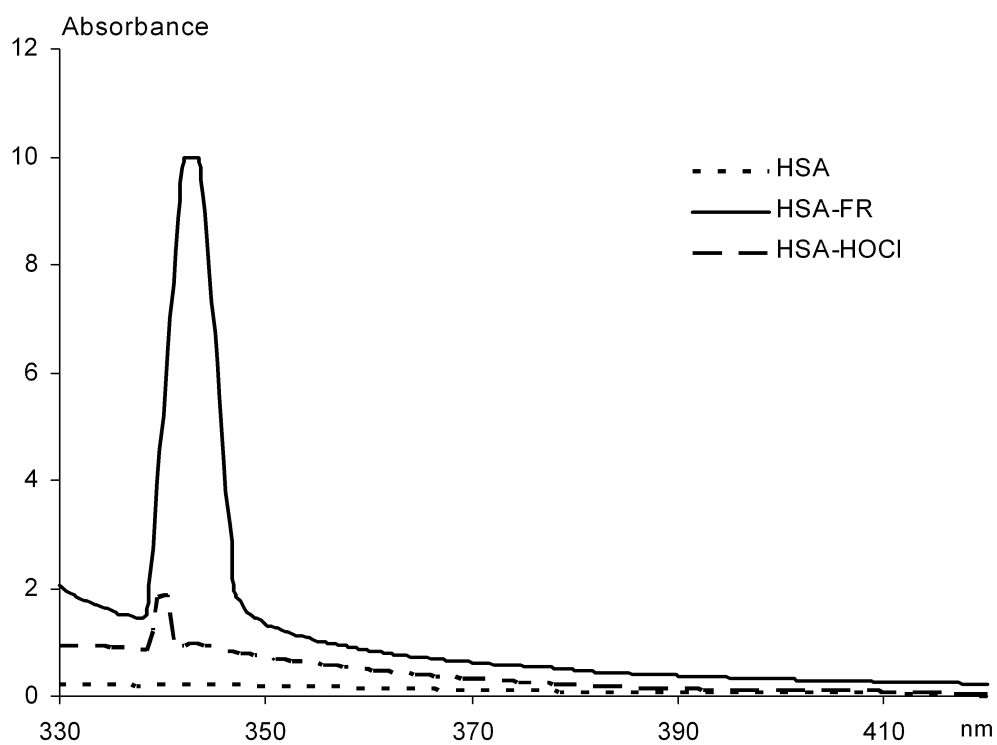
- [27] Halliwell, B. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts. 1978. Its role in degradation of hyaluronic acid by a superoxide-generating system. *FEBS Letters* 96: 238-242.
- [28] Rooyackers, T.M., E.S., Stroes, M.P. Kooistra, E.E. Van Faassen, R.C. Hider, T.J. Rabelink, and J.J. Marx. 2002. Ferric saccharate induces oxygen radical stress and endothelial dysfunction in vivo. *European Journal of Clinical Investigation* 32: 9-16.
- [29] Tovbin, D., D. Mazor, M. Vorobiov, C. Chaimovitz, and N. Meyerstein. 2002. Induction of protein oxidation by intravenous iron in hemodialysis patients: role of inflammation. *American Journal of Kidney Diseases* 40: 1005-1012.
- [30] Stępnia, J., A. Lewiński, and M. Karbownik-Lewińska. 2013. Membrane lipids and nuclear DNA are differently susceptible to Fenton reaction substrates in porcine thyroid. *Toxicology In Vitro* 27: 71-78.
- [31] Valko, M., C.J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, and M. Mazur. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160: 1-40.
- [32] Repka, T., and R.P. Hebbel. 1991. Hydroxyl radical formation by sickle erythrocyte membranes: role of pathologic iron deposits and cytoplasmic reducing agents. *Blood* 78: 2753-2758.
- [33] Trachootham, D., W. Lu, M.A. Ogasawara, R.D. Nilsa, and P. Huang. 2008. Redox Regulation of Cell Survival. *Antioxidants & Redox Signaling* 10: 1343-1374.
- [34] Pellegrino, P., B. Mallet, S. Delliaux, Y. Jammes, R. Gieu, and O. Schaf. 2011. Zeolites are effective ROS-scavengers *in vitro*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 410: 478-483.
- [35] Witko-Sarsat, V., V. Gausson, A.T. Nguyen, M. Touam, T. Drüeke, F. Santangelo, and B. Descamps-Latscha. 2003. AOPP-induced activation of human neutrophil and monocyte oxidative metabolism: a potential target for N-acetylcysteine treatment in dialysis patients. *Kidney International* 64: 82-91.
- [36] Aruoma, O.I., B. Halliwell, B.M. Hoey, and J. Butler. 1989. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radical Biology & Medicine* 6: 593-597.
- [37] Fishbane, S. 2008. N-acetylcysteine in the prevention of contrast-induced nephropathy. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 3: 281-287.
- [38] Holt, S., R. Marley, B. Fernando, D. Harry, R. Anand, D. Goodier, and K. Moore. 1999. Acute cholestasis-induced renal failure: effects of antioxidants and ligands for the thromboxane A2 receptor. *Kidney International* 55: 271-277.
- [39] Santos, R.C., R.N. Moresco, M.A. Peña Rico, A.R. Susperregui, J.L. Rosa, R. Bartrons, F. Ventura, D.N. Mário, S.H. Alves, E. Tatsch, H. Kober, R.O. de Mello, P. Scherer, H.B. Dias, and J.R. de Oliveira. 2012. Fructose-1,6-Bisphosphate Reduces the Mortality in *Candida albicans* Bloodstream Infection and Prevents the Septic-Induced Platelet Decrease. *Inflammation* 35: 1256-1261.
- [40] de Mello R.O., A. Lunardelli, E. Caberlon, C.M. de Moraes, R. Christ Vianna Santos, V.L. da Costa, G.V da Silva, P. da Silva Scherer, L.E. Buaes, D.A. da Silva Melo, M.V. Donadio, F.B. Nunes, and J.R. de Oliveira. 2011. Effect of N-acetylcysteine and fructose-1,6-bisphosphate in the treatment of experimental sepsis. *Inflammation* 34: 539-550.

- [41] Alva, N., T. Carbonell, T. Roig, J. Bermúdez, and J. Palomeque. 2011. Fructose 1,6 biphosphate administration to rats prevents metabolic acidosis and oxidative stress induced by deep hypothermia and rewarming. *European Journal of Pharmacology* 659: 259-264.
- [42] Bajić, A., J. Zakrzewska, D. Godjevac, P. Andjus, D.R. Jones, M. Spasić, and I. Spasojević. 2011. Relevance of the ability of fructose 1,6-bis(phosphate) to sequester ferrous but not ferric ions. *Carbohydrate Research* 346: 416-420.
- [43] Wei, X.F., Q.G. Zhou, F.F. Hou, B.Y. Liu, and M. Liang. 2009. Advanced oxidation protein products induce mesangial cell perturbation through PKC-dependent activation of NADPH oxidase. *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 296: 427-437.
- [44] Zhou, Q.G., M. Zhou, A.J. Lou, D. Xie, and F.F. Hou. 2010. Advanced oxidation protein products induce inflammatory response and insulin resistance in cultured adipocytes via induction of endoplasmic reticulum stress. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 26: 775-786.
- [45] Cao, W., J. Xu, Z.M. Zhou, G.B. Wang, F.F. Hou, and J. Nie. 2013. Advanced oxidation protein products activate intrarenal renin-angiotensin system via a CD36-mediated, redox-dependent pathway. *Antioxidants & Redox Signaling* 18: 19-35.
- [46] Valente, A.J., T. Yoshida, R.A. Clark, P. Delafontaine, U. Siebenlist, and B. Chandrasekar. 2013. Advanced oxidation protein products induce cardiomyocyte death via Nox2/Rac1/superoxide-dependent TRAF3IP2/JNK signaling. *Free Radical Biology & Medicine* 60: 125-135.
- [47] Prousek, J. 2007. Fenton chemistry in biology and medicine. *Pure and applied chemistry* 79: 2325-2338.
- [48] Repetto, M.G., N.F. Ferrarotti, and A. Boveris. 2010. The involvement of transition metal ions on iron- dependent lipid peroxidation. *Archives of Toxicology* 84: 255-262.
- [49] González, F.B., S. Llesuy, and A. Boveris. 1991. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. *Free Radical Biology & Medicine* 10: 93-100.
- [50] Chance, B., H. Sies, and A. Boveris. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews* 59: 527-605.

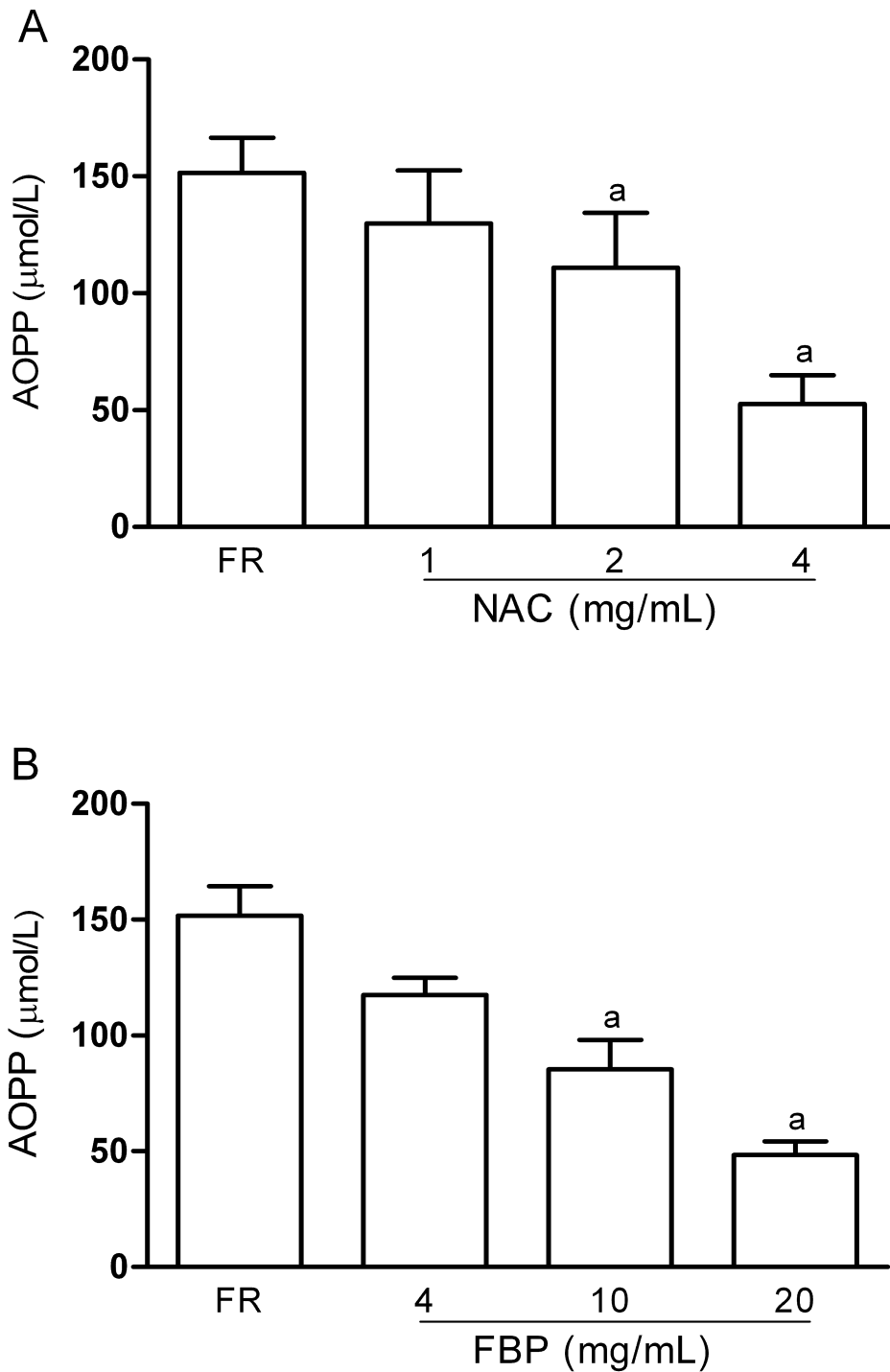
## Figure Captions



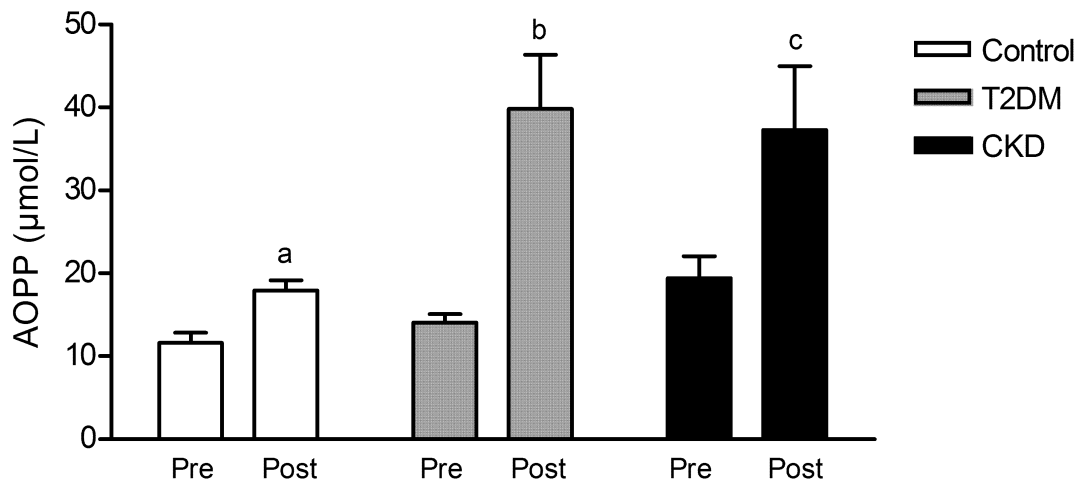
**Figure 1.** (A) Influence of the Fenton system components on HSA-AOPPs formation. HSA solution (30 mg/mL) was incubated for 30 min in the presence of either H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.05, 0.10, or 0.20 M) or FeSO<sub>4</sub> (Fe<sup>2+</sup>) (20 mM) or in the presence of those two agents, namely, Fenton reaction, Fe<sup>2+</sup> (20 mM) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.05, 0.10, or 0.20 M). (B) Production of Fe<sup>3+</sup> during the Fenton reaction. Data are expressed as mean ± SEM. <sup>a</sup>P < 0.001 vs. control (PBS) and Fe<sup>2+</sup> groups. <sup>b</sup>P < 0.001 vs. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group.



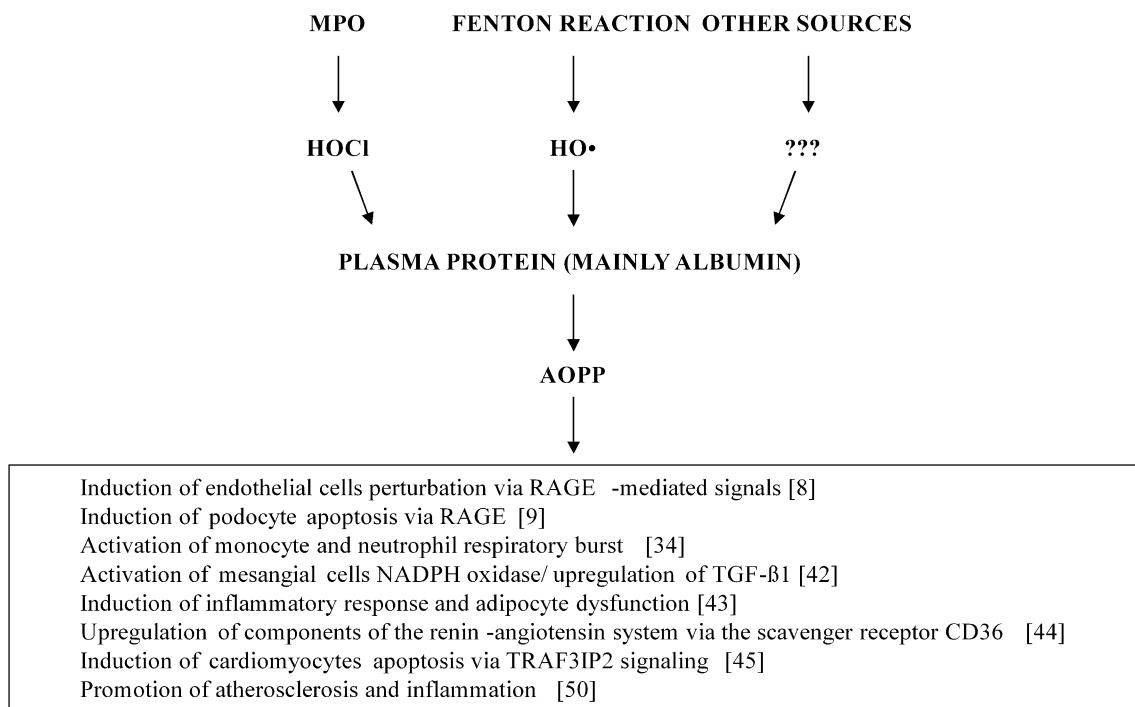
**Figure 2.** Spectral changes in HSA treated with Fenton reaction and chlorinated oxidants. Absorbance spectra of the native HSA, Fenton reaction-treated HSA (HSA-FR) and HOCl-treated HSA (HSA-HOCl) were recorded. HSA-AOPPs was obtained by treating HSA (30 mg/mL) with Fenton reaction (HSA-FR) or with HOCl (HSA-HOCl) as described in *Methods*.



**Figure 3.** Antioxidative protection of NAC and FBP on the formation of HSA-AOPPs induced by Fenton reaction. HSA solution (30 mg/mL) was previously treated (30 min at room temperature) with  $\text{FeSO}_4$  (20 mM) +  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.05, 0.10, or 0.20 M), along with NAC from 1 to 4 mg/mL (A) and FBP from 4 to 20 mg/mL (B). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. <sup>a</sup> $P < 0.001$  vs. the FR group.



**Figure 4.** Influence of the Fenton system components on AOPPs formation. Serum samples were incubated with Fenton system reagents ( $\text{Fe}^{2+}$  20 mM +  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.20 M) for 30 min. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. <sup>a</sup>P= 0.037 vs. pre-FR in control subjects. <sup>b</sup>P= 0.017 vs. pre-FR in T2DM patients. <sup>c</sup>P= 0.037 vs. pre-FR in CKD patients.



**Figure 5.** Schematic illustration depicting some possible pathways of AOPPs formation linked with the effects promoted by this mediator.



## 4.2 ARTIGO CIENTÍFICO II

### **Fenton reaction-generated advanced oxidation protein products induces inflammation in human embryonic kidney cells**

Guilherme Vargas Bochi, Vanessa Dorneles Torbitz, Roberto Christ Vianna Santos, Monica Cubillos-Rojas, José Luis Rosa López, Anna Maria Siebel, Patrícia Gomes, Jarbas Rodrigues de Oliveira, Rafael Noal Moresco

Publicado no Periódico: **Inflammation**  
Inflammation. 2016 May 4. [Epub ahead of print].

**Fenton reaction-generated advanced oxidation protein products induces inflammation in human embryonic kidney cells**

Guilherme Vargas Bochi<sup>1,2,\*</sup>, Vanessa Dorneles Torbitz<sup>1</sup>, Roberto Christ Vianna Santos<sup>3</sup>, Monica Cubillos-Rojas<sup>4</sup>, José Luis Rosa López<sup>4</sup>, Anna Maria Siebel<sup>5</sup>, Patrícia Gomes<sup>6</sup>, Jarbas Rodrigues de Oliveira<sup>7</sup>, Rafael Noal Moresco<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Clinical Biochemistry, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

<sup>2</sup>Pharmacology Postgraduate Program, Health Sciences Center, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

<sup>3</sup>Research Laboratory of Clinical Microbiology, Franciscan University Center, Santa Maria, Brazil

<sup>4</sup>Unitat Bioquímica i Biologia Molecular, Departament de Ciències Fisiològiques II, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>5</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Universidade Comunitária da Região de Chapecó, Chapecó, Brazil

<sup>6</sup>Nanosciences Postgraduate Program, Franciscan University Center, Santa Maria, Brazil

<sup>7</sup>Research Laboratory of Cellular Biophysics and Inflammation, The Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

\*Corresponding Author: Guilherme Vargas Bochi

Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Avenida Roraima 1000, Prédio 26, Sala 1401, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

Tel.: +55 55 32208941; Fax: +55 55 32208018

E-mail: bochiguilherme@gmail.com

**Abstract**

Fenton reaction is a new mechanism able to generate advanced oxidation protein products (AOPPs) by the exposure the human serum albumin to the Fenton system. Here, we characterized the effects of Fenton reaction-generated advanced oxidation protein products (AOPP-FR) on the gene transcription of the nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), cyclooxygenase-2 (COX-2) and interleukin-6 (IL-6) in human embryonic kidney cells (HEK 293). To investigate the effects of AOPP-FR and AOPP-HOCl on transcription of inflammatory genes, the NF- $\kappa$ B, COX-2 and IL-6 luciferase promoter activities were analyzed. AOPP-FR and AOPP-HOCl were able to induce the activation of the gene transcription of NF- $\kappa$ B, COX-2 and IL-6 in HEK 293 cells. However, the effects of AOPP-FR were significantly higher than the effects of AOPP-HOCl in relation to COX-2 and IL-6. AOPP-FR induces the activation of the gene transcription of NF- $\kappa$ B, COX-2 and IL-6 and may represent a novel pathogenic mediator of inflammation in kidney.

**Keywords:** Fenton reaction; Advanced oxidation protein products; Hypochlorous acid Inflammation; HEK 293.

## 1. Introduction

An imbalance between peroxidation and antioxidant defense systems results in excessive reactive oxygen species (ROS) accumulation and consequently oxidative stress. This process is associated with oxidative modification of proteins, causing structural and functional changes [1]. There are uncountable types of oxidative modifications that affect the protein structure. Consequently, these modified proteins are not only sensitive markers of oxidative stress, but they participate in the regulation of cell functions and may contribute to the inflammatory response [2,3]. An important family of plasma oxidized protein compounds, which is described in this context is the advanced oxidation protein products (AOPPs). Indeed, AOPPs are identified as a novel biomarker of oxidative damage to proteins and proinflammatory mediator. Structurally, they are defined as a group of dityrosine-containing and cross-linking protein products [4].

A significant contribution to AOPPs formation results from chlorinated oxidants produced by myeloperoxidase (MPO) during the neutrophils activation, as suggested by *in vitro* incubation of human plasma with hypochlorous acid (HOCl) [4]. However, the mechanisms of AOPPs formation and the molecular composition of AOPPs have not yet been completely elucidated. In addition, it has been suggested an MPO-independent oxidation pathway to AOPPs formation [4-6]. Recently, we demonstrated for the first time that the Fenton reaction is a new mechanism capable of generating AOPPs by the exposure the human serum albumin (HSA) to the Fenton system ( $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ ) [5].

In the context of kidney diseases, AOPPs have recently emerged as novel renal pathogenic mediators [7]. Particularly, AOPPs levels increased with the deterioration of renal function [8], and elevated concentrations of plasma AOPPs have been widely reported to be closely associated with the pathogenesis of chronic kidney diseases [9]. In the kidney cells, AOPPs induced the podocyte apoptosis via a cascade of signaling events involving the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase activation [7,10]. Furthermore, chronic accumulation of AOPPs accelerated renal fibrosis in a remnant kidney model [11] and promoted inflammation in the diabetic kidney [12]. However, the wide majority of literature regarding the AOPPs effects are linked to MPO-derived AOPPs (AOPP-HOCl), and the effects of Fenton reaction-generated AOPPs (AOPP-FR) have not yet been investigated.

Thus, we hypothesized that AOPP-FR may act as a new inflammatory mediator in kidney tissue. Therefore, this study aimed to examine whether AOPP-FR may induce the

activation of the gene transcription of inflammatory molecules, including the nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), cyclooxygenase-2 (COX-2) and interleukin-6 (IL-6) in human embryonic kidney cells.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Preparation of AOPP-FR and AOPP-HOCl

Under *in vitro* conditions,  $\text{Fe}^{2+}$  can generate the  $\text{HO}^\bullet$  by dismutation of  $\text{H}_2\text{O}_2$  according to the Fenton-redox reaction:



The AOPP-FR was prepared according to a previously described method [5]. Briefly, HSA solution (30 mg/mL) (LFB Biomedicaments, Les Ulis, France) was incubated in the presence of 20 mM  $\text{FeSO}_4$  and 0.20 M  $\text{H}_2\text{O}_2$ , two agents namely Fenton reaction, for 30 min at 37°C to produce AOPP-FR. The  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration was determined by spectrophotometric technique at 240 nm ( $\epsilon = 43.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) after dilution with distilled deionized water [13].

The HSA (30 mg/mL) was also exposed to 2 mM HOCl for 30 min at 37°C to form AOPP-HOCl. Solutions of HOCl were prepared by diluting commercial sodium hypochlorite in 10 mM sodium hydroxide (NaOH) before use. The hypochlorite concentration was determined spectrophotometrically at 292 nm ( $\epsilon = 350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) after dilution with 10 mM NaOH [14]. Control incubation was performed in unmodified HSA dissolved only in phosphate-buffered saline (PBS). All the samples of AOPPs (AOPP-FR and AOPP-HOCl) were then dialyzed by dialysis tubing cellulose membrane (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) against PBS to remove free oxidants, including  $\text{OH}^\bullet$  and HOCl.

### 2.2 AOPPs determination

The AOPPs concentration was measured by a spectrophotometric assay, as previously described [8]. Briefly, 200  $\mu\text{L}$  of AOPPs (AOPP-FR or AOPP-HOCl) or unmodified HSA were mixed with 20  $\mu\text{L}$  of acetic acid and 10  $\mu\text{L}$  potassium iodide. AOPPs concentrations were measured spectrophotometrically at 340 nm and calibrated versus standard reference containing 200  $\mu\text{L}$  of chloramine-T solutions (0 to 100  $\mu\text{mol/L}$ ), 10  $\mu\text{L}$  of 1.16 mol/L potassium iodide and 20  $\mu\text{L}$  of acetic acid. The content of AOPPs in the stock preparation

(AOPP-FR and AOPP-HOCl) used in all experiments was  $\geq 60 \mu\text{mol/L}$  versus  $5 \mu\text{mol/L}$  in unmodified HSA.

### 2.3 Cell Culture

The human embryonic kidney cells (HEK 293) were obtained from the American Type Culture Collection (Bethesda, MD) and were maintained cultured in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100  $\mu\text{g/mL}$  streptomycin at  $37^\circ\text{C}$  in a 5%  $\text{CO}_2$  humidified incubator. Cells were harvested by gentle scraping and were used when confluence had reached 70%. Then, the cells were exposed to the following treatments: unmodified HSA (800  $\mu\text{g/mL}$ ), as a control group, AOPP-FR (10 - 800  $\mu\text{g/mL}$ ) or AOPP-HOCl (800  $\mu\text{g/mL}$ ) for 30 min.

### 2.4 Investigation of the transcription of inflammatory genes by transfection and Luciferase/ $\beta$ -Galactosidase assays

To investigate the effects of AOPP-FR and AOPP-HOCl on transcription of inflammatory genes, the NF- $\kappa\text{B}$ , COX-2 and IL-6 luciferase promoter activities were analyzed. Briefly, the HEK 293 cells were exposed with unmodified HSA (800  $\mu\text{g/mL}$ ), as a control group, AOPP-FR (10 - 800  $\mu\text{g/mL}$ ) or AOPP-HOCl (800  $\mu\text{g/mL}$ ) for 30 min. The transfection assays were performed using Lipofectamine LTX and Plus Reagent (Invitrogen) and Optimem (Invitrogen) following the supplier's protocols. The different promoter-reporters fusion plasmids (1  $\mu\text{g}$ ) and 60 ng of the pSV40- $\beta$ -galactosidase control vector (Promega) were co-transfected into the HEK 293 cells using 0.75  $\mu\text{L}$  and 0.25  $\mu\text{L}$  of Lipofectamine LTX and Plus Reagent, respectively. Transfected cells were washed twice with PBS, and scraped into luciferase lysis buffer (Promega). Co-transfection with pSV- $\beta$  galactosidase plasmid DNA was carried out to normalize transfection efficiencies in different transfectants and expressed relative to the activity of the control group. The luciferase and  $\beta$ -galactosidase activity assays were performed in a luminometer (TD 20/20, Turner BioSystems) and the results were expressed as fold induction [15]. The COX-2 promoter-luciferase construct pCOX-511, IL-6 promoter-luciferase construct p1168hulL6P-luc+, NF- $\kappa\text{B}$  promoter-luciferase construct pNF- $\kappa\text{B}$ -luc+ (Stratagene), and pSV40- $\beta$ -galactosidase control vector (Promega) were generous gifts from Unidad de Bioquímica-Departament de Ciències Fisiològiques II, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona.

## 2.5 Statistical analysis

All data, expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) from at least three independent experiments, were compared using one-way analyzes of variance (ANOVA) followed by the Tukey post-test.  $P < 0.05$  was considered statistically significant. Statistical analyzes were carried out with GraphPad Prism version 4.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## 3. Results

### 3.1 AOPP-RF increased inflammation-related molecule transcription in cultured HEK 293 cells

As we previously demonstrated, the HSA modified by Fenton reaction may represent one of the pathways for AOPPs formation *in vitro* [5]. The potential of AOPPs (AOPP-FR and AOPP-HOCl) to induce NF- $\kappa$ B, COX-2 and IL-6 gene transcription in HEK 293 cells was comparatively assessed. The  $\beta$ -galactosidase expression vector was used to normalize transfection efficiencies. Luciferase activity was measured after 30 min of AOPPs (AOPP-FR and AOPP-HOCl) treatment in serum-free medium. As shown in Figure 1, luciferase activity from cells transfected with the NF- $\kappa$ B promoter-luciferase construct and treated with AOPP-FR (10, 50, 200, and 800  $\mu$ g/mL) or AOPP-HOCl (800  $\mu$ g/mL) was significantly higher than the unmodified HSA group. In addition, the AOPP-FR (200 and 800  $\mu$ g/mL) and AOPP-HOCl (800  $\mu$ g/mL) induced an increase in luciferase activity in cells transfected with the COX-2 promoter-luciferase construct, indicating an increase in the COX-2 gene transcription (Fig. 2). Stimulation of the cells with AOPP-FR (800  $\mu$ g/mL) and AOPP-HOCl (800  $\mu$ g/mL) also resulted in an increase of induction of luciferase activity for IL-6 transcription compared to cells treated with unmodified HSA (Fig. 3). However, it should be noted that the effects of AOPP-FR (800  $\mu$ g/mL) were significantly higher than the effects of AOPP-HOCl, both in relation to COX-2 ( $4.0 \pm 0.4$  and  $1.7 \pm 0.3$  induction fold for AOPP-FR and AOPP-HOCl, respectively) and IL-6 ( $5.0 \pm 0.1$  and  $2.1 \pm 0.2$  induction fold for AOPP-FR and AOPP-HOCl, respectively).

Please add **Figure 1** here

Please add **Figure 2** here

Please add **Figure 3** here

#### 4. Discussion

This study provides evidence that AOPPs generated from the Fenton reaction induces an activation of the gene transcription of inflammation-related molecules. We have shown at first time that AOPP-FR was able to induce the activation of the gene transcription of NF- $\kappa$ B, COX-2 and IL-6. Our findings emerged from the assumption that the Fenton reaction is also capable of producing AOPPs *in vitro*, as reported previously by our team [5]. Although the HOCl generated via MPO activity may represent the classical and the major pathway for AOPPs formation *in vivo* [4], several studies are linking the generation of this biomarker with other sources of oxidative stress [16-18]. However, the pathways associated to AOPPs formation have not yet been completely elucidated. In addition, it is important to determine the role of the new biologically active substances that are potentially generated through these pathways. Actually, these oxidized proteins are considered as a new class of active substances that are potentially able to contribute to the regulation of the functional activity of immune and non-immune cells at sites of inflammation and serve as inflammatory response modulators [6]. The results obtained in the present study support this hypothesis. Here we demonstrated that the exposure of HEK 293 cells to AOPP-FR promoted the activation of NF- $\kappa$ B, a redox-sensitive transcription factor required for synthesis of some proinflammatory cytokines. In addition, the AOPP-FR induced the increase of the transcription of IL-6 and the COX-2.

Fenton reaction plays a crucial role in both physiological and pathological processes in living organisms [19]. In this context, some studies support the idea that the Fenton reaction occurs *in vivo* [20-22]. Nevertheless, it is not defined whether AOPP-FR may promote cellular perturbations, stimulating the inflammatory responses, as the similar form that AOPP-HOCl. Here, we demonstrated that HSA modified by Fenton reaction, AOPP-FR, was able to activate the transcription of NF- $\kappa$ B. The NF- $\kappa$ B pathway is recognized to be the central mediator of immune responses [23] and is frequently hyperactive in inflammatory diseases [24]. The mechanism of NF- $\kappa$ B pathway activation by AOPP-HOCl is already known [25,26]. In this context, AOPP-HOCl activates the intrarenal renin-angiotensin system in renal tubular epithelial cells mediated by activation of NF- $\kappa$ B [27]. Moreover, AOPP-HOCl inhibites the proliferation and differentiation of rat osteoblast-like cells through the activation of the NF- $\kappa$ B pathway [28]. In agreement with these studies, our results demonstrated that AOPP-HOCl increases the gene transcription of NF- $\kappa$ B in HEK 293 cells.



The expression of interleukins is regulated by several transcription factors, especially NF- $\kappa$ B [29,30]. Given this fact, in our study, we demonstrated that both AOPP-FR and AOPP-HOCl induced an increase in the IL-6 gene transcription. The proinflammatory effect of AOPP-HOCl was already observed. In this context, AOPP-HOCl acts as a major player in RAGE-mediated vascular inflammation and evokes downstream signaling via mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway and the expression of highly proinflammatory mediator, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) [31]. In addition, in an experimental model, the administration of AOPP-HOCl promoted kidney inflammation and the overexpression of MCP-1 and transforming growth factor beta-1 (TGF- $\beta$ 1) in renal tissue [12]. Recently, it was demonstrated that AOPP-HOCl induced the proinflammatory effects in mesangial cells, promoting an increase in MCP-1 expression and activation of NF- $\kappa$ B pathway [32]. Here we showed that both AOPP-FR and AOPP-HOCl were able to induce an increase of COX-2 activation. The COX-2 is an enzyme that catalyzes the first step of the synthesis of prostanoids, related to the pathogenesis of the inflammatory route, being induced in the most tissues by inflammatory cytokines in response to inflammation or tissue damage [33]. Therefore, we speculate that a complex sequence of events may result in activation of NF- $\kappa$ B signaling and induction of the expression of AOPPs target genes (such as IL-6 and COX-2). It is important to note that there were differences in the proportion of the effects caused by AOPP-HOCl and AOPP-FR, and the impact on the expression of both IL-6 and COX-2 were higher in AOPP-FR exposed cells than in AOPP-HOCl exposed cells. Taken together, these findings suggest new highlights, making the AOPP-FR a potential mediator of inflammation.

In summary, AOPP-FR was able to induce the activation of the gene transcription of NF- $\kappa$ B, COX-2 and IL-6 in human embryonic kidney cells. AOPP-FR may represent a novel pathogenic mediator enrolled in the induction of inflammation in kidney. However, further studies using different approaches are required to investigate the effects of AOPP-RF on other inflammatory pathways.

## **Abbreviations**

AOPPs: Advanced oxidation protein products

AOPP-FR: Fenton reaction-generated advanced oxidation protein products

AOPP-HOCl: Hypochlorous acid -generated advanced oxidation protein products

COX-2: Cyclooxygenase-2

HEK 293: Human embryonic kidney cells

HO<sup>•</sup>: Hydroxyl radical

HOC: Hypochlorous acid

HSA: Human serum albumin

IL-6: Interleukin-6

MPO: Myeloperoxidase

NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NF-κB: Nuclear factor-κB

ROS: Reactive oxygen species

## **Acknowledgments**

This study was supported by grants from the CAPES/DGU (BEX 4422/09-0 and 3449/11-4), Brazil, IDIBELL, and the Secretaría de Estado de Universidades, Ministerio de Ciencia e Innovación (PHB2008-0080-PC), Spain. The authors thank CNPq/Brazil and CAPES/Brazil for providing scholarships.

## **Conflicts of Interest**

The authors declare no conflict of interest.

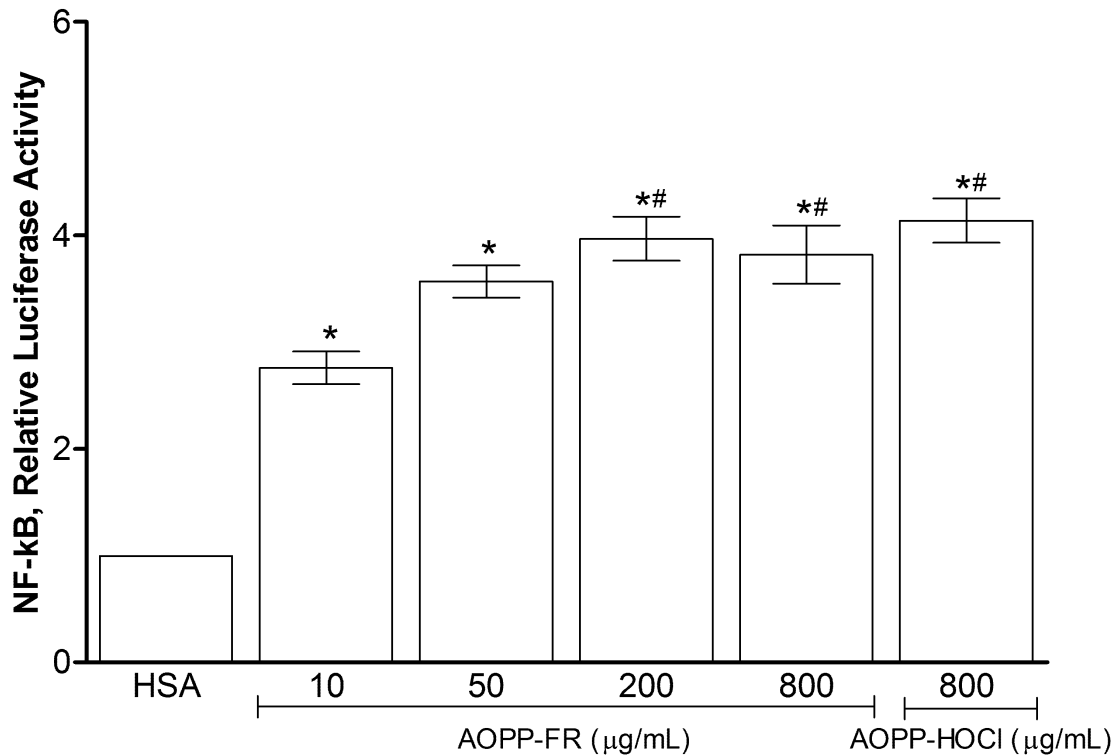
## References

- [1] Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M.T. Cronin, M. Mazur, and J. Telser. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Bio* 39: 44-84.
- [2] Himmelfarb, J., and E. McMonagle. 2001. Albumin is the major plasma protein target of oxidant stress in uremia. *Kidney Int* 60: 358-63.
- [3] Galli, F. 2007. Protein damage and inflammation in uraemia and dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 5: 20-36.
- [4] Capeillère-Blandin, C., V. Gausson, B. Descamps-Latscha, and V. Witko-Sarsat. 2004. Biochemical and spectrophotometric significance of advanced oxidized protein products. *Biochim Biophys Acta* 1689: 91-102.
- [5] Bochi, G.V., V.D. Torbitz, L.P. Cargnin, J.A. de Carvalho, P. Gomes, and R.N. Moresco. 2014. An alternative pathway through the fenton reaction for the formation of advanced oxidation protein products, a new class of inflammatory mediators. *Inflammation* 37: 512-21.
- [6] Gorudko, I.V., D.V. Grigorieva, E.V. Shamova, E.V. Mikhilchik, S.N. Cherenkevich, J. Arnhold, and O.M. Panasencko. 2014. Hypohalous acid-modified human serum albumin induces neutrophil NADPH oxidase activation, degranulation, and shape change. *Free Radic Bio Med* 68: 326-34.
- [7] Rong, G., X. Tang, T. Guo, N. Duan, Y. Wang, L. Yang, J. Zhang, and X. Liang. 2015. Advanced oxidation protein products induce apoptosis in podocytes through induction of endoplasmic reticulum stress. *J Physiol Biochem* 71:455-70.
- [8] Witko-Sarsat, V., M. Friedlander, T. Nguyen Khoa, C. Capeillère-Blandin, A.T. Nguyen, S. Canteloup, J.M. Dayer, P. Jungers, T. Drüeke, and B. Descamps-Latscha. 1998. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol* 161: 2524-32.
- [9] Iwao, Y., K. Nakajou, R. Nagai, K. Kitamura, M. Anraku, T. Maruyama, and M. Otagiri. 2008. CD36 is one of important receptors promoting renal tubular injury by advanced oxidation protein products. *Am J Physiol Renal Physiol* 295: 1871-80.
- [10] Zhou, L.L., W. Cao, C. Xie, J. Tian, Z. Zhou, Q. Zhou, P. Zhu, A. Li, Y. Liu, T. Miyata, F.F. Hou, and J. Nie. 2012. The receptor of advanced glycation end products plays a central role in advanced oxidation protein products-induced podocyte apoptosis. *Kidney Int* 82: 759-70.
- [11] Li, H.Y., F.F. Hou, X. Zhang, P.Y. Chen, S.X. Liu, J.X. Feng, Z.Q. Liu, Y.X. Shan, G.B. Wang, Z.M. Zhou, J.W. Tian, and D. Xie. 2007. Advanced oxidation protein products accelerate renal fibrosis in a remnant kidney model. *J Am Soc Nephrol* 18: 528-38.
- [12] Shi, X.Y., F.F. Hou, H.X. Niu, G.B. Wang, D. Xie, Z.J. Guo, Z.M. Zhou, F. Yang, J.W. Tian, and X. Zhang. 2008. Advanced oxidation protein products promote inflammation in diabetic kidney through activation of renal nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. *Endocrinology* 149: 1829-39.
- [13] Holmes, R.S., and C.J. Masters. 1970. Epigenetic interconversions of the multiple forms of mouse liver catalase. *FEBS Lett* 11: 45-8.
- [14] Morris, J.C. 1966. The acid ionization constant of HOCl from 5 to 35°. *J Phys Chem* 70: 3798-805.

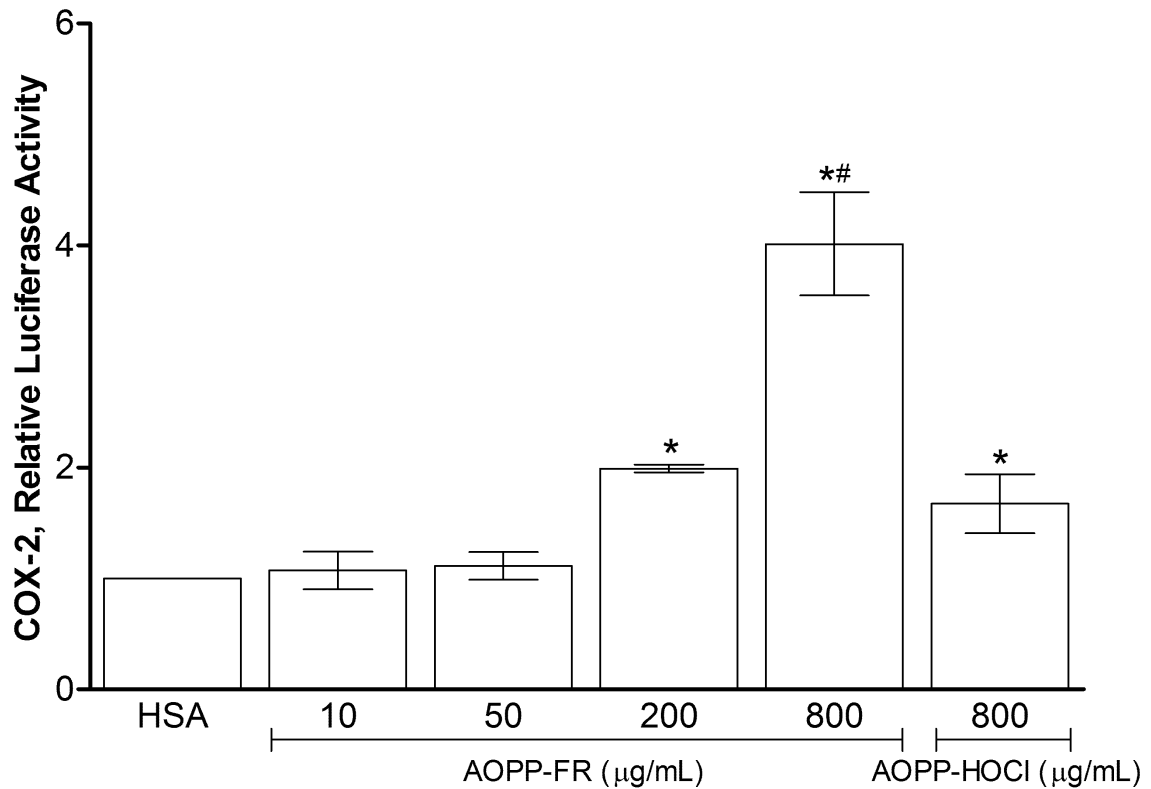
- [15] Duran, J., M. Obach, A. Navarro-Sabate, A. Manzano, M. Gómez, J.L. Rosa, F. Ventura, J.C. Perales, and R. Bartrons. 2009. Pfkfb3 is transcriptionally upregulated in diabetic mouse liver through proliferative signals. *FEBS J* 276: 4555-68.
- [16] Capeillère-Blandin, C., V. Gausson, A.T. Nguyen, B. Descamps-Latscha, T. Drucek, and V. Witko-Sarsat. 2006. Respective role of uraemic toxins and myeloperoxidase in the uraemic state. *Nephrol Dial Transplant* 21: 1555-63.
- [17] Kumbasar, A., M. Gursu, C. Kaya, S. Ozturk, A. Ergen, A. Kemik, Z. Aydin, S. Uzun, S. Karadag, and R. Kazancioglu. 2012. The effect of different doses and types of intravenous iron on oxidative stress and inflammation in hemodialysis patients. *J Nephrol* 25: 825-32.
- [18] Anraku, M., K. Kitamura, R. Shintomo, K. Takeuchi, H. Ikeda, J. Nagano, T. Ko, K. Mera, K. Tomita, and M. Otagiri. 2008. Effect of intravenous iron administration frequency on AOPP and inflammatory biomarkers in chronic hemodialysis patients: a pilot study. *ClinBiochem* 41: 1168-74.
- [19] Prousek, J. 2007. Fenton chemistry in biology and medicine. *Pure and applied Chem* 79: 2325-38.
- [20] Repetto, M.G., N.F. Ferrarotti, and A. Boveris. 2010. The involvement of transition metal ions on iron-dependent lipid peroxidation. *Arch Toxicol* 84: 255-62.
- [21] Gonzalez F.B., S. Llesuy, and A. Boveris. 1993. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic Biol Med* 10: 93-100.
- [22] Chance, B., H. Sies, and A. Boveris. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527-605.
- [23] Pahl, H.L. 1990. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18: 6853-66.
- [24] Gilmore, T.D., and F.S. Wolenski. 2012. NF-κB: where did it come from and why? *Immunol Rev* 246: 14-35.
- [25] Zheng, S., Z.M. Zhong, and S. Qin. 2013. Advanced oxidation protein products induce inflammatory response in fibroblast-like synoviocytes through NADPH oxidase -dependent activation of NF-κB. *Cell Physiol Biochem* 32: 972-85.
- [26] Guo, Z.J., H.X. Niu, F.F. Hou, L. Zhang, N. Fu, R. Nagai, X. Lu, B.H. Chen, Y.X. Shan, J.W. Tian, R.H. Nagaraj, D. Xie, and X. Zhang. 2008. Advanced oxidation protein products activate vascular endothelial cells via a RAGE-mediated signaling pathway. *Antioxid Redox Signal* 10: 1699-712.
- [27] Cao, W., J. Xu, Z.M. Zhou, G.B. Wang, F.F. Hou, and J. Nie. 2013. Advanced oxidation protein products activate intrarenal renin-angiotensin system via a CD36-mediated, redox-dependent pathway. *Antioxid Redox Signal* 18: 19-35.
- [28] Zhong, Z.M., L. Bai, and J.T. Chen. . 2009. Advanced oxidation protein products inhibit proliferation and differentiation of rat osteoblast-like cells via NF-kappaB pathway. *Cell Physiol Biochem* 24: 105-14.
- [29] Cai, D., M. Yuan, D.F. Frantz, P.A. Melendez, L. Hansen, J. Lee, and S.E. Shoelson. 2005. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* 11: 183-90.

- [30] Arkan, M.C., A.L. Hevener, F.R. Greten, S. Maeda, Z.W. Li, J.M. Long, A. Wynshaw-Boris, G. Poli, J. Olefsky, and M. Karin. 2005. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* 11: 191-8.
- [31] Marsche, G., S. Frank, A. Hrzenjak, M. Holzer, S. Dirnberger, C. Wadsack, H. Scharnagl, T. Stojakovic, A. Heinemann, and K. Oettl. 2009. Plasma-advanced oxidation protein products are potent high-density lipoprotein receptor antagonists in vivo. *Circ Res* 104: 750-7.
- [32] Wang, J.C., Y. Zhao, S.J. Chen, J. Long, Q.Q. Jia, J.D. Zhai, Q. Zhang, Y. Chen, and H.B. Long. 2013. AOPPs induce MCP-1 expression by increasing ROS-mediated activation of the NF- $\kappa$ B pathway in rat mesangial cells: inhibition by sesquiterpene lactones. *Cell Physiol Biochem* 32: 1867-77.
- [33] Santos, R.C., R.N. Moresco, M.A. Peña Rico, A.R. Susperregui, J.L. Rosa, R. Bartrons, F. Ventura, D.N. Mário, S.H. Alves, E. Tatsch, H. Kober, R.O. de Mello, P. Scherer, and J.R. de Oliveira. 2012. Fructose-1,6-bisphosphate protects against Zymosan-induced acute lung injury in mice. *Inflammation* 35: 1198-203.

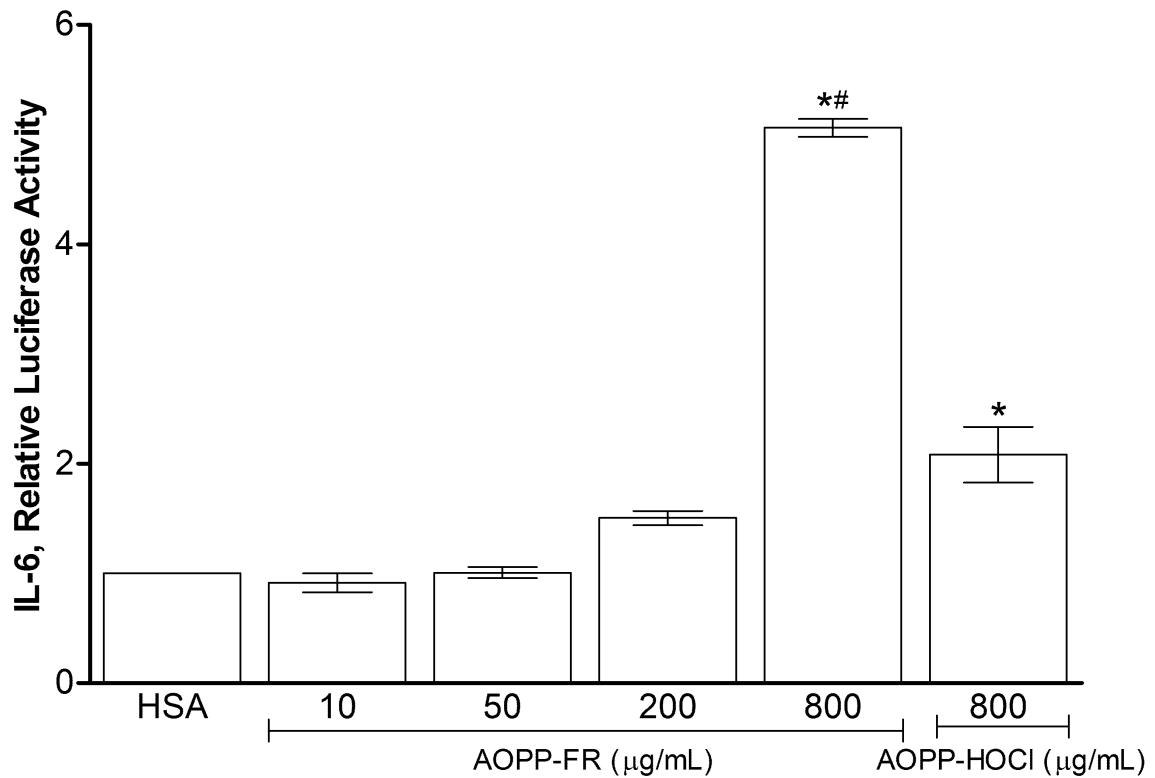
## Figure Captions



**Figure 1.** The effect of unmodified and modified HSA (AOPP-FR and AOPP-HOCl) to induce NF- $\kappa$ B (A), COX-2 (B), IL-6 (C) gene transcription activation in HEK 293 cells by promoter-luciferase transfection assay. The HEK 293 cells were exposed with unmodified HSA (800  $\mu$ g/mL), as a control group, AOPP-FR (10 - 800  $\mu$ g/mL) or AOPP-HOCl (800  $\mu$ g/mL) for 30 min. The transfection assays were performed using Lip-ofectamine LTX and Plus Reagent (Invitrogen) and Optimem (Invitrogen) following the supplier's protocols. The induction fold was determined and the luciferase activity was normalized to the  $\beta$ -galactosidase activity. The data are expressed as the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. \*P < 0.05 vs. HSA group; #P < 0.01 vs. AOPP-FR (10  $\mu$ g/mL) and AOPP-FR (200  $\mu$ g/mL) groups.



**Figure 2.** The effect of unmodified and modified HSA (AOPP-FR and AOPP-HOCl) to induce COX-2 activation in HEK 293 cells by promoter–luciferase transfection assay. The HEK 293 cells were exposed with unmodified HSA (800 µg/mL), as a control group, AOPP-FR (10 - 800 µg/mL) or AOPP-HOCl (800 µg/mL) for 30 min. The transfection assays were performed using Lip-ofectamine LTX and Plus Reagent (Invitrogen) and Optimem (Invitrogen) following the supplier's protocols. The induction fold was determined and the luciferase activity was normalized to the β-galactosidase activity. The data are expressed as the mean ± SEM of 3 independent experiments. \*P < 0.05 vs. HSA group; #P < 0.001 vs. AOPP-FR (10, 50 and 200 µg/mL) and AOPP-HOCl (800 µg/mL) groups.



**Figure 3.** The effect of unmodified and modified HSA (AOPP-FR and AOPP-HOCl) to induce IL-6 activation in HEK 293 cells by promoter–luciferase transfection assay. The HEK 293 cells were exposed with unmodified HSA (800 µg/mL), as a control group, AOPP-FR (10 - 800 µg/mL) or AOPP-HOCl (800 µg/mL) for 30 min. The transfection assays were performed using Lip-ofectamine LTX and Plus Reagent (Invitrogen) and Optimem (Invitrogen) following the supplier's protocols. The induction fold was determined and the luciferase activity was normalized to the  $\beta$ -galactosidase activity. The data are expressed as the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. \*P < 0.001 vs. HSA group; #P < 0.001 vs. AOPP-FR (10, 50 and 200 µg/mL) and AOPP-HOCl (800 µg/mL) groups.



### 4.3 ARTIGO CIENTÍFICO III

#### ***In vitro* oxidation of collagen promotes the formation of advanced oxidation protein products and the activation of human neutrophils**

Guilherme Vargas Bochi, Vanessa Dorneles Torbitz, Luízi Prestes de Campos, Manuela Borges Sangoi, Natieli Flores Fernandes, Patrícia Gomes, Maria Beatriz Moretto, Fernanda Barbisan, Ivana Beatrice Mânica da Cruz, Rafael Noal Moresco

Publicado no Periódico: **Inflammation**

Inflammation. 2016 Apr;39(2):916-27. doi: 10.1007/s10753-016-0325-3.

***In vitro* oxidation of collagen promotes the formation of advanced oxidation protein products and the activation of human neutrophils**

Guilherme Vargas Bochi<sup>1,2</sup>, Vanessa Dorneles Torbitz<sup>1,3</sup>, Luízi Prestes de Campos<sup>1</sup>, Manuela Borges Sangoi<sup>1,3</sup>, Natieli Flores Fernandes<sup>1</sup>, Patrícia Gomes<sup>4</sup>, Maria Beatriz Moretto<sup>2,3</sup>, Fernanda Barbisan<sup>5</sup>, Ivana Beatrice Mânica da Cruz<sup>5</sup>, Rafael Noal Moresco<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Research Laboratory of Clinical Biochemistry, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Health Sciences Center, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

<sup>2</sup>Pharmacology Postgraduate Program, Health Sciences Center, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

<sup>3</sup>Pharmaceutical Sciences Postgraduate Program, Health Sciences Center, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

<sup>4</sup>Nanosciences Postgraduate Program, Franciscan University Center, Santa Maria, Brazil

<sup>5</sup>Biogenomic Laboratory, Department of Morphology, Health Science Center, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

\*Corresponding Author: Rafael Noal Moresco

Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Avenida Roraima 1000, Prédio 26, Sala 1401, Camobi 97105-900, Santa Maria-RS, Brasil.

Tel.: +55 55 32208941; Fax: +55 55 32208018

E-mail: rnmoresco@ufsm.br

**Abstract**

The accumulation of advanced oxidation protein products (AOPPs) has been linked to several pathological conditions. Here, we investigated collagen as a potential source for AOPP formation and determined the effects of HOCl-treated collagen (collagen-AOPPs) on human neutrophil activity. We also assessed whether alpha-tocopherol could counteract these effects. Exposure to HOCl increased the levels of collagen-AOPPs. Collagen-AOPPs also stimulated the production of AOPPs, nitric oxide (NO), superoxide radicals ( $O_2^-$ ), and HOCl by neutrophils. Collagen-AOPPs induced apoptosis and decreased the number of viable cells. Alpha-tocopherol prevented the formation of collagen-AOPPs, strongly inhibited the collagen-AOPP-induced production of  $O_2^-$  and HOCl, and increased the viability of neutrophils. Our results suggest that collagen is an important protein that interacts with HOCl to form AOPPs, and consequently, collagen-AOPP formation is related to human neutrophil activation and cell death.

**Keywords:** Advanced oxidation protein products; Collagen; Hypochlorous acid; Inflammation; Mediators; Neutrophils

## 1. Introduction

Protein oxidation is a common process during inflammation, and both acute and chronic diseases are associated with increased protein modification. Oxidative modifications of collagen, which is the most abundant protein in the extracellular matrix, are particularly important [1]. These modifications are characterized by the non-enzymatic binding of reactive products and subsequent molecular rearrangements, which have critical effects on protein structural and functional properties [2]. There are several types of oxidative protein modifications, and new compounds with modified structures can be formed as a result. In particular, advanced oxidation protein products (AOPPs), new markers of protein oxidation, have attracted recent attention. Elevated levels of AOPPs have been detected in subjects with coronary artery disease, diabetes, and uremia [3-8]. Myeloperoxidase (MPO)-derived chlorinated oxidants produced by activated neutrophils contribute significantly to AOPP formation, and human serum albumin (HSA) is considered the main protein responsible for the generation of AOPPs [8]. However, the molecular composition of AOPPs is unclear. Additional pathways and protein targets for AOPP formation are largely unknown [9-12].

Oxidant-modified proteins are sensitive markers for oxidative stress; they are involved in various cell functions and act as mediators of inflammation. In the inflammatory process, neutrophil activation is accompanied by the degranulation and formation of a spectrum of aggressive oxidants, including hypochlorous acid (HOCl) [10] and superoxide ( $O_2^-$ ) [13]. Nitric oxide (NO), another cellular mediator of humoral factors, plays a central role in the pathogenesis of diverse inflammatory and infectious disorders [14]. Human neutrophils produce NO spontaneously [15] or after activation [16], and both inducible and constitutive isoforms of nitric oxide synthase (NOS) have been purified from human neutrophils [17]. Studies have examined antioxidants with promising features for the treatment of diseases related to oxidative damage and inflammation. For example, vitamin E (alpha-tocopherol) is an important lipophilic chain-breaking antioxidant and is essential for oxidant scavenging in various tissues and cells [18].

AOPPs are a family of heterogeneous compounds with diverse structural modifications [8] and collagen represents an important target for cumulative posttranslational modifications [1]. Accordingly, we hypothesized that collagen modification is an important factor in the generation of AOPPs. In this study, we investigated collagen as a potential source of AOPPs via its exposure to HOCl. Additionally, we characterized the effects of HOCl-modified collagen (collagen-AOPPs) on human neutrophil activity and examined whether these effects can be counteracted by alpha-tocopherol.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Chemicals and reagents

Collagen was obtained from DEG (São Paulo, Brazil). Potassium iodide (KI), ethanol, and acetic acid were purchased from Vetec Química (Rio de Janeiro, Brazil). Alpha-tocopherol was obtained from Inventiva<sup>®</sup> (Porto Alegre, Brazil) and was dissolved in 20% ethanol to prepare a stock solution of 10 mM. The final concentration of ethanol in the experimental milieu was 1%. HSA was obtained from LFB Biomedicaments (Les Ulis, France). All other chemicals were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), including chloramine-T, dextran, Histopaque-1077, sodium nitrate, nitroblue tetrazolium (NBT), sulfanilamide, *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride, and zymosan. HOCl solutions were prepared by diluting commercial sodium hypochlorite in 10 mM sodium hydroxide (NaOH) before use. The HOCl concentration was determined spectrophotometrically at 292 nm ( $\epsilon = 350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) [19]. All experiments were performed in 50 mM phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4.

### 2.2 Preparation of collagen-AOPPs and determination of AOPP concentration

Under *in vitro* conditions, collagen was exposed to HOCl to produce collagen-AOPPs. The reaction was performed in the absence of free carbohydrates and lipids to prevent the formation of advanced glycation end-product (AGE)-like structures. Prepared samples were dialyzed in cellulose membrane tubing (Sigma Chemical Co.) against PBS to remove free HOCl. The incubation conditions were based on a previous study conducted by our team [20]. Briefly, collagen (1.0 mg/mL) was incubated at 37 °C for 30 min in the presence of various HOCl concentrations, ranging from 0.4 to 2.0 mM. A control collagen sample was incubated without HOCl (unmodified collagen). The concentrations of HOCl were selected to mimic *in vivo* levels [21] based on previous studies [22, 23]. The effect of collagen concentration on the level of collagen-AOPPs induced by HOCl was evaluated by a concentration-effect curve. Briefly, collagen (0.1, 0.3, and 1.0 mg/mL) was incubated at 37 °C for 30 min with 2.0 mM HOCl or PBS as a control. Collagen was also exposed to 10 mM NaOH as a control solvent for the HOCl solution. AOPP concentrations were measured using a spectrophotometric assay, as previously described [24]. Briefly, 200  $\mu\text{L}$  of collagen-AOPPs or collagen preparation in PBS was mixed with 20  $\mu\text{L}$  of acetic acid. AOPP concentrations were measured spectrophotometrically at 340 nm and calibrated using a standard reference containing 200  $\mu\text{L}$  of chloramine-T solutions (0 to 100  $\mu\text{mol/L}$ ), 10  $\mu\text{L}$  of 1.16 mol/L

potassium iodide, and 20  $\mu\text{L}$  of acetic acid. The concentrations of AOPPs in the collagen-AOPPs and unmodified collagen were expressed in  $\mu\text{mol/L}$ .

### 2.3 Effect of alpha-tocopherol on AOPP formation

The impact of alpha-tocopherol on the levels of collagen-AOPPs induced by HOCl was evaluated by a concentration-effect curve. Briefly, collagen was incubated at 37 °C for 30 min with alpha-tocopherol (0.1 to 0.4 mM) and with 2 mM HOCl or PBS. These incubation conditions were previously standardized by our team [20]. The collagen was also exposed to ethanol (final concentration of 1%) as a control solvent instead of alpha-tocopherol. AOPP concentrations were measured using a spectrophotometric assay, as described previously [24].

### 2.4 Isolation of human neutrophils

Peripheral blood was obtained from healthy adult volunteers, after informed consent was obtained, and collected in sterile vacuum tubes containing citrate as an anticoagulant. Neutrophils were prepared as previously described [26] using a Ficoll-Histopaque density centrifugation method, and the cells were suspended at  $2.0 \times 10^6$  cells/mL in Hanks' balanced salt solution. The isolation procedure was performed at room temperature. Neutrophil viability in the cell preparations was  $\geq 95\%$  as determined by a microscopic examination using the trypanblue exclusion test. Replicate experiments were performed using neutrophils from different donors. The study was conducted in accordance with relevant guidelines and approved by the Institutional Ethics Review Board of Human Studies (number 33649514.7.0000.5346).

### 2.5 Generation of AOPPs, NO metabolites, $\text{O}_2^-$ , and HOCl by neutrophils

To examine the effect of collagen-AOPPs on neutrophils, a suspension of neutrophils was incubated at 37 °C for 1 h with different concentrations of *in vitro*-prepared collagen-AOPPs or unmodified collagen. In the neutrophil experiments, concentrations of *in vitro*-prepared collagen-AOPPs were adjusted by diluting the 1.0 mg/mL collagen solution in 2 mM HOCl to final concentrations described below. Neutrophils ( $2.0 \times 10^6$  cells/mL) were treated with PBS (as a control group), unmodified collagen (200  $\mu\text{g/mL}$ ), or collagen-AOPPs (50–200  $\mu\text{g/mL}$ ) in a final volume of 700  $\mu\text{L}$ . AOPPs generated by the neutrophils in the supernatant were determined using the spectrophotometric technique [24]. NO production was determined based on the accumulation of nitrites and nitrates (NO metabolites; NO<sub>x</sub>) in the supernatant using the Griess reaction as previously described [27]. Briefly, 50  $\mu\text{L}$  of the

supernatant was mixed with 50  $\mu\text{L}$  of vanadium (III) chloride (8.0 mg/mL) to reduce nitrate to nitrite. Subsequently, Griess reagents were added and absorbance was read at 550 nm following a 30 min incubation at 37 °C. A linear standard curve, established using 0 to 400  $\mu\text{mol/L}$  sodium nitrate, was used to determine the concentration of NO<sub>x</sub> in the supernatant [27]. Production of intracellular O<sub>2</sub><sup>-</sup> by neutrophils was assayed using a colorimetric method based on the formation of formazan (NBTH<sub>2</sub>) following a reaction between nitroblue tetrazolium (NBT) chloride and O<sub>2</sub><sup>-</sup> [28]. Briefly, after incubation with 1.0 mg/mL NBT at 37 °C for 3 h, neutrophils were pelleted by centrifugation at 500  $\times g$  for 10 min, and cell pellets were incubated with dimethyl sulfoxide at 37 °C for 20 min to dissolve water-insoluble formazan crystals. The absorbance of samples was measured at 550 nm using dimethyl sulfoxide as a blank. The production of HOCl by neutrophils was monitored by reading the absorbance of cell supernatant media at 292 nm ( $\epsilon = 350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) using a spectrophotometer [29]. For all assays, neutrophils exposed to non-opsonized zymosan (500  $\mu\text{g/mL}$ ) and maintained under the same incubation conditions were used as the positive control. Zymosan is an insoluble cell-wall component from *Saccharomyces cerevisiae*, and its non-opsonized form is widely used as an inducer of respiratory burst in phagocytes [30].

Neutrophils were exposed to alpha-tocopherol (0.4 mM) to examine its effect on AOPPs generation and the collagen-AOPP-induced NO<sub>x</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, and HOCl. Briefly, neutrophils ( $2.0 \times 10^6$  cells/mL) were incubated at 37 °C for 1 h with collagen-AOPPs (200  $\mu\text{g/mL}$ ) or unmodified collagen (200  $\mu\text{g/mL}$ ), along with PBS or alpha-tocopherol (0.4 mM).

## 2.6 Assessment of cell viability

Cytotoxicity of collagen-AOPPs toward neutrophils was assessed. The activity of lactate dehydrogenase (LDH) released into the supernatant was measured using a commercial diagnostic kit according to the manufacturer's instructions and results were expressed in U/mL. A trypan blue exclusion assay was also performed to determine cell viability at different exposure times (immediately, 2 h, and 4 h after exposure to collagen-AOPPs).

To examine the impact of alpha-tocopherol on cell viability, neutrophils were treated with alpha-tocopherol as described above. The activity of LDH released into the supernatant was measured immediately after the incubation period. A trypan blue exclusion assay was performed at different times post-exposure (immediately, 2 h, and 4 h after collagen-AOPPs and alpha-tocopherol treatment).

### 2.7 Flow cytometric analysis of apoptotic cells

The effect of collagen-AOPPs on apoptosis in neutrophils was evaluated by flow cytometry using the FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) per the manufacturer's instructions. Briefly, a suspension of neutrophils ( $1.0 \times 10^5$  cells/mL) was incubated at 37 °C for 1 h with collagen-AOPPs (200 µg/mL) or unmodified collagen. Cells exposed to PBS without collagen were used as an additional control group. Neutrophils exposed to non-opsonized zymosan (500 µg/mL) under the same incubation conditions were used as a positive control. The externalization of phosphatidylserine was determined by a flow cytometric analysis using an Annexin V-FITC conjugate (Invitrogen). Additionally, propidium iodide (PI) staining was used to distinguish early apoptotic cells from late apoptotic and necrotic neutrophils. Cell populations were determined as live cells (Annexin V<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>; lower left quadrant), early apoptotic cells (Annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>; lower right quadrant), late apoptotic cells (Annexin V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>; upper right quadrant), or necrotic cells (Annexin V<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup>; upper left quadrant).

Neutrophils were treated with alpha-tocopherol (0.4 mM) as described above and subjected to the Annexin V/PI flow cytometric analysis to examine alpha-tocopherol's effect on cell apoptosis. Briefly,  $2 \times 10^6$  cells/mL were incubated for 1 h at 37 °C with collagen-AOPPs (200 µg/mL) or unmodified collagen (200 µg/mL) along with PBS or alpha-tocopherol (0.4 mM). The experiment was conducted in triplicate.

### 2.8 Statistical analysis

All experiments were repeated at least three times. The data were normally distributed according to a Kolmogorov-Smirnov test. All data were expressed as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM), and were compared using a one-way analysis of variance, followed by Tukey's post-hoc test for multiple comparisons. All P-values are two-tailed, and  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## 3. Results

### 3.1 Collagen-AOPP formation was induced by HOCl and reduced by alpha-tocopherol

The effect of HOCl on the formation of collagen-AOPPs was assessed. As shown in Figure 1A, treatment of collagen with HOCl induced a concentration-dependent increase in AOPP levels compared with that in unmodified collagen (PBS). The AOPP concentration for collagen exposed to 2.0 mM HOCl was  $340.8 \pm 15.8$  µmol/L as compared to  $10.6 \pm 2.3$



$\mu\text{mol/L}$  for unmodified collagen. To investigate whether the increase in AOPP formation was dependent on the concentration of collagen, we evaluated its concentration-effect curve. Incubation of 0.1, 0.3, and 1.0 mg/mL collagen with 2.0 mM HOCl resulted in a concentration-dependent increase in AOPP levels (Fig. 1B). Treatment with 2.0 mM HOCl was the most effective to induce collagen-AOPP formation; accordingly, we selected this concentration to examine the effect of alpha-tocopherol on collagen-AOPP formation. Incubation of collagen with alpha-tocopherol (0.4 mM) significantly reduced the formation of collagen-AOPPs ( $P < 0.001$ , Fig. 1C). At an alpha-tocopherol concentration of 0.4 mM, collagen-AOPP formation was reduced by more than 45%. Collagen was also exposed to ethanol (final concentration of 1%) as a control solvent. Ethanol did not induce collagen-AOPP formation and had no combined effect with HOCl.

### *3.2 Alpha-tocopherol inhibited the oxidative response in neutrophils stimulated by collagen-AOPPs*

Importantly, collagen-AOPPs induced a concentration-dependent increase in AOPP formation in human neutrophils (Fig. 2A). The production of AOPPs by neutrophils was assessed by incubating cells ( $2 \times 10^6$  cells/mL) with increasing concentrations of collagen-AOPPs (50–200  $\mu\text{g/mL}$ ) at 37 °C for 1 h. AOPP levels differed significantly between neutrophils treated with collagen-AOPPs ( $19.3 \pm 2.5 \mu\text{mol/L}$ ) and cells treated with unmodified collagen ( $6.0 \pm 1.7 \mu\text{mol/L}$ ) ( $P < 0.05$ ). Unexpectedly, non-opsonized zymosan (500  $\mu\text{g/mL}$ ) did not affect the generation of AOPPs by neutrophils. The effect of collagen-AOPPs on NO<sub>x</sub> production by neutrophils is summarized in Figure 2B. As expected, as the concentration of collagen-AOPPs increased (50–200  $\mu\text{g/mL}$ ), NO<sub>x</sub> production by neutrophils increased in a dose-dependent manner. The NO<sub>x</sub> levels were  $72.1 \pm 3.6 \mu\text{mol/L}$  for neutrophils treated with collagen-AOPPs (200  $\mu\text{g/mL}$ ) and  $30.3 \pm 3.7 \mu\text{mol/L}$  for cells treated with unmodified collagen ( $P < 0.05$ ). Zymosan, used as an inflammation inducer, also increased the NO<sub>x</sub> levels generated by neutrophils ( $89.9 \pm 13.2 \mu\text{mol/L}$ ,  $P < 0.01$ ). The effect of collagen-AOPPs on O<sub>2</sub><sup>-</sup> production by neutrophils is shown in Figure 2C. Collagen-AOPPs (200  $\mu\text{g/mL}$ ) significantly increased the production of O<sub>2</sub><sup>-</sup> by neutrophils. Zymosan also increased the O<sub>2</sub><sup>-</sup> levels ( $P < 0.01$ ). Based on the HOCl production, collagen-AOPPs appeared to be pro-oxidative in human neutrophils (Fig. 2D). Neutrophils stimulated with collagen-AOPPs (200  $\mu\text{g/mL}$ ) produced significantly more HOCl than cells treated with unmodified collagen ( $0.521 \pm 0.048 \text{ mmol/L}$  vs.  $0.197 \pm 0.042 \text{ mmol/L}$ , respectively;  $P <$

0.01). Zymosan also increased the HOCl levels generated by neutrophils ( $0.510 \pm 0.108 \mu\text{mol/L}$ ,  $P < 0.01$ ).

The effect of alpha-tocopherol in the presence of  $200 \mu\text{g/mL}$  collagen-AOPPs is summarized in Figure 3. In this experiment, neutrophils were incubated with collagen-AOPPs or unmodified collagen, in the absence or presence of alpha-tocopherol. Our results indicated that alpha-tocopherol ( $0.4 \text{ mM}$ ) did not significantly affect the release of AOPPs generated by collagen-AOPP-stimulated neutrophils ( $P = 0.176$ ). However, there was a tendency for alpha-tocopherol to reduce AOPP release (Fig. 3A). Treatment of collagen-AOPP-stimulated neutrophils with alpha-tocopherol also failed to suppress NOx production. NOx levels did not differ significantly between neutrophils stimulated with  $200 \mu\text{g/mL}$  collagen-AOPPs in the presence of alpha-tocopherol ( $62.0 \pm 11.0 \mu\text{mol/L}$ ) and those stimulated with  $200 \mu\text{g/mL}$  collagen-AOPPs in the absence of alpha-tocopherol ( $72.1 \pm 3.6 \mu\text{mol/L}$ ) (Fig. 3B,  $P = 0.434$ ). However, as shown in Figure 3C,  $0.4 \text{ mM}$  alpha-tocopherol significantly inhibited  $\text{O}_2^-$  production in neutrophils stimulated with collagen-AOPPs ( $P = 0.028$ ). In addition, HOCl production was inhibited by alpha-tocopherol ( $P = 0.007$ ), as demonstrated in Figure 3D.

### 3.3 Alpha-tocopherol prevented cell death induced by collagen-AOPPs

To assess collagen-AOPP-induced cytotoxicity in neutrophils, we examined the effects of unmodified and modified collagen on LDH release. Our results indicated that collagen-AOPPs had no effect on LDH activity in the neutrophils supernatant, and no significant difference was observed among treatment groups (Table 1). Considering that HOCl may inactivate LDH [31], we next investigated the cytotoxicity of collagen-AOPPs using a trypan blue exclusion assay. As shown in Figure 4B and C, following 2 or 4 h of incubation with collagen-AOPPs, there was a significant reduction in the number of viable cells ( $P = 0.011$  and  $0.004$ , respectively). Zymosan also reduced the number of viable cells after 2 or 4 h of incubation. We also performed a trypan blue exclusion assay after cells were incubated with collagen-AOPPs in the absence or presence of alpha-tocopherol for 4 h. Neutrophils treated with collagen-AOPPs in the presence of  $0.4 \text{ mM}$  alpha-tocopherol showed significantly higher viability than those treated with collagen-AOPPs only ( $86.3 \pm 1.6\%$  vs.  $74.5 \pm 2.6\%$  cell viability, respectively;  $P < 0.001$ ), as shown in Figure 4D.

We also evaluated the apoptosis marker Annexin V using a flow cytometry analysis to quantify the number of apoptotic cells (Fig. 5). Viable cells were Annexin V-negative and PI-negative (lower left quadrant). Early apoptotic cells (lower right quadrant) and late apoptotic

cells (upper right quadrant) were identified as Annexin V-positive and PI-negative, and as Annexin V-positive and PI-positive, respectively. Apoptotic events increased in neutrophils treated with collagen-AOPPs (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). The number of apoptotic neutrophils in the collagen-AOPP-treated group was 19-fold that in the group exposed to PBS ( $P < 0.0001$ ). Similarly, zymosan promoted apoptosis in neutrophils. In addition, the number of apoptotic events in neutrophils treated with alpha-tocopherol (0.4 mM) was significantly lower than that in cells exposed to collagen-AOPPs only (apoptosis fold inductions of  $14.8 \pm 0.4$  vs.  $18.9 \pm 0.6$ , respectively;  $P < 0.05$ ). Representative flow cytometry plots from three independent experiments are included in Figure 5A–E. Fluorescence index (MFI) from a representative experiment, plotted as the apoptosis fold change for each treatment group is shown in Figure 5F.

Please add **Figure 1** here

Please add **Figure 2** here

Please add **Figure 3** here

Please add **Table 1** here

Please add **Figure 4** here

Please add **Figure 5** here

#### 4. Discussion

We have provided evidence that collagen is a potential target of HOCl to form AOPPs, and that chlorinated collagen formed *in vitro* (i.e., collagen-AOPPs) stimulates an oxidative response in human neutrophils. Our findings are consistent with the premise that biological macromolecules, especially proteins modified by halogenated oxidants, function in cell signaling pathways and regulate cell functions. Halogenated proteins are a new class of biologically active substances that may have a regulatory role in the functional activity of immune cells at inflammatory sites and function as inflammatory modulators [10]. The results of the present study support this hypothesis. We demonstrated that collagen modified by HOCl increased collagen-AOPP levels in a dose-dependent manner and that these products induced the generation of AOPPs, NO<sub>x</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, and HOCl by human neutrophils. We also observed that collagen-AOPPs decreased neutrophil viability. Additionally, alpha-tocopherol may modulate oxidative responses induced by collagen-AOPPs in human neutrophils.

Proteins are the major targets for oxidative damage *in vivo* due to their relative abundance and ability to scavenge reactive species that are generated during oxidative stress [12]. HOCl reacts rapidly with amino acids and proteins to form low molecular-weight proteins and chloramines [33], and causes extensive collagen fragmentation [34] and aggregation [35]. These findings suggested that HOCl modifies amino acid side chains, secondary structures, and aggregate types. Albumin is the major target of HOCl oxidation [8] and AOPPs are typically formed from this reaction in a similar manner both *in vivo* and *in vitro*. However, the molecular composition of AOPPs is unresolved, and little is known about the propensity for other proteins to form AOPPs [11, 12]. In the current study, we demonstrated that treatment of collagen with HOCl induced an increase in AOPP levels, and this was dependent on the concentrations of both HOCl and collagen. These findings suggest that collagen, the most abundant protein in the extracellular matrix, is a potentially important protein involved in AOPP formation.

Interestingly, oxidant-modified proteins are known to play significant roles in the pathogenesis of inflammatory diseases. A number of cellular processes and enzymes are capable of generating oxidants *in vivo* that alter protein structure. Inflammatory cells, including neutrophils generate reactive oxidants, such as  $O_2^-$ , hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), hydroxyl radicals ( $\cdot OH$ ), HOCl, and NO, which are involved in acute and chronic inflammation [35]. For example, HOCl-modified HSA can trigger an oxidative burst in neutrophils and monocytes, which act as mediators of inflammatory and oxidative stress [4, 10]. However, knowledge on the functional consequences of collagen modification by HOCl, such as the effects on the activity of neutrophils and other cell types, is limited. In our study, collagen-AOPPs stimulated the production of oxidants and inflammatory molecules, i.e., AOPPs, NO,  $O_2^-$ , and HOCl, by neutrophils *in vitro*. NO derived from NOS isoforms, especially the inducible NOS, is known to regulate several neutrophil functions, including chemotaxis, adhesion, aggregation, apoptosis, and neutrophil-mediated bacterial killing or tissue damage [36, 37]. Collagen-AOPPs induced the generation of  $O_2^-$  and HOCl. The concentration of HOCl *in vivo* is estimated to be 0.01 to 0.25 mM [21]. In particular, HOCl level in the vicinity of activated neutrophils is approximately 0.1 mM or higher [38], and is estimated to reach 5 mM [39]. In the current study, collagen (1.0 mg/mL) was exposed to HOCl at concentrations ranging from 0.4 to 2.0 mM to verify the formation of collagen-AOPPs. Neutrophils stimulated with collagen-AOPPs (200  $\mu g/mL$ ) produced approximately 0.52 mM HOCl and cells treated with unmodified collagen produced approximately 0.19 mM HOCl.

Next, we evaluated the effect of collagen-AOPPs on neutrophil viability. In circulation, human neutrophils have a relatively short lifespan, i.e., approximately less than 24 h before undergo spontaneous apoptosis [40]. However, the viability of neutrophils can be modulated by several factors, including cytokines and others mediators released during their recruitment to the inflammatory site [40]. In particular, the production of oxidants, especially those produced by NADPH oxidase, accelerates the apoptotic program [41]. In this study, collagen-AOPPs stimulated neutrophil apoptosis and reduced cell viability. Indeed, previous studies have demonstrated that AOPPs are capable of inducing apoptosis in various cell types [6, 42]. Therefore, increased oxidant production observed in collagen-AOPP-treated neutrophils may be associated with increased apoptosis and decreased cell viability. Thus, we propose that collagen-AOPPs interact with neutrophils, possibly via membrane receptors, and induce the production of oxidants, including  $O_2^-$  and HOCl, and mediators involved in inflammation and apoptosis, including AOPPs and NO.

Integrins are important signal transducers for virtually all neutrophil functions. Integrins transmit signals from the extracellular environment and initiate cellular responses; for example, they are involved in cell motility, growth and differentiation, cell survival, and specialized functions, such as degranulation and oxidant production in immune cells [43, 44]. AOPPs activate  $H_2O_2$  generation by neutrophils and MPO exocytosis via the  $\beta 2$  integrin signaling [10]. Integrins permit cell adhesion to extracellular matrix proteins and to other cells, thereby coordinate ligand-specific responses to the extracellular environment. Accordingly, we suggest that the signaling events associated with collagen-AOPP-mediated activation of neutrophils may be dependent on integrins.

Vitamin E is a naturally occurring lipophilic antioxidant that possesses a number of biological functions that are relevant to the prevention and therapy of diseases associated with inflammation and aging [45]. Vitamin E is a generic term for lipid-soluble compounds called tocopherols and tocotrienols. They possess antioxidant properties, including protective effects against conditions associated with oxidative stress and inflammatory diseases [46]. These effects are often attributed to the ability of these compounds to scavenge reactive oxygen and nitrogen species and to suppress radical-chain propagation reactions [47]. However, vitamin E can also exert an important antioxidant role via the activation of inflammatory cells, such as neutrophils and monocytes, which are important sources of oxidants, such as  $O_2^-$  and  $H_2O_2$  [48, 49]. We demonstrated that alpha-tocopherol significantly prevented HOCl-induced damage and consequently reduced the formation of collagen-AOPPs *in vitro*. Interestingly, a recent study suggested that strategies aimed at reducing AOPP accumulation are a potential

therapeutic intervention [50]. Our results indicate that alpha-tocopherol is a candidate to prevent the direct oxidation of collagen induced by HOCl. In neutrophils, alpha-tocopherol (0.4 mM) strongly inhibited the collagen-AOPP-induced production of  $O_2^-$  and HOCl. Additionally, alpha-tocopherol inhibited apoptosis, decreased the cytotoxic effect of collagen-AOPPs, and increased the number of viable neutrophils. Based on our results, we believe that alpha-tocopherol increases neutrophil viability by reducing the production of oxidants, including  $O_2^-$  and HOCl.

To summarize, our findings suggest that collagen is an important source of AOPPs, which mediate inflammatory processes. Some limitations of our study should be acknowledged. First, we were unable to assess cytokine production in neutrophils stimulated by collagen-AOPPs. Secondly, we did not directly assess MPO activity. The impact of collagen-AOPPs on cytokine production and the role of MPO should be investigated in future studies. However, we did evaluate other markers to verify neutrophils activation. Accordingly, this study provides new insight into the mechanism of neutrophil activation in response to HOCl-modified collagen, which may facilitate the identification of novel targets for anti-oxidative and anti-inflammatory therapy.

### **Acknowledgments**

This study was supported by scholarships from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq/Brazil) and the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES/Brazil).

### **Declaration of Interest**

There are no conflicts of interest to declare.

## References

- [1] Nowotny, K., and T. Grune. 2014. Degradation of oxidized and glycoxidized collagen: role of collagen cross-linking. *Arch Biochem Biophys* 542: 56-64.
- [2] Černý, M., J. Skalák, H. Cerna, and B. Brzobohatý. 1996. Advances in purification and separation of posttranslationally modified proteins. *J Proteomics* 92: 2-27.
- [3] Witko-Sarsat, V., M. Friedlander, C. Capeillère-Blandin, T. Nguyen-Khoa, A.T. Nguyen, J. Zingraff, P. Jungers, and B. Descamps-Latscha. 1996. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 49: 1304-13.
- [4] Witko-Sarsat, V., V. Gausson, A.T. Nguyen, M. Touam, T. Drüeke, F. Santangelo, and B. Descamps-Latscha. 2003. AOPP-induced activation of human neutrophil and monocyte oxidative metabolism: a potential target for *N*-acetylcysteine treatment in dialysis patients. *Kidney Int* 64: 82-91.
- [5] Shi, X.Y., F.F. Hou, H.X. Niu, G. Wang, D. Xie, Z.J. Guo, Z.M. Zhou, F. Yang, J.W. Tian, and X. Zhang. 2008. Advanced oxidation protein products promote inflammation in diabetic kidney through activation of renal nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. *Endocrinology* 149: 1829-39.
- [6] Zhou, L.L., F.F. Hou, G.B. Wang, F. Yang, D. Xie, Y.P. Wang, and J.W. Tian. 2009. Accumulation of advanced oxidation protein products induces podocyte apoptosis and deletion through NADPH-dependent mechanisms. *Kidney Int* 76: 1148-60.
- [7] Hanasand, M., R. Omdal, K.B. Norheim, L.G. Gøransson, C. Brede, and G. Jonsson. 2012. Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. *Clin Chim Acta* 413: 901-6.
- [8] Capeillère-Blandin, C., V. Gausson, B. Descamps-Latscha, and V. Witko-Sarsat. 2004. Biochemical and spectrophotometric significance of advanced oxidized protein products. *Biochim Biophys Acta* 1689: 91-102.
- [9] Bochi, G.V., V.D. Torbitz, L.P. Cargnin, J.A. de Carvalho, P. Gomes, and R.N. Moresco. 2014. An alternative pathway through the Fenton reaction for the formation of advanced oxidation protein products, a new class of inflammatory mediators. *Inflammation* 37: 512-21.
- [10] Gorudko, I.V., D.V. Grigorieva, E.V. Shamova, V.A. Kostevich, A.V. Sokolov, E.V. Mikhailchik, S.N. Cherenkevich, J. Arnhold, and O.M. Panasenko. 2014. Hypohalous acid-modified human serum albumin induces neutrophil NADPH oxidase activation, degranulation, and shape change. *Free Radic Biol Med* 68: 326-34.
- [11] Torbitz, V.D., G.V. Bochi, J.A. de Carvalho, R.D. Vaucher, J.E. da Silva, and R.N. Moresco. 2014. *In vitro* oxidation of fibrinogen promotes functional alterations and formation of advanced oxidation protein products, an inflammation mediator. *Inflammation* 38: 1201-06.
- [12] Colombo, G., M. Clerici, D. Giustarini, N. Portinaro, S. Badalamenti, R. Rossi, A. Milzani, and I. Dalle-Donne. 2015. A central role for intermolecular dityrosine cross-linking of fibrinogen in high molecular weight advanced oxidation protein product (AOPP) formation. *Biochim Biophys Acta* 1850: 1-12.
- [13] Mazaki, Y., S. Hashimoto, T. Tsujimura, M. Morishige, A. Hashimoto, K. Aritake, A. Yamada, J.M. Nam, H. Kiyonari, K. Nakao, and H. Sabe. 2006. Neutrophil direction sensing

and superoxide production linked by the GTPase-activating protein GIT2. *Nat Immunol* 7: 724-31.

[14] Moncada, S., and A. Higgs. 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329: 2002-12.

[15] Wright, C.D., A. Mulsch, R. Busse, and H. Osswald. 1989. Generation of nitric oxide by human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 160: 813-19.

[16] Larfars, G., and H. Gyllenhammar. 1995. Measurement of methemoglobin formation from oxyhemoglobin. A real-time, continuous assay of nitric oxide release by human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol Methods* 184: 53-62.

[17] Ahlin, A., G. Larfars, G. Elinder, J. Palmblad, and H. Gyllenhammar. 1999. Gamma interferon treatment of patients with chronic granulomatous disease is associated with augmented production of nitric oxide by polymorphonuclear neutrophils. *Clin Diagn Lab Immunol* 6: 420-4.

[18] Reed, A., Y.J. Cho, J.S. Coombes, and R.G. Fassett. 2009. Time course and dose response of alpha tocopherol on oxidative stress in haemodialysis patients. *BMC Nephrol* doi: 10.1186/1471-2369-10-32.

[19] Morris, J.C. 1966. The acid ionization constant of HOCl from 5 to 35°. *J Phys Chem* 70: 3798-805.

[20] Bochi, G.V., V.D. Torbitz, L.P. Cargnin, M.B. Sangoi, R.C. Santos, P. Gomes, and R.N. Moresco. 2012. Fructose-1,6-bisphosphate and *N*-acetylcysteine attenuate the formation of advanced oxidation protein products, a new class of inflammatory mediators, *in vitro*. *Inflammation* 35: 1786-92.

[21] McCall, M.R., A.C. Carr, T.M. Forte, and B. Frei. 2001. LDL modified by hypochlorous acid is a potent inhibitor of lecithin-cholesterol acyltransferase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 1040-5.

[22] Davies, J.M.S., D.A. Horwittz, and K.J.L. Davies. 1993. Potential roles of hypochlorous acid and *N*-chloramines in collagen breakdown by phagocytic cells in synovitis. *Free Radic Biol Med* 15: 637-43.

[23] Olszowski, S., P. Mak, E. Olszowska, and J. Marcinkiewicz. 2003. Collagen type II modification by hypochlorite. *Acta Biochim Pol* 50: 471-9.

[24] Witko-Sarsat, V., M. Friedlander, T. Nguyen Khoa, C. Capeillère-Blandin, A.T. Nguyen, S. Canteloup, J.M. Dayer, P. Jungers, T. Drüeke, and B. Descamps-Latscha. 1998. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol* 161: 2524-32.

[25] Rudie, N.G., D.J.T. Porter, and H.J. Bright. 1980. Chlorination of an active sitetyrosyl residue in D-amino-acid oxidase by *N*-chloro-D-leucine. *J Biol Chem* 255: 498-508.

[26] Boyum, A. 1974. Separation of blood leukocytes, granulocytes and lymphocytes. *Tissue Antigens* 4: 269-74.

[27] Tatsch, E., G.V. Bochi, R.S. Pereira, H. Kober, V.A. Agertt, M.M. de Campos, P. Gomes, M.M. Duarte, and R.N. Moresco. 2011. A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate. *Clin Biochem* 44: 348-50.

[28] Morabito, C., F. Rovetta, M. Bizzarri, G. Mazzoleni, G. Fanò, and M.A. Marigliò. 2010. Modulation of redox status and calcium handling by extremely low frequency electromagnetic



fields in C2C12 muscle cells: A real-time, single-cell approach. *Free Radic Biol Med* 48: 579-89.

[29] Bordignon, M., L. Da Dalt, L. Marinelli, and G. Gabai. 2014. Advanced oxidation protein products are generated by bovine neutrophils and inhibit free radical production *in vitro*. *Vet J* 199: 162-8.

[30] Makni-Maalej, K., M. Chiandotto, M. Hurtado-Nedelec, S. Bedouhene, M.A. Gougerot-Pocidalò, P.M. Dang, and J. El-Benna. 2013. Zymosan induces NADPH oxidase activation in human neutrophils by inducing the phosphorylation of p47phox and the activation of Rac2: involvement of protein tyrosine kinases, PI3Kinase, PKC, ERK1/2 and p38MAPkinase. *Biochem Pharmacol* 85: 92-100.

[31] Whiteman, M., D.C. Hooper, G.S. Scott, H. Koprowski, and B. Halliwell. 2002. Inhibition of hypochlorous acid-induced cellular toxicity by nitrite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 12061-6.

[32] Davies, K.J., M.E. Delsignore, and S.W. Lin. 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *J Biol Chem* 262: 9902-7.

[33] Weiss, S.J., M.B. Lampert, and S.T. Test. 1983. Long-lived oxidants generated by human neutrophils: characterisation and bioactivity. *Science* 227: 625-8.

[34] Daumer, K.M., A.U. Khan, and M.J. Steinbeck. 2000. Chlorination of pyridinium compounds. Possible role of hypochlorite, N-chloramines, and chlorine in the oxidation of pyridinoline cross-links of articular cartilage collagen type II during acute inflammation. *J Biol Chem* 275: 34681-92.

[35] Nissim, A., P.G. Winyard, V. Corrigall, R. Fatah, D. Perrett, G. Panayi, and Y. Chernajovsky. 2005. Generation of neoantigenic epitopes after posttranslational modification of type II collagen by factors present within the inflamed joint. *Arthritis Rheum* 52: 3829-38.

[36] Sharma, P., S.A. Raghavan, R. Saini, and M. Dikshit, 2004. Ascorbate-mediated enhancement of reactive oxygen species generation from polymorphonuclear leukocytes: modulatory effect of nitric oxide. *J Leukoc Biol* 75: 1070-8.

[37] Gal, A., S. Tamir, L.J. Kennedy, S.R. Tannenbaum, and G.N. Wogan. 1997. Nitrotyrosine formation, apoptosis, and oxidative damage: relationships to nitric oxide production in SJL mice bearing the RcsX tumor. *Cancer Res* 57: 1823-8.

[38] Foote, C.S., T.E. Goyne, and R.I. Lehrer. 1983. Assessment of chlorination by human neutrophils. *Nature* 301: 715-6.

[39] Weiss, S.J. 1989. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 320: 365-76.

[40] Kennedy, A.D., F.R. DeLeo. 2009. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunome Res* 43: 25-61.

[41] Kobayashi, S.D., K.R. Braughton, A.R. Whitney, J.M. Voyich, T.G. Schwan, J.M. Musser, and F.R. DeLeo. 2003. Bacterial pathogens modulate an apoptosis differentiation program in human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 10948-53.

[42] Valente, A.J., T. Yoshida, R.A. Clark, P. Delafontaine, U. Siebenlist, and B. Chandrasekar. 2013. Advanced oxidation protein products induce cardiomyocyte death via Nox2/Rac1/superoxide-dependent TRAF3IP2/JNK signaling. *Free Radic Biol Med* 60: 125-35.

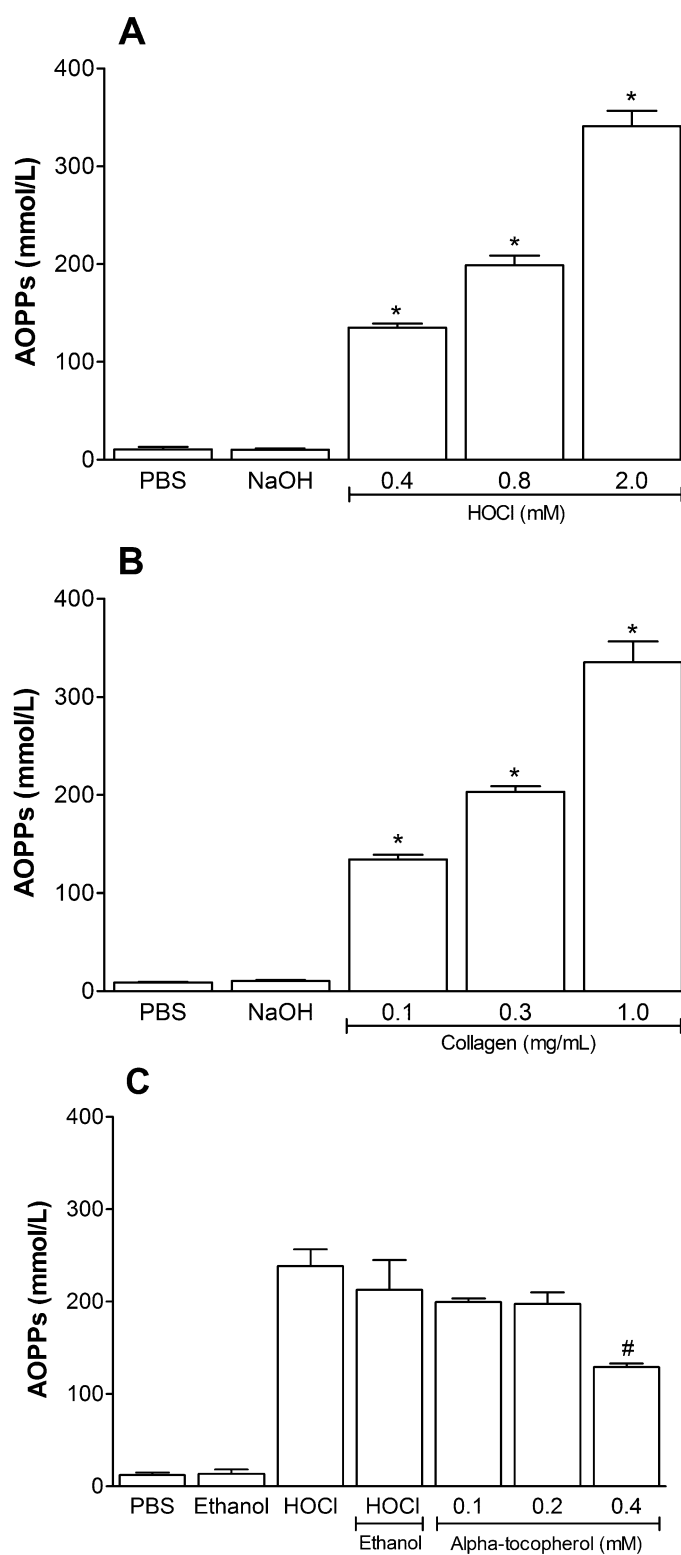
- [43] Mayadas T.N., and X. Cullere. 2005. Neutrophil beta2 integrins: moderators of life or death decisions. *Trends Immunol* 26: 388-95.
- [44] Williams, M.A., and J.S. Solomkin. 1999. Integrin-mediated signaling in human neutrophil functioning. *J Leukoc Biol* 65: 725-36.
- [45] Packer, L., and Valacchi, G. Antioxidants and the response of skin to oxidative stress: vitamin E as a key indicator. *Pharmacol Appl Skin Physiol* 15: 282-90.
- [46] McIntyre, B.S., K.P. Briski, A. Gapor, and P.W. Sylvester. 2000. Antiproliferative and apoptotic effects of tocopherols and tocotrienols on preneoplastic and neoplastic mouse mammary epithelial cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 224: 292-301.
- [47] Dean, R.T., J.V. Hunt, A.J. Grant, Y. Yamamoto, and E. Niki. 1991. Free radical damage to proteins: the influence of the relative localization of radical generation, antioxidants, and target proteins. *Free Radic Biol Med* 11: 161-8.
- [48] Hiramatsu, K., and S. Arimori. 1988. Increased superoxide production by mononuclear cells of patients with hypertriglyceridemia and diabetes. *Diabetes* 37: 832-7.
- [49] Ludwig, P.W., D.B. Hunninghake, and J.R. Hoidal. 1982. Increased leukocyteoxidative metabolism in hyperlipoproteinemia. *Lancet* 2: 348-50.
- [50] Cao, W., J. Xu, Z.M. Zhou, G.B. Wang, F.F. Hou, and J. Nie. 2013. Advanced oxidation protein products activate intrarenal renin-angiotensin system via a CD36-mediated, redox-dependent pathway. *Antioxid Redox Signal* 18: 19-35.

**Table Caption**

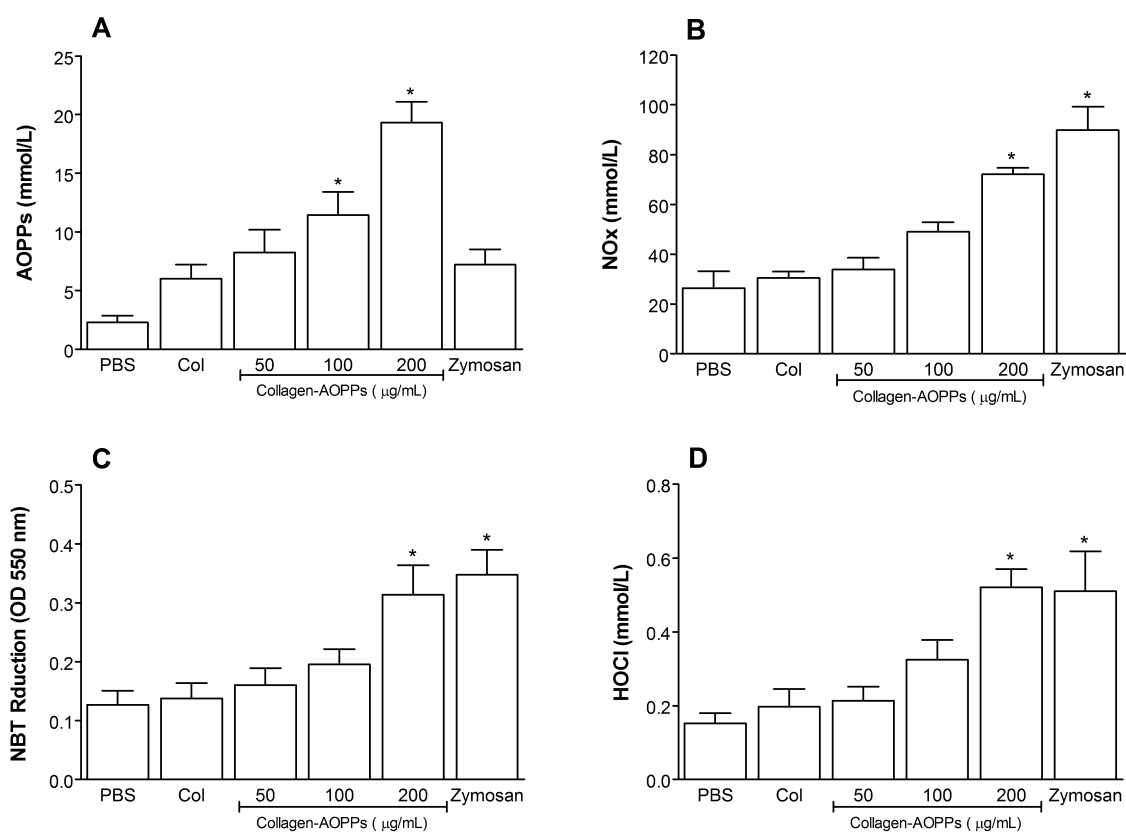
**Table 1.** Effects of unmodified (Col) and modified collagen (Collagen-AOPPs) on LDH release into the cell supernatant.

<b>Group</b>	<b>LDH (U/L)</b>
PBS	43.33 ± 4.3
Col	48.7 ± 8.1
Collagen-AOPPs (50 µg/mL)	45.0 ± 2.3
Collagen-AOPPs (100 µg/mL)	41.6 ± 4.7
Collagen-AOPPs (200 µg/mL)	46.3 ± 5.6
Zymosan (200 µg/mL)	42.2 ± 5.4

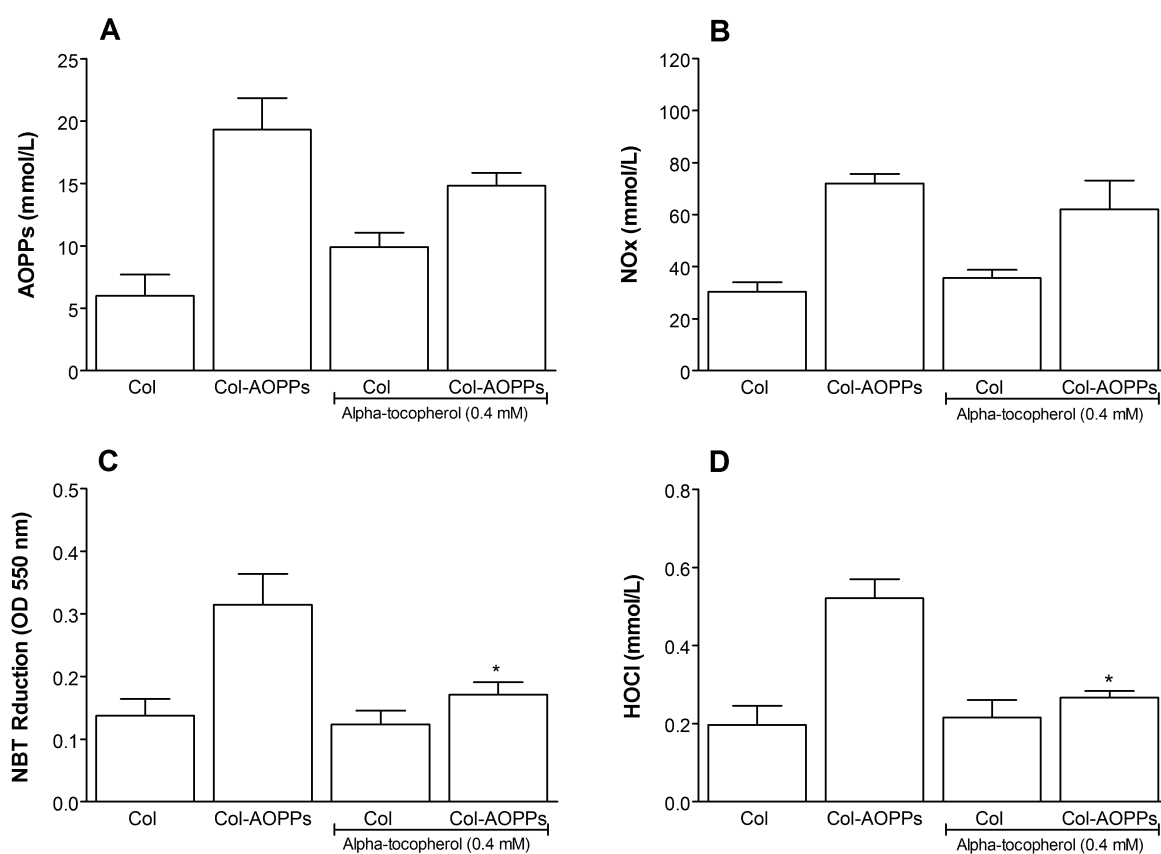
## Figure Captions



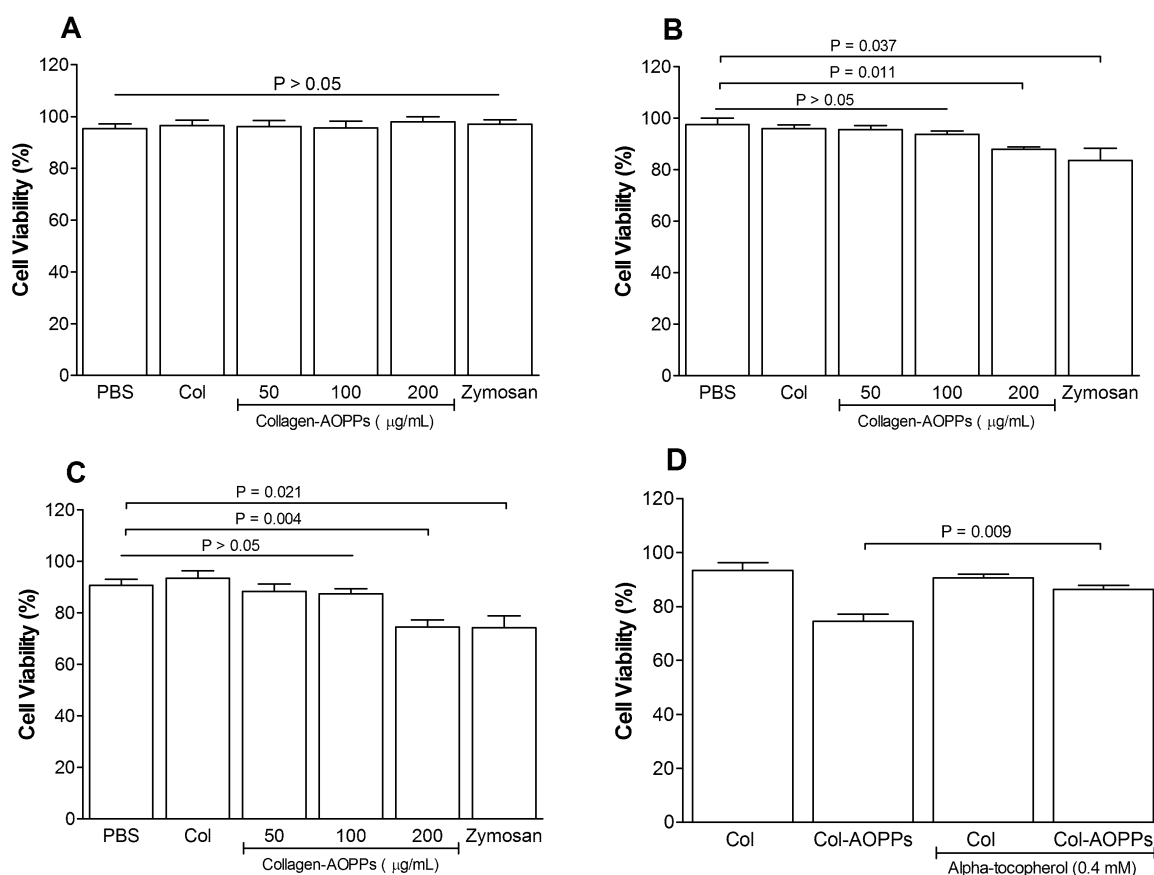
**Figure 1.** Collagen-AOPP formation was induced by HOCl and reduced by alpha-tocopherol. The experiments were performed five times and data are expressed as means  $\pm$  SEM. \* $P < 0.001$  vs. PBS and NaOH groups; # $P < 0.001$  vs. HOCl (2 mM) group.



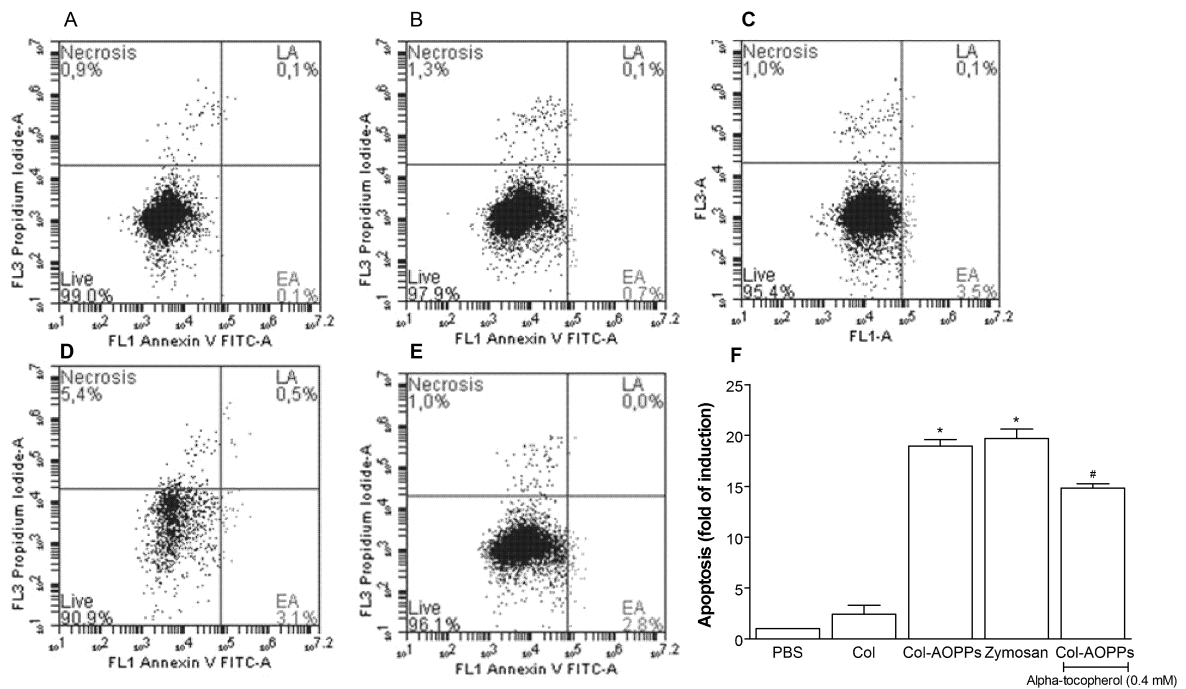
**Figure 2.** Neutrophils were activated after exposure to collagen-AOPPs. Neutrophils were treated with different concentrations of collagen-AOPPs (50, 100, and 200  $\mu\text{g/mL}$ ) for 1 h at 37  $^{\circ}\text{C}$ . (A) AOPP levels in the supernatant were determined and measured by a spectrophotometric assay. (B) Generation of NO<sub>x</sub> by neutrophils treated with collagen-AOPPs was determined as the accumulation of nitrites and nitrates in the supernatant of the neutrophils using the Griess reaction. (C) Intracellular generation of O<sub>2</sub><sup>-</sup> by neutrophils exposed to collagen-AOPPs was assayed using a colorimetric method based on the formation of formazan (NBTH<sub>2</sub>) following a reaction between nitroblue tetrazolium (NBT) chloride and O<sub>2</sub><sup>-</sup>. (D) HOCl production by neutrophils was monitored under the same incubation conditions by reading the absorbance of the cell suspension medium at 292 nm ( $\epsilon = 350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) using a spectrophotometer. Non-opsionized zymosan (500  $\mu\text{g/mL}$ ) was used as a positive control. The experiments were performed five times and data are expressed as means  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  vs. PBS and unmodified collagen group (Col).



**Figure 3.** Effect of alpha-tocopherol on collagen-AOPP-induced neutrophil activation. Neutrophils ( $2 \times 10^6$  cells/mL) were incubated with *in vitro* preparations of collagen-AOPPs (200  $\mu$ g/mL) or unmodified collagen (200  $\mu$ g/mL) along with PBS or alpha-tocopherol (0.4 mM) for 1 h at 37 °C. (A) AOPP levels were measured by a spectrophotometric assay. (B) Effect of alpha-tocopherol on NOx generation by neutrophils was determined as the accumulation of nitrites and nitrates in the cell supernatant using the Griess reaction. (C) Effect of alpha-tocopherol on the collagen-AOPP-induced production of intracellular  $O_2^-$  and (D) HOCl by neutrophils. The experiments were performed five times and data are expressed as means  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  for cells treated with collagen-AOPPs in the presence *vs.* absence of alpha-tocopherol.



**Figure 4.** Cytotoxicity of collagen-AOPPs on neutrophils was assessed by a trypan blue exclusion assay. Neutrophils ( $2 \times 10^6$  cells/mL) were treated with PBS, unmodified collagen (200  $\mu\text{g/mL}$ ), or different concentrations of collagen-AOPPs (50, 100, and 200  $\mu\text{g/mL}$ ) for 1 h at 37  $^{\circ}\text{C}$ . A trypan blue exclusion assay was performed immediately (A), 2 h (B), or 4 h (C) after the exposure to collagen-AOPPs. (D) Effect of alpha-tocopherol (0.4 mM) on neutrophil viability after 4 h incubation with collagen-AOPPs. The experiments were performed five times and data are expressed as means  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  for cells treated with PBS vs. cells exposed to collagen-AOPPs (200  $\mu\text{g/mL}$ ) and # $P < 0.05$  for cells treated with collagen-AOPPs (200  $\mu\text{g/mL}$ ) only vs. cells treated with collagen-AOPPs (200  $\mu\text{g/mL}$ ) and alpha-tocopherol (0.4 mM).



**Figure 5.** Effect of collagen-AOPPs on apoptosis in neutrophils was analyzed using the Annexin V assay. Neutrophils ( $1 \times 10^5$  cells/mL) were treated with (A) PBS, (B) unmodified collagen (Col), (C) collagen-AOPPs (200  $\mu$ mL), (D) non-opsonized zymosan (500  $\mu$ g/mL), or (E) collagen-AOPPs (200  $\mu$ mL) along with alpha-tocopherol (0.4 mM) for 1 h at 37  $^{\circ}$ C. Representative FACS plots from three to six replicate experiments were shown. (F) Cytometry results summarizing early and late apoptosis events. The results are expressed as the means  $\pm$  SEM of the fluorescence index (MFI) plotted as the fold change for each group. \*P < 0.05 vs. cells treated with PBS or unmodified collagen (Col) and #P < 0.05 vs. cells treated with collagen-AOPPs only.



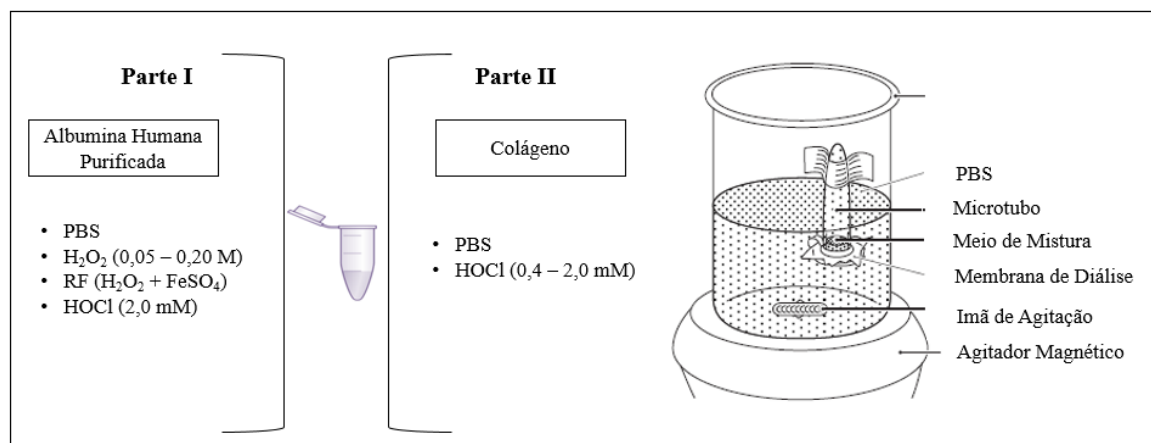
## 5 DISCUSSÃO

Os AOPPs são um grupo heterogêneo de compostos oxidados envolvidos em muitas condições clínicas importantes, incluindo DRC (WITKO-SARSAT et al., 1996), diabetes mellitus (MARTIN-GALLAN et al., 2003; SEBEKOVA et al., 2012), síndrome metabólica (ATABEK et al., 2006), entre outras. O principal mecanismo de formação dos AOPPs é através do HOCl produzido pela MPO, sendo a albumina, a principal fonte proteica para a formação desses produtos. No entanto, a via MPO/HOCl parece não ser a única responsável pela formação de AOPPs (CAPEILLÈRE-BLANDIN et al., 2006), e uma série de estudos indicam a existência de vias alternativas que podem contribuir para formação de AOPPs (DRÜEKE et al., 2002; ANRAKU et al., 2008). Outro fator importante que também não está totalmente esclarecido é se a albumina é a única proteína suscetível a formação dos AOPPs, uma vez que a composição molecular desses produtos ainda não está totalmente definida (SELMECI et al., 2006; COLOMBO et al., 2015). Além dessas questões, é de interesse investigar se os AOPPs gerados por essa nova via de formação e por outra fonte proteica mantêm as características pró-inflamatórias e pró-apoptóticas observadas nos AOPPs originados pela via MPO/HOCl. A primeira hipótese para avaliar uma via alternativa foi investigar a formação de AOPPs através da reação de Fenton, uma vez que essa reação é a principal geradora de  $\text{OH}^\bullet$  (REPETTO et al., 2010). Além disso, uma série de estudos indicam que a administração de ferro intravenosa promove aumento dos níveis circulatórios de AOPPs (DRÜEKE et al., 2002; ANRAKU et al., 2008). É importante destacar que o  $\text{OH}^\bullet$  também pode ser formado através do HOCl (CANDEIAS et al., 1994). Outro fator de interesse é a avaliação dos efeitos dos AOPPs gerados através da reação de Fenton sobre mecanismos inflamatórios em um modelo celular. Essas questões são temas do Artigo I e do Artigo II.

Primeiramente, um aspecto importante que deve ser discutido é a padronização dos modelos de formação dos AOPPs através da reação de Fenton e do colágeno. A formação de AOPPs através da reação de Fenton (AOPP-RF) ocorreu através da exposição da albumina humana purificada (30 mg/mL) a várias concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{FeSO}_4$  (reagentes da reação de Fenton) por trinta minutos. Após essa exposição, foi realizada a diálise desse produto frente ao tampão PBS para a purificação e a retirada de oxidantes que não reagiram. A albumina também foi exposta ao HOCl e foi utilizada como controle positivo. Para a formação de colágeno-AOPP, o colágeno (1 mg/mL) foi exposto a diferentes concentrações de HOCl por trinta minutos e, após, passou pelo mesmo processo de purificação. Os detalhes de preparação de AOPP-RF e colágeno-AOPP estão ilustrados na Figura 7. Para investigar os

mecanismos pró-inflamatórios desses novos produtos, AOPP-RF e colágeno-AOPP foram expostos a células renais embrionárias (Artigo II) e a neutrófilos humanos (Artigo III), respectivamente.

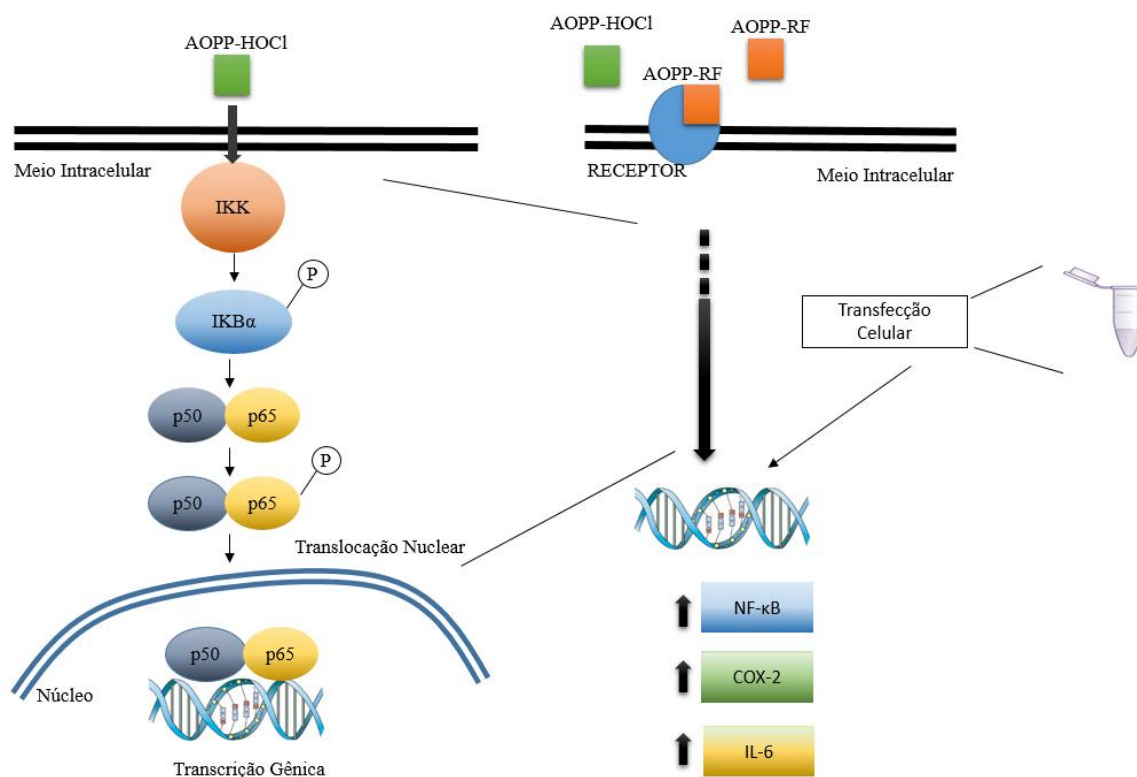
Figura 7 - Preparação *in vitro* de AOPPs formados através da reação de Fenton (AOPP-RF) e do colágeno (colágeno-AOPP)



No Artigo I, utilizando o modelo de formação de AOPPs através da reação de Fenton, foi demonstrado que essa reação foi capaz de formar AOPPs *in vitro*. Além disso, amostras de soro de indivíduos saudáveis, pacientes com diabetes mellitus tipo 2 e pacientes com DRC expostas a reação de Fenton também apresentaram níveis aumentados de AOPPs após o tratamento com a reação de Fenton. Também foi observado que compostos antioxidantes, como o NAC e a FBP, inibiram a formação de AOPP-RF. Através desse estudo, foi possível sugerir a reação de Fenton pode ser uma potencial via de formação de AOPPs *in vivo* e que compostos antioxidantes, como o NAC e a FBP, podem ser estratégias úteis para a prevenção ou inibição dos efeitos deletérios promovidos por AOPPs. De fato, o NAC já foi avaliado no contexto dos AOPPs, e foi demonstrado que esse composto inibiu a ativação da NADPH oxidase e da MPO induzida por AOPPs (WITKO-SARSAT et al., 2003). Em um segundo momento, no Artigo II, os AOPP-RF foram expostos a células embrionárias humanas (HEK 293), para investigar o potencial desses produtos inéditos em promover inflamação. Nesse estudo, foi verificado através de ensaio de transfecção celular e mensuração da atividade da luciferase, que os AOPP-RF induziram um aumento significativo da atividade da luciferase em células transfectadas com promotor do NF- $\kappa$ B, da COX-2 e da IL-6, indicando um AOPP-RF induziu um aumento da transcrição desses genes envolvidos no processo inflamatório. Os experimentos de transfecção celular foram realizados em colaboração com

grupo de pesquisa da Universidade de Barcelona coordenado pelo professor José Luis Rosa López. A relação ente os AOPPs formados pela via MPO/HOCl e a ativação do processo inflamatório mediado por NF- $\kappa$ B já está bem descrita (CAO et al., 2013; ZHAO et al., 2015). Considerando que o NF- $\kappa$ B é responsável pelo controle da transcrição de uma classe diversa de mediadores inflamatórios, foi sugerido que os AOPP-RF induziram o processo inflamatório em células renais através da ativação de NF- $\kappa$ B e do aumento da transcrição gênica de COX-2 e IL-6, uma vez que a transcrição gênica da COX-2 é, de fato, estimulada principalmente pelo NF- $\kappa$ B (GUIJARRO, 2001). De modo semelhante, os AOPPs derivados do HOCl também estimularam o processo inflamatório, sugerindo que os AOPPs de ambas as vias de formação podem contribuir na ativação do processo inflamatório renal *in vivo*. Alguns achados referentes ao Artigo II está ilustrado na Figura 8.

Figura 8 - Indução do processo inflamatório pelos AOPP-FR em células renais embrionárias (HEK 293)



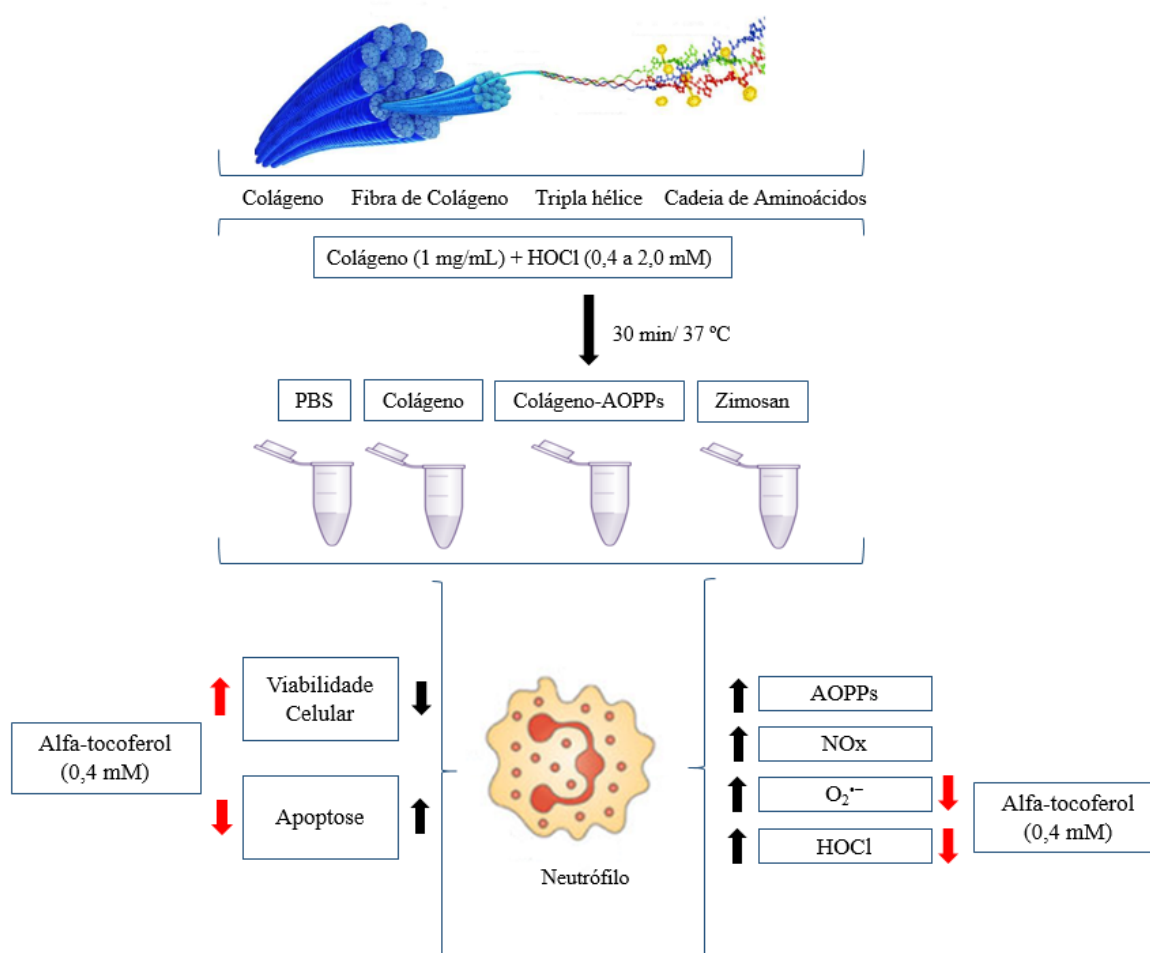
Além das células renais embrionárias, os AOPPs também promovem efeitos deletérios sobre outros tipos celulares, incluindo células do tecido renal, como podócitos (ZHOU et al., 2009; ZHOU et al., 2012; ZHAO et al., 2015), células mesangiais (WEI et al., 2009; WANG

et al., 2013) e células epiteliais tubulares (CAO et al., 2013), bem como células endoteliais (GUO et al., 2008), condrócitos (WU et al., 2016), cardiomiócitos (VALENTE et al., 2013; ZHANG et al., 2016), células epiteliais intestinais (XIE et al., 2014; WU et al., 2015) e osteoblastos (ZHONG et al., 2009). Entre os efeitos resultantes da ação dos AOPPs, destacam-se a ativação de vias envolvidas no processo pró-apoptótico (ZHOU et al., 2012; VALENTE et al., 2013; XIE et al., 2014; WU et al., 2016; ZHANG et al., 2016), no processo pró-inflamatório (WANG et al., 2013; ZHAO et al., 2015) e nos processos de proliferação e diferenciação celular (ZHONG et al., 2009; RONG et al., 2015). Um mecanismo subjacente a maioria desses efeitos induzidos pelos AOPPs, independentemente do tipo celular, é o aumento da geração de EROs através da ativação da NADPH oxidase. A ativação desse complexo enzimático parece depender da fosforilação mediada pela PKC (ZHOU et al., 2012; CAO et al., 2013). Esse aumento de EROs induzem diferentes cascatas de sinalizações, incluindo a via pró-inflamatória mediada pelo NF- $\kappa$ B (CAO et al., 2013; ZHAO et al., 2015) e a via pró-apoptótica, tanto dependente da ativação de caspase (ZHOU et al., 2013; WU et al., 2016), quanto uma via independente de caspase (XIE et al., 2014).

A segunda hipótese para investigar as vias de formação dos AOPPs, foi avaliar o colágeno, principal componente tecidual da matriz extracelular, como uma potencial fonte de formação de AOPPs e esse foi o tema do Artigo III. Para isso, foram estabelecidos e padronizados modelos para a formação *in vitro* dos AOPPs gerados a partir do colágeno (colágeno-AOPP). De acordo com os achados referentes ao Artigo III, foi demonstrado que o colágeno pode ser uma fonte proteica para formação de AOPPs. O colágeno é a proteína preponderante na matriz extracelular e, assim com a albumina, essa proteína também é suscetível a oxidação pelo HOCl (NOWOTNY et al., 2014). Nesse estudo, o colágeno foi exposto a concentrações crescentes de HOCl, e o aumento da formação de AOPPs foi concentração-dependente desse agente oxidante. Um fato importante é que o colágeno-AOPP induziu o aumento da liberação de espécies oxidantes, como o  $O_2^-$  e o HOCl, e de mediadores inflamatórios, como o NO e AOPPs, em neutrófilos humanos isolados. Além disso, colágeno-AOPP diminui a viabilidade celular e induziu apoptose nessas células. Esses processos podem ter sido promovidos em consequência do aumento da produção de oxidantes induzidas pelo colágeno-AOPP. De fato, já foi demonstrado que os AOPPs induzem *burst* oxidativo em células do sistema imune, como monócitos e neutrófilos, a produzirem grandes concentrações de oxidantes através da ativação dos sistemas enzimáticos presentes nessas células (WITKO-SARSAT et al., 2003). Em neutrófilos, os AOPPs também estimulam o processo de degranulação e mudança da forma, sendo essas, duas estratégias de grande importância

durante a ativação neutrofílica na resposta imune e no processo inflamatório (GORUDKO et al., 2014). Outro achado do presente estudo inclui o efeito do alfa-tocoferol sobre os processos oxidativos, inflamatórios e de viabilidade celular e diminuir a apoptose nessas células, indicando que o processo oxidativo induzido pelo colágeno-AOPP pode ser o fator responsável pela morte destas células. Os principais resultados desse estudo podem ser demonstrados na Figura 9.

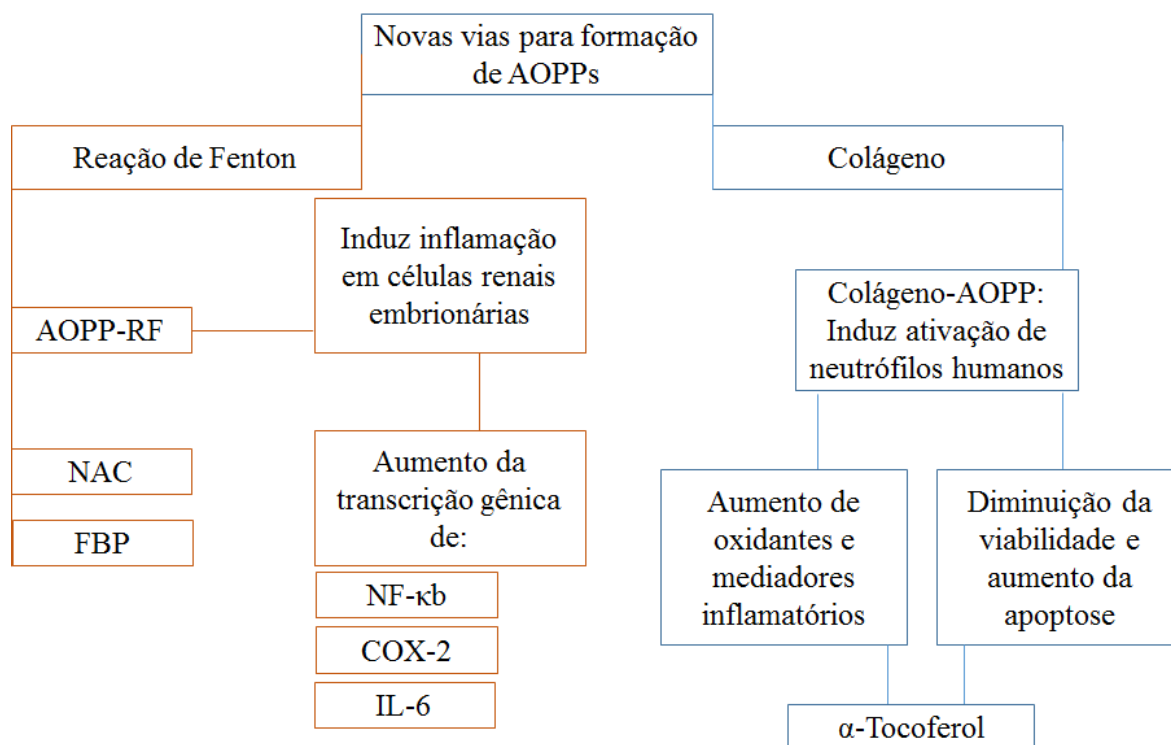
Figura 9 - Formação de AOPPs através da exposição do colágeno ao HOCl (colágeno-AOPP) e os efeitos desses produtos sobre os processos oxidativos, inflamatórios e de viabilidade celular em neutrófilos humanos isolados



## 6 CONCLUSÕES

- Os AOPPs podem ser formados por outras vias, incluindo processos desencadeados pela reação de Fenton, assim como àqueles associados a oxidação do colágeno;
- Compostos antioxidantes, incluindo NAC, FBP e alfa-tocoferol, podem ser potenciais estratégias terapêuticas para inibir a formação de AOPPs e seus efeitos deletérios;
- Os AOPPs induzem processo pró-inflamatórios em células renais, envolvendo a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, a COX-2 e IL-6;
- O colágeno pode ser uma proteína de fundamental importância para formação de AOPPs, mantendo o potencial pró-inflamatório e pró-apoptóticos.
- As principais conclusões podem ser sumarizadas na Figura 10.

Figura 10 - Nessa Tese foi possível demonstrar que a reação de Fenton e o colágeno são novas vias para formação de AOPPs. Os AOPPs formados através destas vias induzem inflamação em células renais embrionárias, bem como a ativação de neutrófilos, atuando como mediadores do processo inflamatório. Em neutrófilos, os AOPPs formados através do colágeno também promoveram o aumento da geração de oxidantes e induziram apoptose e diminuição da viabilidade celular, sendo esses eventos inibidos pelo alfa-tocoferol

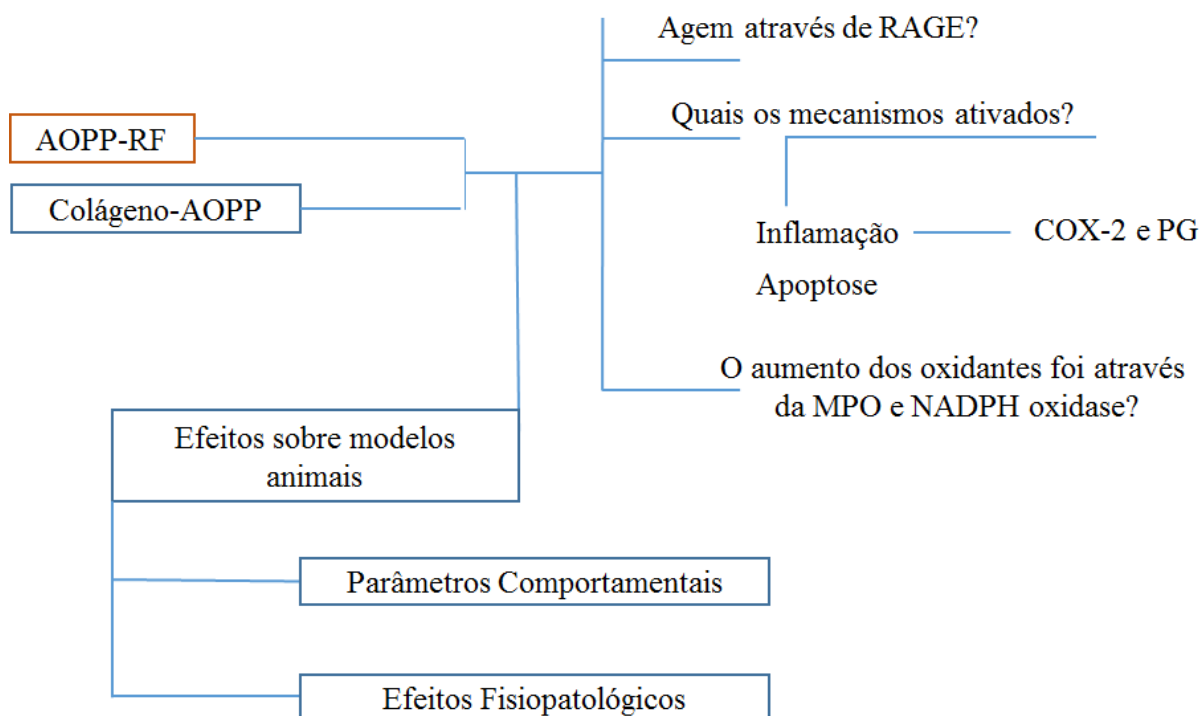


## 7 PERSPECTIVAS

Algumas perspectivas para estudos futuros podem ser demonstradas na Figura 11 e incluem:

- Investigar se os AOPPs formados através da reação de Fenton e do colágeno atuam sobre algum receptor, como exemplo, o receptor RAGE;
- Avaliar a relação dos AOPPs com mecanismos inflamatórios envolvendo a COX-2 e produção de prostaglandinas (PGs);
- Verificar se esses novos produtos induzem ativação da MPO e NADPH oxidase;
- Avaliar o impacto da administração (endovenosa, intracerebroventricular, etc.) dos AOPPs sobre parâmetros comportamentais envolvendo estudos de memória e dor.

Figura 11 - Perspectivas para estudos futuros envolvendo os AOPPs



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAO, K. P.; GOELDNER, F.O.; SOUZA-FORMIGONI, M.L. Individual differences in ethanol locomotor sensitization are associated with dopamine D1 receptor intra-cellular signaling of DARPP-32 in the nucleus accumbens. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. 98290-98296, 2014.
- ABU-SOUD, H. M.; HAZEN, S.L. Nitric oxide is a physiological substrate for mammalian peroxidases. **J Biol Chem**, v. 275, n. 48, p. 37524-37532, 2000.
- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SIKKA, S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. **Curr Opin Obstet Gynecol**, v. 18, n. 3, p. 325-332, 2006.
- AHSAN, H. et al. Pharmacological potential of tocotrienols: a review. **Nutr Metab**, v. 11, n. 1, p. 1-52, 2014.
- AMIR ASLANI, B.; GHOBADI, S. Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system. **Life Sci**, v. 146, p. 163-173, 2016.
- ANRAKU M. et al. Effect of intravenous iron administration frequency on AOPP and inflammatory biomarkers in chronic hemodialysis patients: a pilot study. **Clin Biochem**, v. 41, n. 14, p. 1168-1174, 2008.
- ANRAKU, M. et al. Redox properties of serum albumin. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 12, p. 5465-5472, 2013.
- ARTEEL, G. E.; SIES, H. The biochemistry of selenium and the glutathione system. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 10, n. 4, p. 153-158, 2001.
- ATABEK, M. E. et al. Serum magnesium concentrations in type 1 diabetic patients: relation to early atherosclerosis. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 72, n. 1, p. 42-47, 2006.
- ATABEK, M. E.; PIRGON, O.; KURTOGLU, S. Prevalence of metabolic syndrome in obese Turkish children and adolescents. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 72, n. 3, p. 315-321, 2006.
- ATKURI, K. R. et al. N-Acetylcysteine--a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. **Curr Opin Pharmacol**, v. 7, n. 4, p. 355-359, 2007.
- AZZI, A.; RICCIARELLI, R.; ZINGG, J. M. Non-antioxidant molecular functions of alpha-tocopherol (vitamin E). **FEBS Lett**, v. 519, n. 1, p. 8-10, 2002.
- BABIOR, B. M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, v. 93, n. 5, p. 1464-1476, 1999.
- BACHI, A.; DALLE-DONNE, I.; SCALONI, A. Redox proteomics: chemical principles, methodological approaches and biological/biomedical promises. **Chem Rev**, v. 113, n. 1, p. 596-698, 2013.
- BALDUS, S. et al. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. **Circulation**, v. 108, n. 12, p. 1440-1445, 2003.
- BARAIBAR, M. A. Protein oxidative damage at the crossroads of cellular senescence, aging, and age-related diseases. **Oxid Med Cell Longev**, 2012. doi: 10.1155/2012/919832.



- BARSOTTI, A. et al. Role of advanced oxidation protein products and Thiol ratio in patients with acute coronary syndromes. **Clin Biochem**, v. 44, p. 605-611, 2011.
- BASKOL, G. et al. Investigation of protein oxidation and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis. **Cell Biochem Funct**, v. 24, n. 4, p. 307-311, 2006.
- BASKOL, M. et al. Advanced oxidation protein products: a novel marker of oxidative stress in ulcerative colitis. **J Clin Gastroenterol**, v. 42, n. 6, p. 687-691, 2008.
- BATTIN, E. E.; BRUMAGHIM, J. L. Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. **Cell Biochem Biophys**, v. 55, n. 1, p. 1-23, 2009.
- BOCHI, G. V. et al. Fructose-1,6-bisphosphate and N-acetylcysteine attenuate the formation of advanced oxidation protein products, a new class of inflammatory mediators, in vitro. **Inflammation**, v. 35, n. 6, p. 1786-1792, 2012.
- BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nat Immunol**, v. 2, n. 10, p. 907-916, 2001.
- BORREGAARD, N. Neutrophils, from marrow to microbes. **Immunity**, v. 33, n. 5, p. 657-670, 2010.
- BOURDON, E.; BLACHE, D. The importance of proteins in defense against oxidation. **Antioxid Redox Signal**, v. 3, n. 2, p. 293-311, 2001.
- BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Bioactivity of vitamin E. **Nutr Res Rev**, v. 19, n. 2, p. 174-186, 2006.
- BUCHBERGER, A.; BUKAU, B.; SOMMER, T. Protein quality control in the cytosol and the endoplasmic reticulum: brothers in arms. **Mol Cell**, v. 40, n. 2, p. 238-252, 2010.
- CADENAS, E.; DAVIES, K. J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radic Biol Med**, v. 29, n. 3, p. 222-230, 2000.
- CAKATAY, U. Protein oxidation parameters in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control. **Diabetes Metab**, v. 31, n. 6, p. 551-557, 2005.
- CAMILLA, R. et al. Oxidative stress and galactose-deficient IgA1 as markers of progression in IgA nephropathy. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 6, n. 8, p. 1903-1911, 2011.
- CANDEIAS, L. P.; STRATFORD, M. R.; WARDMAN, P. Formation of hydroxyl radicals on reaction of hypochlorous acid with ferrocyanide, a model iron (II) complex. **Free Radic Res**, v. 20, n. 4, p. 241-249, 1994.
- CAO, W. et al. Advanced oxidation protein products activate intrarenal renin-angiotensin system via a CD36-mediated, redox-dependent pathway. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 1, p. 19-35, 2013.
- CAO, W.; HOU, F. F.; NIE, J. AOPPs and the progression of kidney disease. **Kidney Int Suppl**, v. 4, n. 1, p. 102-106, 2014.
- CAPEILLÈRE-BLANDIN, C. et al. Biochemical and spectrophotometric significance of advanced oxidized protein products. **Biochim Biophys Acta**, v. 1689, n. 2, p. 91-102, 2004.

- CAPEILLÈRE-BLANDIN, C. et al. Respective role of uraemic toxins and myeloperoxidase in the uraemic state. **Nephrol Dial Transplant**, v. 21, n. 6, p. 1555-1563, 2006.
- CARBALLAL, S. et al. Sulfenic acid formation in human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxynitrite. **Biochemistry**, v. 42, n. 33, p. 9906-9914, 2003.
- CARTER, R. et al. Differential expression of procollagen genes between mid- and late-gestational fetal fibroblasts. **J Surg Res**, v. 156, n. 1, p. 90-94, 2009.
- CHAN, S. S. et al. Alpha-tocopherol modulates tyrosine phosphorylation in human neutrophils by inhibition of protein kinase C activity and activation of tyrosine phosphatases. **Free Radic Res**, v. 35, n. 6, p. 843-856, 2001.
- CHANG, C. Y. et al. Dual functionality of myeloperoxidase in rotenone-exposed brain-resident immune cells. **Am J Pathol**, v. 179, n. 2, p. 964-979, 2011.
- CHANG, D. et al. Evaluation of oxidative stress in colorectal cancer patients. **Biomed Environ Sci**, v. 21, n. 24, p. 286-9, 2008.
- CHOW, F. Y. et al. Macrophages in streptozotocin-induced diabetic nephropathy: potential role in renal fibrosis. **Nephrol Dial Transplant**, v. 19, n. 12, p. 2987-96, 2004.
- COLOMBO, G. et al. A central role for intermolecular dityrosine cross-linking of fibrinogen in high molecular weight advanced oxidation protein product (AOPP) formation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1850, n. 1, p. 1-12, 2015.
- COLOMBO, G. et al. Redox albuminomics: oxidized albumin in human diseases. **Antioxid Redox Signal**, v. 17, n. 11, p. 1515-1527, 2012.
- DALLE-DONNE, I. et al. Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics. **Mass Spectrom Rev**, v. 24, n. 1, p. 55-99, 2005.
- DAVIES, M. J. The oxidative environment and protein damage. **Biochim Biophys Acta**, v. 1703, n. 2, p. 93-109, 2005.
- DEJANA, E.; CORADA, M.; LAMPUGNANI, M. G. Endothelial cell-to-cell junctions. **FASEB J**, v. 9, n. 10, p. 910-918, 1995.
- DESCAMPS-LATSCHA, B. et al. Advanced oxidation protein products as risk factors for atherosclerotic cardiovascular events in nondiabetic predialysis patients. **Am J Kidney Dis**, v. 45, n. 1, p. 39-47, 2005.
- DIZDAROGLU, M. Oxidatively induced DNA damage: mechanisms, repair and disease. **Cancer Lett**, v. 327, n. 1, p. 26-47, 2012.
- DRÜEKE, T. et al. Iron therapy, advanced oxidation protein products, and carotid artery intima-media thickness in end-stage renal disease. **Circulation**, v. 106, n. 17, p. 2212-2217, 2002.
- FANALI, G. et al. Human serum albumin: from bench to bedside. **Mol Aspects Med**, v. 33, n. 3, p. 209-290, 2012.
- FARACI, F. M.; DIDION, S. P. Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 24, n. 8, p. 1367-1373, 2004.

FERREIRA, A. L.; MATSUBARA, L.S. Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress. **Rev Assoc Med Bras**, v. 43, n. 1, 1997.

FU, X. et al. Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. **J Biol Chem**, v. 276, n. 44, p. 41279-41287, 2001.

FUTOSI, K.; FODOR, S.; MÓCSAI, A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. **Int Immunopharmacol**, v. 17, n. 3, p. 638-650, 2013.

GALLI, F. Protein damage and inflammation in uraemia and dialysis patients. **Nephrol Dial Transplant**, v. 5, p. 20-36, 2007.

GALLI, S. J.; BORREGAARD, N.; WYNN, T. A. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. **Nat Immunol**, v. 12, n. 11, p. 1035-1044, 2011.

GÁMEZ, A. et al. Beneficial effects of fructose 1,6-biphosphate on hypothermia-induced reactive oxygen species injury in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 590, n. 1, p. 115-119, 2008.

GAUT, J. P. et al. Neutrophils employ the myeloperoxidase system to generate antimicrobial brominating and chlorinating oxidants during sepsis. **Proc Natl Acad Sci**, v. 98, n. 21, p. 11961-11966, 2001.

GEERING, B.; SIMON, H. U. Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. **Cell Death Differ**, v. 18, n. 9, p. 1457-1469, 2011.

GORUDKO, I. V. et al. Hypochlorous acid-modified human serum albumin induces neutrophil NADPH oxidase activation, degranulation, and shape change. **Free Radic Biol Med**, v. 68, p. 326-334, 2014.

GRADINARU, D. et al. Advanced oxidative and glycoxidative protein damage markers in the elderly with type 2 diabetes. **J Proteomics**, v. 92, p. 313-322, 2013.

GRANATA, S. et al. Mitochondrial dysregulation and oxidative stress in patients with chronic kidney disease. **BMC Genomics**, v. 10, p. 388, 2009.

GRUYS, E. et al. Acute phase reaction and acute phase proteins. **J Zhejiang Univ Sci B**, v. 6, n. 11, p. 1045-1056, 2005.

GUIJARRO, C.; EGIDO, J. Transcription factor-kappa B (NF-kappa B) and renal disease. **Kidney Int**, v. 59, n. 2, p. 415-424, 2001.

HADDAD, J. J.; HARB, H. L. L-gamma-Glutamyl-L-cysteinyl-glycine (glutathione; GSH) and GSH-related enzymes in the regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines: a signaling transcriptional scenario for redox(y) immunologic sensor(s)? **Mol Immunol**, v. 42, n. 9, p. 987-1014, 2005.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiol**, v. 141, n. 2, p. 312-322, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. **FEBS Lett**, v. 307, n. 1, p. 108-112, 1992.

- HAWKINS, C. L.; DAVIES, M. J. Hypochlorite-induced damage to nucleosides: formation of chloramines and nitrogen-centered radicals. **Chem Res Toxicol**, v. 14, n. 8, p. 1071-1081, 2001.
- HAWKINS, C. L.; PATTISON, D. I.; DAVIES, M. J. Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. **Amino Acids**, v. 25, n. 3, p. 259-274, 2003.
- HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Signaling to NF-kappaB. **Genes Dev**, v. 18, n. 18, p. 2195-224, 2004.
- HEINECKE, J. W. Biochemical evidence for a link between elevated levels of homocysteine and lipid peroxidation in vivo. **Curr Atheroscler Rep**, v. 1, n. 2, p. 87-89, 1999.
- HEKIMI, S.; LAPOINTE, J.; WEN, Y. Taking a "good" look at free radicals in the aging process. **Trends Cell Biol**, v. 21, n. 10, p. 569-576, 2011.
- HIMMELFARB, J.; MCMONAGLE, E. Albumin is the major plasma protein target of oxidant stress in uremia. **Kidney Int**, v. 60, n. 1, p. 358-363, 2001.
- HÖHN, A.; JUNG, T.; GRUNE, T. Pathophysiological importance of aggregated damaged proteins. **Free Radic Biol Med**, 2014. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.02.028.
- JIAO, K. et al. Site-selective nitration of tyrosine in human serum albumin by peroxynitrite. **Anal Biochem**, v. 293, n. 1, p. 43-52, 2001.
- Jl, B. et al. Assessment of radioligands for PET imaging of cyclooxygenase-2 in an ischemic neuronal injury model. **Brain Res**, v. 1533, p. 152-162, 2013.
- JUNIOR, J. E. R. Doença Renal Crônica: Definição, Epidemiologia e Classificação. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 26, p. 1-3, 2004.
- KANEDA, H. et al. Increased level of advanced oxidation protein products in patients with coronary artery disease. **Atherosclerosis**, v. 162, p. 221-225, 2002.
- KARIN, M. NF-kappaB and cancer: mechanisms and targets. **Mol Carcinog**, v. 45, n. 6, p. 355-361, 2006.
- KARIN, M.; LIN, A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. **Nat Immunol**, v. 3, n. 3, p. 221-227, 2002.
- KASAHARA, Y. et al. Involvement of reactive oxygen intermediates in spontaneous and CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis of neutrophils. **Blood**, v. 89, n. 5, p. 1748-1753, 1997.
- KAWAKAMI, A. et al. Identification and characterization of oxidized human serum albumin. A slight structural change impairs its ligand-binding and antioxidant functions. **FEBS J**, v. 273, n. 14, p. 3346-3357, 2006.
- KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 3, p. 159-175, 2013.
- KONTUSH, A. et al. Antioxidant and prooxidant activity of alpha-tocopherol in human plasma and low density lipoprotein. **J Lipid Res**, v. 37, n. 7, p. 1436-1448, 1996.

- KOSKENKORVA-FRANK, T. S. et al. The complex interplay of iron metabolism, reactive oxygen species, and reactive nitrogen species: insights into the potential of various iron therapies to induce oxidative and nitrosative stress. **Free Radic Biol Med**, v. 65, p. 1174-1194, 2013.
- LASSÈGUE, B.; GRIENGLING, K. K. NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 30, n. 4, p. 653-661, 2010.
- LAVETI, D. et al. Anti-inflammatory treatments for chronic diseases: a review. **Inflamm Allergy Drug Targets**, v. 12, n. 5, p. 349-361, 2013.
- LAWRENCE, T.; GILROY, D. W. Chronic inflammation: a failure of resolution? **Int J Exp Pathol**, v. 88, n. 2, p. 85-94, 2007.
- LEITINGER, B. Transmembrane collagen receptors. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 27, p. 265-290, 2011.
- LENTINI, P. et al. The role of advanced oxidation protein products in intensive care unit patients with acute kidney injury. **J Crit Care**, v. 25, n. 4, p. 605-609, 2010.
- LI, H. Y. et al. Advanced oxidation protein products accelerate renal fibrosis in a remnant kidney model. **J Am Soc Nephrol**, v. 18, n. 2, p. 528-538, 2007.
- LI, Q.; VERMA, I. M. NF-kappaB regulation in the immune system. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 10, p. 725-734, 2002.
- LIANG, X. et al. Advanced oxidation protein products as prognostic biomarkers for recovery from acute kidney injury after coronary artery bypass grafting. **Biomarkers**, v. 16, n. 6, p. 507-512, 2012.
- LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 868-874, 2002.
- LIM, P. S.; CHENG, Y.M.; YANG, S.M. Impairments of the biological properties of serum albumin in patients on haemodialysis. **Nephrology**, v. 12, n. 1, p. 18-24, 2007.
- LIU, S. X. et al. Advanced oxidation protein products accelerate atherosclerosis through promoting oxidative stress and inflammation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 26, n. 5, p. 1156-1162, 2006.
- LOCATELLI, F. et al. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. **Nephrol Dial Transplant**, v. 18, n. 7, p. 1271-1280, 2003.
- MALLE, E.; BUCH, T.; GRONE, H. J. Myeloperoxidase in kidney disease. **Kidney Int**, v. 64, n. 6, p. 1956-1967, 2003.
- MANTOVANI, A. et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 8, p. 519-531, 2011.
- MARSCHE, G. et al. Hypochlorite-modified albumin colocalizes with RAGE in the artery wall and promotes MCP-1 expression via the RAGE-Erk1/2 MAP-kinase pathway. **FASEB J**, v. 21, n. 4, p. 1145-1152, 2007.

- MARTÍN-GALLÁN, P. et al. Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. **Free Radic Biol Med**, v. 34, n. 12, p. 1563-1574, 2003.
- MERA, K. et al. Oxidation and carboxy methyl lysine-modification of albumin: possible involvement in the progression of oxidative stress in hemodialysis patients. **Hypertens Res**, v. 28, n. 12, p. 973-980, 2005.
- MESTAS, J.; HUGHES, C. C. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. **J Immunol**, v. 172, n. 5, p. 2731-2738, 2004.
- MONCADA, S.; BOLAÑOS, J. P. Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. **J Neurochem**, v. 97, n. 6, p. 1676-1789, 2006.
- MORESCO, R. N. et al. Effect of fructose-1,6-bisphosphate in the cold storage solution after 12 and 36 hours of rat liver preservation. **Transplant Proc**, v. 36, n. 9, p. 2593-2595, 2004.
- MORGAN, M. J.; LIU, Z. G. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- $\kappa$ B signaling. **Cell Res**, v. 21, n. 1, p. 103-115, 2011.
- NAKAMURA, H.; MURAYAMA, T. Role of sphingolipids in arachidonic acid metabolism. **J Pharmacol Sci**, v. 124, n. 3, p. 307-312, 2014.
- NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic Biol Med**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.
- NOWOTNY, K.; GRUNE, T. Degradation of oxidized and glycosylated collagen: role of collagen cross-linking. **Arch Biochem Biophys**, v. 542, p. 56-64, 2014.
- NUNES, F. B. et al. Immunomodulatory effect of fructose-1,6-bisphosphate on T-lymphocytes. **Int Immunopharmacol**, v. 3, n. 2, p. 267-272, 2003.
- NUSSBAUM, C. et al. Myeloperoxidase: a leukocyte-derived protagonist of inflammation and cardiovascular disease. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 6, p. 692-713, 2013.
- ODEGAARD, J. I.; CHAWLA, A. Pleiotropic actions of insulin resistance and inflammation in metabolic homeostasis. **Science**, v. 339, n. 6116, p. 172-177, 2013.
- OETTL, K. et al. Oxidative damage of albumin in advanced liver disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1782, n. 7, p. 469-473, 2008.
- OLSZOWSKI, S. et al. Collagen type II modification by hypochlorite. **Acta Biochim Pol**, v. 50, n. 2, p. 471-479, 2003.
- OZENIRLER, S. et al. Serum levels of advanced oxidation protein products, malonyldialdehyde, and total radical trapping antioxidant parameter in patients with chronic hepatitis C. **Turk J Gastroenterol**, v. 22, n. 1, p. 47-53, 2011.
- PACKER, L.; VALACCHI, G. Antioxidants and the response of skin to oxidative stress: vitamin E as a key indicator. **Skin Pharmacol Appl Skin Physiol**, v. 15, n. 5, p. 282-290, 2002.
- PANASENKO, O. M.; GORUDKO, I. V.; SOKOLOV, A. V. Hypochlorous acid as a precursor of free radicals in living systems. **Biochemistry**, v. 78, n. 13, p. 1466-1489, 2013.

PANDEY, K. B.; MISHRA, N.; RIZVI, S. I. Protein oxidation biomarkers in plasma of type 2 diabetic patients. **Clin Biochem**, v. 43, n. 4, p. 508-511, 2010.

PEACOCK, W. F. et al. Myeloperoxidase in the diagnosis of acute coronary syndromes: the importance of spectrum. **Am Heart J**, v. 162, n. 5, p. 893-899, 2011.

PESKIN, A. V.; WINTERBOURN, C. C. Taurine chloramine is more selective than hypochlorous acid at targeting critical cysteines and inactivating creatine kinase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Free Radic Biol Med**, v. 40, n. 1, p. 45-53, 2006.

PHAM-HUY, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. **Int J Biomed Sci**, v. 4, n. 2, p. 89-96, 2008.

PHILLIPSON, M.; KUBES, P. The neutrophil in vascular inflammation. **Nat Med**, v. 17, n. 11, p. 1381-1390, 2011.

PILLAY, J. et al. In vivo labeling with  $2H_2O$  reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. **Blood**, v. 116, n. 4, p. 625-627, 2010.

PIWOWAR, A.; KNAPIK-KORDECKA, M.; WARWAS, M. AOPP and its relations with selected markers of oxidative/antioxidative system in type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 77, n. 2, p. 188-192, 2007.

PODREZ, E. A. Anti-oxidant properties of high-density lipoprotein and atherosclerosis. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 37, n. 7, p. 719-725, 2010.

PULLAR, J. M.; WINTERBOURN, C. C.; VISSERS, M. C. Loss of GSH and thiol enzymes in endothelial cells exposed to sublethal concentrations of hypochlorous acid. **Am J Physiol**, v. 277, n. 4, p. 1505-1512, 1999.

QUILLEY, J.; SANTOS, M.; PEDRAZA, P. Renal protective effect of chronic inhibition of COX-2 with SC-58236 in streptozotocin-diabetic rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 300, n. 6, p. 2316-2322, 2011.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 31, n. 5, p. 986-1000, 2011.

ROBERTS, R. A. et al. Toxicological and pathophysiological roles of reactive oxygen and nitrogen species. **Toxicology**, v. 276, n. 2, p. 85-94, 2010.

RONG, G. et al. Advanced oxidation protein products induce apoptosis in podocytes through induction of endoplasmic reticulum stress. **J Physiol Biochem**, v. 71, n. 3, p. 455-470, 2015.

SANTANGELO, F. Intracellular thiol concentration modulating inflammatory response: influence on the regulation of cell functions through cysteine prodrug approach. **Curr Med Chem**, v. 10, n. 23, p. 2599-2610, 2003.

SANTOS, R. C. et al. Fructose-1,6-bisphosphate reduces the mortality in *Candida albicans* bloodstream infection and prevents the septic-induced platelet decrease. **Inflammation**, v. 35, n. 4, p. 1256-1261, 2012.

SANTUS, P. et al. Oxidative stress and respiratory system: pharmacological and clinical reappraisal of N-acetylcysteine. **COPD**, v. 11, n. 6, p. 705-717, 2014.

- SEBEKOVÁ, K. et al. Advanced oxidation protein products and advanced glycation end products in children and adolescents with chronic renal insufficiency. **J Ren Nutr**, v. 22, n. 1, p. 143-148, 2012.
- SELMECI, L. et al. Human blood plasma advanced oxidation protein products (AOPP) correlates with fibrinogen levels. **Free Radic Res**, v. 40, n. 9, p. 952-958, 2006.
- SHAHAB, U. Hydroxyl radical modification of collagen type II increases its arthritogenicity and immunogenicity. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. 31190-31199, 2012.
- SHAROV, V. S. et al. Diastereoselective reduction of protein-bound methionine sulfoxide by methionine sulfoxide reductase. **FEBS Lett**, v. 455, n. 3, p. 247-250, 1999.
- SHI, X. Y. et al. Advanced oxidation protein products promote inflammation in diabetic kidney through activation of renal nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. **Endocrinology**, v. 149, n. 4, p. 1829-1839, 2008.
- SHLIPAK, M. G. et al. Rapid decline of kidney function increases cardiovascular risk in the elderly. **J Am Soc Nephrol**, v. 20, n. 12, p. 2625-2630, 2009.
- SHRINGARPURE, R.; DAVIES, K. J. Protein turnover by the proteasome in aging and disease. **Free Radic Biol Med**, v. 32, n. 11, p. 1084-1089, 2002.
- SIMMONS, D. L.; BOTTING, R. M.; HLA, T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. **Pharmacol Rev**, v. 56, n. 3, p. 387-437, 2004.
- SKVARILOVÁ, M. et al. Increased level of advanced oxidation products (AOPP) as a marker of oxidative stress in patients with acute coronary syndrome. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v. 149, n. 1, p. 83-87, 2005.
- SOHAL, R. S. Oxidative stress hypothesis of aging. **Free Radic Biol Med**, v. 33, n. 5, p. 573-574, 2002.
- SOKOLOV, A. V. et al. Kinetic method for assaying the halogenating activity of myeloperoxidase based on reaction of celestine blue B with taurine halogenamines. **Free Radic Res**, v. 49, n. 6, p. 777-789, 2015.
- SOLA, A. et al. Fructose-1,6-biphosphate and nucleoside pool modifications prevent neutrophil accumulation in the reperfused intestine. **J Leukoc Biol**, v. 73, n. 1, p. 74-81, 2003.
- SRISAWAT, N. et al. Recovery from acute kidney injury: determinants and predictors. **Contrib Nephrol**, v. 165, p. 284-291, 2010.
- STADTMAN, E. R.; LEVINE, R. L. Protein oxidation. **Ann N Y Acad Sci**, v. 899, p. 191-208, 2000.
- STARK, M. A. et al. Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. **Immunity**, v. 22, n. 3, p. 285-294, 2005.
- SUMMERS, F. A. et al. Identification of plasma proteins that are susceptible to thiol oxidation by hypochlorous acid and N-chloramines. **Chem Res Toxicol**, v. 21, n. 9, p. 1832-1840, 2008.



TERAWAKI, H. et al. The redox state of albumin and serious cardiovascular incidence in hemodialysis patients. **Ther Apher Dial**, v. 14, n. 5, p. 465-471, 2010.

TESHIMA, Y. et al. Production of reactive oxygen species in the diabetic heart. Roles of mitochondria and NADPH oxidase. **Circ J**, v. 78, n. 2, p. 300-306, 2014.

TORBITZ, V. D. et al. In vitro oxidation of fibrinogen promotes functional alterations and formation of advanced oxidation protein products, an inflammation mediator. **Inflammation**, v. 38, n. 3, p. 1201-1206, 2015.

TOVBIN, D. et al. Induction of protein oxidation by intravenous iron in hemodialysis patients: role of inflammation. **Am J Kidney Dis**, v. 40, n. 5, p. 1005-1012, 2002.

TRABER, M. G.; ATKINSON, J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. **Free Radic Biol Med**, v. 43, n. 1, p. 4-15, 2007.

TRACHOOTHAM, D. et al. Redox regulation of cell survival. **Antioxid Redox Signal**, v. 10, n. 8, p. 1343-1374, 2008.

TSIKAS, D.; SCHWEDHELM, E.; FRÖLICH, J. C. Methodological considerations on the detection of 3-nitrotyrosine in the cardiovascular system. **Circ Res**, v. 90, n. 6, p. 70-76, 2002.

TUCKER, P. S. et al. Clinical and research markers of oxidative stress in chronic kidney disease. **Biomarkers**, v. 18, n. 2, p. 103-115, 2013.

TURELL, L. et al. Sulfenic acid--a key intermediate in albumin thiol oxidation. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 877, n. 28, p. 3384-3392, 2009.

VALENTE, A. J. et al. Advanced oxidation protein products induce cardiomyocyte death via Nox2/Rac1/superoxide-dependent TRAF3IP2/JNK signaling. **Free Radic Biol Med**, v. 60, p. 125-135, 2013.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interact**, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

VAN DER VLIET, A. et al. Myeloperoxidase and protein oxidation in cystic fibrosis. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 279, n. 3, p. 537-546, 2000.

VARGA, Z. et al. Effects of tocopherols and 2,2'-carboxyethyl hydroxychromans on phorbol-ester-stimulated neutrophils. **J Nutr Biochem**, v. 19, n. 5, p. 320-327, 2008.

VICTOR, V. M.; ROCHA, M.; DE LA FUENTE, M. Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. **Int Immunopharmacol**, v. 4, n. 3, p. 327-347, 2004.

WANG, J. C. et al. AOPPs induce MCP-1 expression by increasing ROS-mediated activation of the NF- $\kappa$ B pathway in rat mesangial cells: inhibition by sesquiterpene lactones. **Cell Physiol Biochem**, v. 32, n. 6, p. 1867-1877, 2013.

WARDMAN, P.; VON SONNTAG, C. Kinetic factors that control the fate of thiyl radicals in cells. **Methods Enzymol**, v. 251, p. 31-45, 1995.

WATSON, R. W. et al. Regulation of Fas antibody induced neutrophil apoptosis is both caspase and mitochondrial dependent. **FEBS Lett**, v. 453, n. 1, p. 67-71, 1999.

WEI, X. F. et al. Advanced oxidation protein products induce mesangial cell perturbation through PKC-dependent activation of NADPH oxidase. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 296, n. 2, p. 427-437, 2009.

WEISS, S. J. Tissue destruction by neutrophils. **N Engl J Med**, v. 320, n. 6, p. 365-376, 1989.

WHEELER, M. A. et al. Bacterial infection induces nitric oxide synthase in human neutrophils. **J Clin Invest**, v. 99, n. 1, p. 110-116, 1997.

WITKO-SARSAT, V. et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. **Kidney Int**, v. 49, n. 5, p. 1304-1313, 1996.

WITKO-SARSAT, V. et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. **J Immunol**, v. 161, n. 5, p. 2524-2532, 1998.

WITKO-SARSAT, V. et al. AOPP-induced activation of human neutrophil and monocyte oxidative metabolism: a potential target for N-acetylcysteine treatment in dialysis patients. **Kidney Int**, v. 64, n. 1, p. 82-91, 2003.

WITKO-SARSAT, V. et al. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. **Lab Invest**, v. 80, n. 5, p. 617-653, 2000.

WU, Q. et al. Advanced oxidation protein products induce chondrocyte apoptosis via receptor for advanced glycation end products-mediated, redox-dependent intrinsic apoptosis pathway. **Apoptosis**, v. 21, n. 1, p. 36-50, 2016.

XIE, F. et al. Advanced oxidation protein products induce intestine epithelial cell death through a redox-dependent, c-jun N-terminal kinase and poly (ADP-ribose) polymerase-1-mediated pathway. **Cell Death Dis**, v. 5, p. 996-1006, 2014.

XU, M. et al. Upregulated NADPH oxidase contributes to diabetic testicular complication and is relieved by strontium fructose 1,6-diphosphate. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v. 118, n. 7, p. 459-465, 2010.

ZHANG, H. et al. Glucagon-like peptide-1 protects cardiomyocytes from advanced oxidation protein product-induced apoptosis via the PI3K/Akt/Bad signaling pathway. **Mol Med Rep**, v. 13, n. 2, p. 1593-1601, 2016.

ZHAO, Y. et al. Sesquiterpene lactones inhibit advanced oxidation protein product-induced MCP-1 expression in podocytes via an IKK/NF- $\kappa$ B-dependent mechanism. **Oxid Med Cell Longev**, v. 93, p. 934058, 2015.

ZHENG, S. et al. Advanced oxidation protein products induce inflammatory response in fibroblast-like synoviocytes through NADPH oxidase -dependent activation of NF- $\kappa$ B. **Cell Physiol Biochem**, v. 32, n. 4, p. 972-985, 2013.

ZHONG, Z. M.; BAI, L.; CHEN, J. T. Advanced oxidation protein products inhibit proliferation and differentiation of rat osteoblast-like cells via NF-kappaB pathway. **Cell Physiol Biochem**, v. 24, n. 1, p. 105-114, 2009.

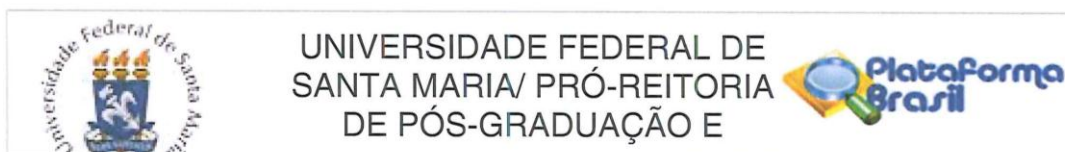
ZHOU, L. L. et al. The receptor of advanced glycation end products plays a central role in advanced oxidation protein products-induced podocyte apoptosis. **Kidney Int**, v. 82, n. 7, p. 759-770, 2012.

ZHOU, L. L. et al. Accumulation of advanced oxidation protein products induces podocyte apoptosis and deletion through NADPH-dependent mechanisms. **Kidney Int**, v. 76, n. 11, p. 1148-1160, 2009.

ZUWAŁA-JAGIEŁŁO, J. et al. Advanced oxidation protein products and inflammatory markers in liver cirrhosis: a comparison between alcohol-related and HCV-related cirrhosis. **Acta Biochim Pol**, v. 58, n. 1, p. 59-65, 2011.

## ANEXOS

## ANEXO A – PARECER DO CEP



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação dos efeitos dos produtos proteicos de oxidação avançada e do ácido úrico sobre vias oxidativas, inflamatórias e apoptóticas em neutrófilos humanos

**Pesquisador:** RAFAEL NOAL MORESCO

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 33649514.7.0000.5346

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 750.113

**Data da Relatoria:** 12/08/2014

**Apresentação do Projeto:**

Diferentes estruturas biológicas, incluindo proteínas plasmáticas como a albumina, são passíveis à oxidação. Em 1996, foi descrito um novo marcador do estresse oxidativo proteico em pacientes urêmicos, que foi denominado de produtos proteicos da oxidação avançada (AOPPs). Entende-se por AOPPs uma família heterogênea de compostos proteicos modificados estruturalmente, provenientes do estresse oxidativo, principalmente a partir da ação do ácido hipocloroso (HOCl) sintetizado pela mieloperoxidase (MPO), uma enzima amplamente expressa em células do sistema imunológico. Posteriormente, foi demonstrado que, além de ser um marcador fruto do estresse oxidativo, os AOPPs também desempenham um importante papel no progresso fisiopatológico, visto que este marcador é capaz de ativar células inflamatórias, induzindo e amplificando o estado pró-inflamatório. Além disso, a via MPO/HOCl não é a única capaz de formar estes compostos, e a reação de Fenton parece ser um contribuinte importante na produção de AOPPs. No entanto, os efeitos promovidos por AOPPs formados através da reação de Fenton sobre neutrófilos não são conhecidos.

Outro composto endógeno envolvido em reações redox é o ácido úrico. O ácido úrico é amplamente conhecido por sua capacidade antioxidante, exercendo efeitos protetores frente à

**Endereço:** Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar

**Bairro:** Camobi

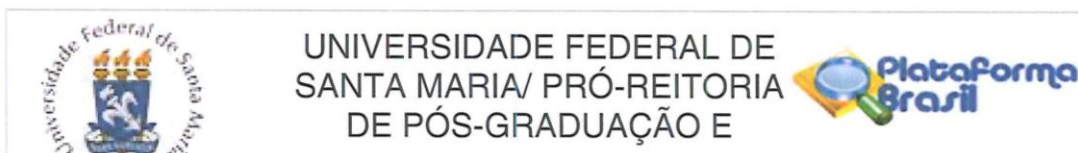
**CEP:** 97.105-970

**UF:** RS

**Município:** SANTA MARIA

**Telefone:** (55)3220-9362

**E-mail:** cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 750.113

inflamação e a radicais livres. Entretanto, alguns estudos tem proposto que a hiperuricemia pode ser um preditor para o desenvolvimento de síndrome metabólica, diabetes, hipertensão, doença renal e cardiovascular.

Neste contexto, mecanismos moleculares tem sido elucidados no intuito de compreender a associação do ácido úrico com diversas síndromes e patologias. No entanto, embora a ativação neutrofílica causada pelos cristais de urato monossódico durante a gota seja amplamente investigada, pouco se sabe a respeito dos efeitos diretos que o ácido úrico solúvel pode causar sobre os neutrófilos. Desta forma, este estudo tem como objetivo avaliar os efeitos dos AOPPs e do ácido úrico solúvel sobre as vias oxidativas, inflamatórias e apoptóticas a partir de um modelo in vitro utilizando neutrófilos humanos isolados.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Avaliar os efeitos dos AOPPs e do ácido úrico solúvel sobre as vias oxidativas, inflamatórias e apoptóticas a partir de um modelo in vitro utilizando neutrófilos humanos isolados.

#### **Específicos:**

- Padronizar um protocolo de isolamento de neutrófilos humanos;
- Padronizar técnicas para a avaliação da viabilidade de neutrófilos humanos, bem como verificar o tempo de vida dessas células pós-isolamento;

#### **Em neutrófilos humanos isolados:**

- Avaliar o efeito dos AOPPs e do ácido úrico sobre a viabilidade celular;
- Investigar as alterações induzidas pelos AOPPs e pelo ácido úrico sobre os níveis de NOx, bem como o envolvimento da óxido nítrico sintase (NOS) nestas alterações;
- Avaliar os efeitos dos AOPPs e do ácido úrico sobre a indução e potencialização na formação de AOPPs;
- Verificar os efeitos dos AOPPs e do ácido úrico sobre a atividade das enzimas arginase I e glutathione redutase (GR);
- Avaliar os efeitos dos AOPPs e do ácido úrico sobre os níveis de citocinas inflamatórias, incluindo interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral- (TNF-), e citocina anti-inflamatória, a interleucina-10 (IL-10);
- Investigar os efeitos dos AOPPs e do ácido úrico sobre a atividade das caspases 3,7 e 8;

**Endereço:** Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar

**Bairro:** Camobi

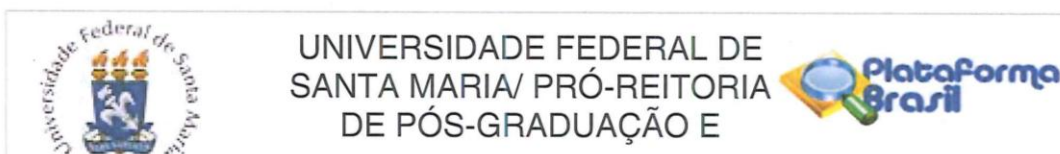
**CEP:** 97.105-970

**UF:** RS

**Município:** SANTA MARIA

**Telefone:** (55)3220-9362

**E-mail:** cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 750.113

- Verificar os efeitos dos AOPPs e do ácido úrico sobre o poder antioxidante redutor do ferro (FRAP) e capacidade antioxidante total (TAC);
- Avaliar os mecanismos envolvidos nas alterações de parâmetros oxidativo-inflamatórios e de morte celular induzidas pelos AOPPs e pelo ácido úrico.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

O projeto fica definido como de risco mínimo : eventual desconforto leve após a coleta de sangue, que poderá estar associada a uma sensação de dor e a um pequeno hematoma no local da coleta. Além disso, raramente pode ocorrer tromboflebite.

Como benefício, esta pesquisa propiciará o conhecimento a respeito de possíveis mecanismos envolvidos na associação entre ácido úrico/AOPPs e diversas patologias, o que contribuirá para uma avaliação mais cautelosa de pacientes apresentando hiperuricemia, bem como condições clínicas relacionadas com o processo inflamatório e o estresse oxidativo.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de uma pesquisa bem fundamentada, estruturada e delineada.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Estão todos presentes e adequados.

**Recomendações:**

.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

.

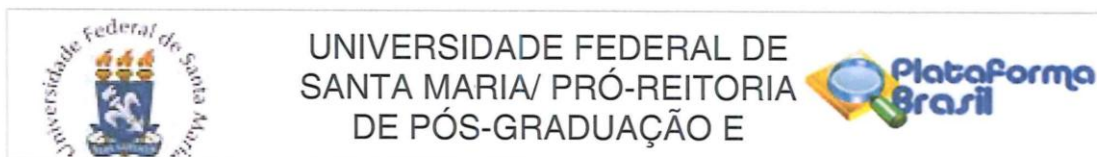
**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar  
 Bairro: Camobi CEP: 97.105-970  
 UF: RS Município: SANTA MARIA  
 Telefone: (55)3220-9362 E-mail: cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 750.113

SANTA MARIA, 13 de Agosto de 2014

---

Assinado por:  
**CLAUDEMIR DE QUADROS**  
(Coordenador)

**Endereço:** Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar  
**Bairro:** Camobi **CEP:** 97.105-970  
**UF:** RS **Município:** SANTA MARIA  
**Telefone:** (55)3220-9362 **E-mail:** cep.ufsm@gmail.com

**ANEXO B – PARECER DO CEP**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA  
DE PÓS-GRADUAÇÃO E

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Associação entre o metabolismo do ferro e o estresse oxidativo em pacientes submetidos à hemodiálise: avaliação do potencial prognóstico de biomarcadores laboratoriais

**Pesquisador:** RAFAEL NOAL MORESCO

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 16510213.1.0000.5346

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 280.761

**Data da Relatoria:** 14/05/2013

**Apresentação do Projeto:**

A insuficiência renal crônica (IRC) pode ser proveniente de uma série de afecções renais que resultam em perda da função renal, provocando um acúmulo de várias substâncias tóxicas. Pacientes com IRC submetidos à hemodiálise estão constantemente associados com estresse oxidativo em virtude da própria condição patológica, mas, sobretudo pelo tratamento hemodialítico que provoca aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs). Estudos recentes relatam que a anemia atua como outro fator contribuinte associado a IRC e ao estresse oxidativo, enquanto terapias adjuvantes, principalmente a administração de ferro intra-venoso, parecem potencializar ainda mais este processo.

**Objetivo da Pesquisa:**

O objetivo deste estudo visa aprofundar o conhecimento a respeito da associação do metabolismo do ferro e o estresse oxidativo na IRC, como também avaliar o potencial de diferentes biomarcadores na avaliação prognóstica de pacientes submetidos à hemodiálise.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos e benefícios previstos.

**Endereço:** Av. Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria 2º andar

**Bairro:** Cidade Universitária - Camobi **CEP:** 97.105-900

**UF:** RS **Município:** SANTA MARIA

**Telefone:** (55)3220-9362

**E-mail:** cep.ufsm@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA  
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



Continuação do Parecer: 280.761

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, projeto de doutorado. Será realizado um estudo transversal prospectivo com aproximadamente 120 pacientes adultos de ambos os sexos. Os indivíduos serão divididos em dois grupos: pacientes submetidos à hemodiálise (n=60), admitidos no serviço de hemodiálise da Fundação Hospitalar Santa Teresinha (FHST) do município de Erechim-RS e voluntários saudáveis oriundos deste mesmo município (n=60). Serão avaliados no sangue os seguintes parâmetros: hemograma completo, glicose, colesterol total, HDL colesterol, LDL colesterol, triglicérides, creatinina, uréia, ácido úrico, AST, ALT, GGT, albumina, ferro sérico, ferritina, transferrina, FRAP, IMA, NOx, TAS, TOS e AOPP. Os pacientes submetidos à hemodiálise serão acompanhados por 24 meses buscando investigar a associação entre o metabolismo do ferro e o estresse oxidativo em relação ao desfecho mortalidade.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Termos apresentados.

**Recomendações:**

Não há

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Tudo ok

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Endereço:** Av. Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria 2º andar

**Bairro:** Cidade Universitária - Camobi **CEP:** 97.105-900

**UF:** RS **Município:** SANTA MARIA

**Telefone:** (55)3220-9362

**E-mail:** cep.ufsm@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA  
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



Continuação do Parecer: 280.761

SANTA MARIA, 22 de Maio de 2013

---

**Assinador por:**  
**Félix Alexandre Antunes Soares**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av. Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria 2º andar

**Bairro:** Cidade Universitária - Camobi **CEP:** 97.105-900

**UF:** RS **Município:** SANTA MARIA

**Telefone:** (55)3220-9362

**E-mail:** cep.ufsm@gmail.com

## ANEXO C – PARECER DO CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA  
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DO PERFIL DE BIOMARCADORES ASSOCIADOS A PROCESSOS METABÓLICOS, INFLAMATÓRIOS, OXIDATIVOS E GENOTÓXICOS EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS E SUA ASSOCIAÇÃO COM O DESENVOLVIMENTO DE COMPLICAÇÕES CRÔNICAS

**Pesquisador:** RAFAEL NOAL MORESCO

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 12303113.0.0000.5346

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 236.696

**Data da Relatoria:** 11/03/2013

**Apresentação do Projeto:**

A prevalência do diabetes mellitus (DM) vem aumentando significativamente nas últimas décadas, sendo que as complicações crônicas representam a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes com esta patologia a longo prazo. Como o exato mecanismo pelo qual o DM leva ao desenvolvimento destas complicações é complexo, e não está ainda totalmente elucidado, o objetivo deste projeto será avaliar o perfil de biomarcadores associados a processos metabólicos, inflamatórios, oxidativos e genotóxicos em pacientes com DM e em pré-diabéticos, bem como sua associação com o desenvolvimento de complicações crônicas. Para isto, será realizado um estudo transversal prospectivo envolvendo 300 pacientes adultos, de ambos os sexos, com o diagnóstico de DM tipo 1 e 2. Também serão recrutados para o estudo cerca de 100 indivíduos prédiabéticos e 100 indivíduos saudáveis. Serão avaliados os seguintes parâmetros: níveis de insulina, creatinina, uréia, colesterol total, HDL colesterol, LDL colesterol, triglicérides, PCR-us, IL-6, IL-10, albumina, proteínas totais, IMA, NOx, ácido úrico, TNF- $\alpha$ , AST, ALT, ferro total, ferritina,

**Endereço:** Av. Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria 2º andar

**Bairro:** Cidade Universitária - Camobi

**CEP:** 97.105-900

**UF:** RS

**Município:** SANTA MARIA

**Telefone:** (55)3220-9362

**E-mail:** cep.ufsm@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA  
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



transferrina, sTfR, NTBI, TIBC, xantina, hipoxantina, xantina oxidase, xantina desidrogenase, NAG, AOPP, glutationa redutase, HbA1c, FRAP, TOS, índices hematimétricos, dano no DNA, albumina urinária, creatinina, GGT, FAL, KIM-1, NGAL, NAG. Também será avaliado o potencial prognóstico em relação ao desenvolvimento das complicações crônicas do DM e mortalidade durante um período de 24 meses dos biomarcadores envolvidos neste estudo.

**Objetivo da Pesquisa:**

Avaliar o perfil de biomarcadores associados a processos metabólicos, inflamatórios, oxidativos e genotóxicos em pacientes com diabetes mellitus, bem como em pré-diabéticos, a fim de investigar o potencial diagnóstico e prognóstico destes biomarcadores para o desenvolvimento de complicações crônicas do diabetes.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

adequados para o tipo de pesquisa realizada

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa com tema relevante, bem estruturada, com justificativa, objetivos e metodologia coerentes.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

adequados em sua nova versão

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

aprovar o projeto

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Endereço:** Av. Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria 2º andar

**Bairro:** Cidade Universitária - Camobi

**CEP:** 97.105-900

**UF:** RS

**Município:** SANTA MARIA

**Telefone:** (55)3220-9362

**E-mail:** cep.ufsm@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA  
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



SANTA MARIA, 03 de Abril de 2013

---

**Assinador por:**  
**Félix Alexandre Antunes Soares**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av. Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria 2º andar

**Bairro:** Cidade Universitária - Camobi **CEP:** 97.105-900

**UF:** RS **Município:** SANTA MARIA

**Telefone:** (55)3220-9362

**E-mail:** cep.ufsm@gmail.com