

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

**AVALIAÇÃO DO FIBRINOGENO COMO UMA NOVA
FONTE PARA A FORMAÇÃO *IN VITRO* DE
PRODUTOS PROTEICOS DE OXIDAÇÃO AVANÇADA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Vanessa Dorneles Torbitz

Santa Maria, RS, Brasil

2015

**AVALIAÇÃO DO FIBRINOGENO COMO UMA NOVA
FONTE PARA A FORMAÇÃO *IN VITRO* DE PRODUTOS
PROTEICOS DE OXIDAÇÃO AVANÇADA**

Vanessa Dorneles Torbitz

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

Orientador: Prof. Dr. Rafael Noal Moresco
Co-orientador: Prof. Dr. José Edson Paz da Silva

Santa Maria, RS, Brasil

2015

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

Torbitz, Vanessa Dorneles

Avaliação do fibrinogênio como uma nova fonte para a formação in vitro de produtos proteicos de oxidação avançada / Vanessa Dorneles Torbitz.-2015.

54 f.; 30cm

Orientador: Rafael Noal Moresco

Coorientador: José Edson Paz da Silva

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2015

1. Fibrinogênio 2. Estresse oxidativo 3. Produtos proteicos de oxidação avançada 4. Inflamação I. Moresco, Rafael Noal II. Silva, José Edson Paz da III. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

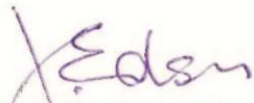
**AVALIAÇÃO DO FIBRINOGÊNIO COMO UMA NOVA FONTE
PARA A FORMAÇÃO *IN VITRO* DE PRODUTOS PROTEICOS DE
OXIDAÇÃO AVANÇADA**

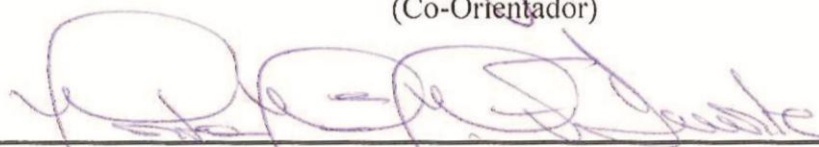
elaborada por
Vanessa Dorneles Torbitz

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA

Rafael Noal Moresco, Dr. (UFSM)
(Presidente-Orientador)


José Edson Paz da Silva, Dr. (UFSM)
(Co-Orientador)


Marta Maria Medeiros Frescura Duarte, Dr. (ULBRA)


Fábio Vasconcellos Comin, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 08 de julho de 2015.

Dedico este trabalho:

*À minha família, amigos, colegas e a todos que estiveram
comigo, incentivando-me durante esta caminhada.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pela minha vida e por fazer com que eu me torne a cada dia uma pessoa melhor, sustentando-me em seu braços nos momentos felizes e outros nem tanto;

Aos meus pais, Airton e Vera, exemplos de caráter nos quais me espelho, que ao meu lado lutaram, vibraram e choraram durante toda esta caminhada, pelo amor e carinho incondicionais e pela força e compreensão quando inúmeras vezes abdicaram de suas vontades para a realização das minhas;

Ao meu irmão, Douglas, que além de meu irmão, é meu grande amigo e que embora distante fisicamente, sempre demonstrou amor, carinho e preocupação com as minhas atividades;

Ao Professor Rafael, meu mestre, meu orientador, meu amigo, por ter me concedido a oportunidade de elencar o seu grupo de pesquisa quando eu era apenas uma adolescente no início da faculdade, obrigada por me ensinar valores como respeito, dedicação e caráter, os aprendizados durante estes quase cinco anos de convivência certamente contribuíram para a construção de quem eu sou hoje;

À toda equipe do LaBiClin, que como sempre falei, foi a minha família em Santa Maria, os quais me ensinaram que o maior presente que a pesquisa pode nos fornecer é a união, cumplicidade e carinho, agradeço pela amizade e compreensão, pelo momentos alegres e pelos tristes também, especialmente ao Guilherme e ao José, pela dedicação e contribuição para a realização deste trabalho;

Ao Professor Rodrigo Vaucher e ao meu co-orientador, Professor José Edson, pelos aprendizados e parcerias indispensáveis, os quais contribuíram grandemente para a concretização deste trabalho;

Aos meus amigos e colegas do curso de Farmácia da UFSM, os quais sempre estiveram ao meu lado comemorando as vitórias, oferecendo força e suporte durante as situações menos felizes e compreendendo os momentos em que estive ausente;

Aos componentes da banca, pela disponibilidade em avaliar e contribuir para o meu trabalho;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul – FAPERGS pela concessão da bolsa de estudos;

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de realizar este trabalho e engrandecer meu conhecimento;

A todos vocês, a minha eterna gratidão!

*“Se vocês permanecerem em mim, e as minhas
palavras permanecerem em vocês, pedirão
o que quiserem, e será concedido.”*

Bíblia Sagrada (João 15:7)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

AVALIAÇÃO DO FIBRINOGÊNIO COMO UMA NOVA FONTE PARA A FORMAÇÃO *IN VITRO* DE PRODUTOS PROTEICOS DE OXIDAÇÃO AVANÇADA

AUTORA: VANESSA DORNELES TORBITZ
ORIENTADOR: PROF. DR. RAFAEL NOAL MORESCO
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ EDSON PAZ DA SILVA
Local e Data da Defesa: Santa Maria, 08 de julho de 2015.

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de radicais livres, em particular espécies reativas de oxigênio (EROs), e a capacidade de defesa do organismo contra essas espécies, levando a um progressivo dano oxidativo. As proteínas são consideradas o principal alvo para o dano oxidativo, uma vez que estas são as maiores componentes dos sistemas biológicos e podem neutralizar 50 a 75% dos radicais livres. Recentemente, foi descrita uma nova classe de compostos formados em consequência do estresse oxidativo, designada como produtos proteicos de oxidação avançada (AOPP). O acúmulo de AOPP foi primeiramente descrito em pacientes com insuficiência renal crônica submetidos à hemodiálise e, posteriormente, verificou-se que este marcador está envolvido em uma série de condições patológicas, como diabetes, aterosclerose, obesidade e insuficiência renal aguda. Estudos prévios têm identificado AOPP como um novo marcador de dano oxidativo a proteínas e uma nova classe de mediadores inflamatórios, promovendo efeitos tanto a nível celular, quanto a nível sistêmico. Neste contexto, diferentes estruturas biológicas, incluindo proteínas plasmáticas como a albumina e o fibrinogênio, são passíveis a oxidação por EROs. Sabe-se que a albumina é o principal alvo do estresse oxidativo no plasma de pacientes urêmicos, no entanto, já foi demonstrado que o fibrinogênio também é passível de sofrer modificações oxidativas. Considerando que os processos inflamatórios e oxidativos estão envolvidos na fisiopatologia de uma série de condições clínicas e que AOPP é um biomarcador que pode refletir essas alterações, é de extrema relevância a avaliação da susceptibilidade de outras proteínas à formação desses produtos, além da albumina. Assim, o principal objetivo deste estudo foi investigar a formação de AOPP a partir do fibrinogênio em um modelo *in vitro*, bem como avaliar alterações estruturais e funcionais na molécula desta proteína pró-coagulante. Desse modo, para a promoção de AOPP *in vitro*, o fibrinogênio foi exposto ao ácido hipocloroso (HOCl) em diversas concentrações (1, 2 e 4mM). Após a verificação da efetividade do fibrinogênio em produzir AOPP, foi demonstrado que a formação destes produtos promove alterações funcionais no fibrinogênio, causando modificações em seus domínios estruturais e aumentando sua atividade pró-coagulante. Portanto, o fibrinogênio pode ser considerado uma fonte de formação de AOPP e as alterações provocadas por este processo na molécula desta proteína, podem estar relacionadas a diversas condições patológicas envolvendo o sistema da coagulação e contribuir especialmente, no desenvolvimento de processos trombóticos.

Palavras-chave: Fibrinogênio. Estresse oxidativo. Produtos proteicos de oxidação avançada. Inflamação.

ABSTRACT

Master Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

EVALUATION OF FIBRINOGEN AS A NEW SOURCE FOR *IN VITRO* FORMATION OF ADVANCED OXIDATION PROTEIN PRODUCTS

AUTHOR: VANESSA DORNELES TORBITZ
ADVISOR: PROF. DR. RAFAEL NOAL MORESCO
CO-ADVISOR: PROF. DR. JOSÉ EDSON PAZ DA SILVA
Place and Date: Santa Maria, July 08, 2015.

Oxidative stress is characterized by an imbalance between the production of free radicals, particularly reactive oxygen species (ROS), and the defense capacity of the organism against these species, leading to a progressive oxidative damage. Proteins are considered to be the primary target for oxidative damage, since they are major components of biological systems and may neutralize 50 to 75% of free radicals. Recently, a new class of compounds formed as a result of oxidative stress was described, referred to as advanced oxidation protein products (AOPP). The accumulation of AOPP was first described in patients with chronic renal failure on hemodialysis and subsequently it was found that this marker is involved in a number of pathological conditions such as diabetes, atherosclerosis, obesity, and acute renal failure. Previous studies have identified AOPP as a new marker of oxidative damage to proteins and a new class of inflammatory mediators promoting effects both at the cellular level, as at systemic level. In this context, different biological structures, including plasma proteins such as albumin and fibrinogen are susceptible to oxidation by ROS. It is known that albumin is the major target of oxidative stress in plasma of uremic patients, however, it has been demonstrated that the fibrinogen is also capable of undergoing oxidative modification. Whereas the oxidative and inflammatory processes are involved in the pathophysiology of a number of clinical conditions and AOPP is a biomarker which can reflect these changes, it is extremely important to evaluate the susceptibility of other proteins to the formation of these products, in addition to albumin. Thus, the aim of this study was to investigate the formation of AOPP from the fibrinogen in an *in vitro* model and evaluate structural and functional changes in the molecule of this pro-coagulant protein. Thus, to promote *in vitro* AOPP, fibrinogen was exposed to hypochlorous acid (HOCl) at various concentrations (1, 2 and 4 mM). After checking the effectiveness of fibrinogen to produce AOPP, was demonstrated that the formation of these products promotes functional alterations in fibrinogen, causing changes in their structural domains and increasing their procoagulant activity. Therefore, the fibrinogen can be considered a source of AOPP formation and deterioration caused by this process in the molecule of this protein, may be related to several pathological conditions involving coagulation system and contribute especially in the development of thrombotic processes.

Keywords: Fibrinogen. Oxidative stress. Advanced oxidation protein products. Inflammation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação esquemática da molécula de fibrinogênio.

ARTIGO

Figura 1. Curva de concentração HOCl vs. FB

Figura 2. Curva de concentração FB vs. FB-AOPP

Figura 3. Quantificação espectrofotométrica do FB

Figura 4. Efeito da oxidação do FB sobre os padrões eletroforéticos

Figura 5. Atividade do FB oxidado

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AOPP - Produtos proteicos de oxidação avançada
- ERNs - Espécies reativas de nitrogênio
- EROs - Espécies reativas de oxigênio
- FB - Fibrinogênio
- FLM - Materiais semelhantes ao fibrinogênio
- H₂O₂ -Peróxido de hidrogênio
- HOCl - Ácido hipocloroso
- IL-1 - Interleucina 1
- IL-6 - Interleucina 6
- MPO - Mieloperoxidase
- PDFs - Produtos de degradação de fibrina/fibrinogênio

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – Artigo científico no formato publicado no periódico Inflammation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Fibrinogênio	17
1.2 Processos oxidativos envolvendo o fibrinogênio	19
1.3 Produtos proteicos de oxidação avançada	23
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral	25
2.2 Objetivos específicos	25
3 ARTIGO CIENTÍFICO	26
4 CONCLUSÕES	43
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
ANEXO	49

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo, o qual se encontra no item **ARTIGO CIENTÍFICO**. As seções Materiais e Métodos, Resultados e Discussão encontram-se no próprio artigo e representam a íntegra deste estudo. O item **CONCLUSÕES**, encontrado no final desta dissertação, apresenta interpretações e comentários gerais sobre o artigo científico contido neste trabalho. As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO** e **CONCLUSÕES** desta dissertação, uma vez que as referências utilizadas para a elaboração do artigo estão mencionadas no próprio artigo.

1 INTRODUÇÃO

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 principais e mais reativos radicais livres são representados pelas espécies reativas de oxigênio (EROs), que são derivadas de reações que envolvem o oxigênio molecular. Este pode sofrer redução tetravalente com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água (H_2O). Durante este processo, são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila (OH^{\cdot}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Quando a geração de radicais livres excede a capacidade antioxidante do organismo, ocorre um desequilíbrio no estado *redox* celular, promovendo o estresse oxidativo (HALLIWELL, 2006).

Nas últimas décadas, o papel dos radicais livres em processos fisiopatológicos relacionados ao estresse oxidativo tem sido intensamente investigado (ROBERTS et al., 2009). Diferentes estruturas biológicas, incluindo proteínas plasmáticas como a albumina e o fibrinogênio (FB), são passíveis a oxidação por EROs. Himmelfarb & MacMonagle (2001) demonstraram que a albumina é o principal alvo do estresse oxidativo no plasma de pacientes urêmicos. No entanto, já foi demonstrado que o FB também é passível de sofrer modificações oxidativas (SELMECI et al., 2006). FB é uma proteína solúvel, abundantemente encontrada no plasma, constituída por cadeias ligadas por pontes dissulfeto (MOESSON, 2005). Além de ser considerado uma molécula chave no processo de coagulação, o FB apresenta alta susceptibilidade ao ataque oxidativo e a modificações pós-transducionais (SHACTER et al., 1994).

Em 1996 foi descrito um novo marcador do estresse oxidativo proteico em pacientes urêmicos, denominado de produtos proteicos de oxidação avançada (AOPP) (WITKO-SARSAT et al., 1996). AOPP compreende uma família heterogênea de compostos proteicos modificados estruturalmente, provenientes do estresse oxidativo, principalmente a partir do ácido hipocloroso (HOCl) sintetizado pela mieloperoxidase (MPO), uma enzima amplamente expressa em células do sistema imunológico. 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, o que promoverá, conseqüentemente, o acúmulo de AOPP plasmático. Além disso, foi demonstrado que os AOPP também desempenham um importante

papel no progresso fisiopatológico, visto que este marcador é capaz de ativar células inflamatórias, como monócitos, macrófagos e neutrófilos, induzindo e amplificando o estado pró-inflamatório (WITKO-SARSAT et al., 2003).

Considerando que os processos inflamatórios e oxidativos estão envolvidos na fisiopatologia de uma série de condições clínicas e que AOPP é um biomarcador que pode refletir essas alterações, é de grande aplicabilidade clínica a avaliação da susceptibilidade de outras proteínas além da albumina à formação desses produtos. Assim, este estudo tem como objetivo investigar a formação de AOPP em um modelo *in vitro*, partir da exposição do FB ao HOCl, além de verificar se a formação destes produtos pode estar associada a alterações funcionais na molécula desta proteína pró-coagulante.

1.1 Fibrinogênio

Fibrinogênio é uma glicoproteína essencial para a função plaquetária, especialmente para a agregação. Possui peso molecular de 340 kDa e três pares de cadeias polipeptídicas (α , β e γ) unidas por pontes dissulfeto. Esta molécula consta de três domínios estruturais, sendo uma região central que contém os fibrinopeptídios A e B e a região NH₂-terminal de seis cadeias polipeptídicas; duas regiões distais conectadas a anterior por seus segmentos helicoidais e as regiões carboxiterminais das cadeias α , β e γ (MOSESSON et al., 2001), conforme ilustrado na Figura 1.

É sintetizado primariamente no fígado, onde sua produção é regulada por estímulos pró-inflamatórios, como a interleucina-1 (IL-1) e a interleucina-6 (IL-6), e a sua síntese é estimulada em resposta a infecções e outros processos inflamatórios (PEREZ et al., 1999). O FB representa uma das proteínas mais abundantes no plasma sanguíneo com uma concentração média de 150-300 mg/dL e uma meia-vida em humanos de 3-5 dias (COLLEN et al., 1972). Em situações de lesão tissular e inflamação, ocorre ativação da trombina, uma importante enzima da cascata da coagulação a qual se une ao FB circulante, liberando os fibrinopeptídios A e B e formando os monômeros de fibrina, processo este, que influencia diretamente nos parâmetros da coagulação (SCOTT et al., 2004).

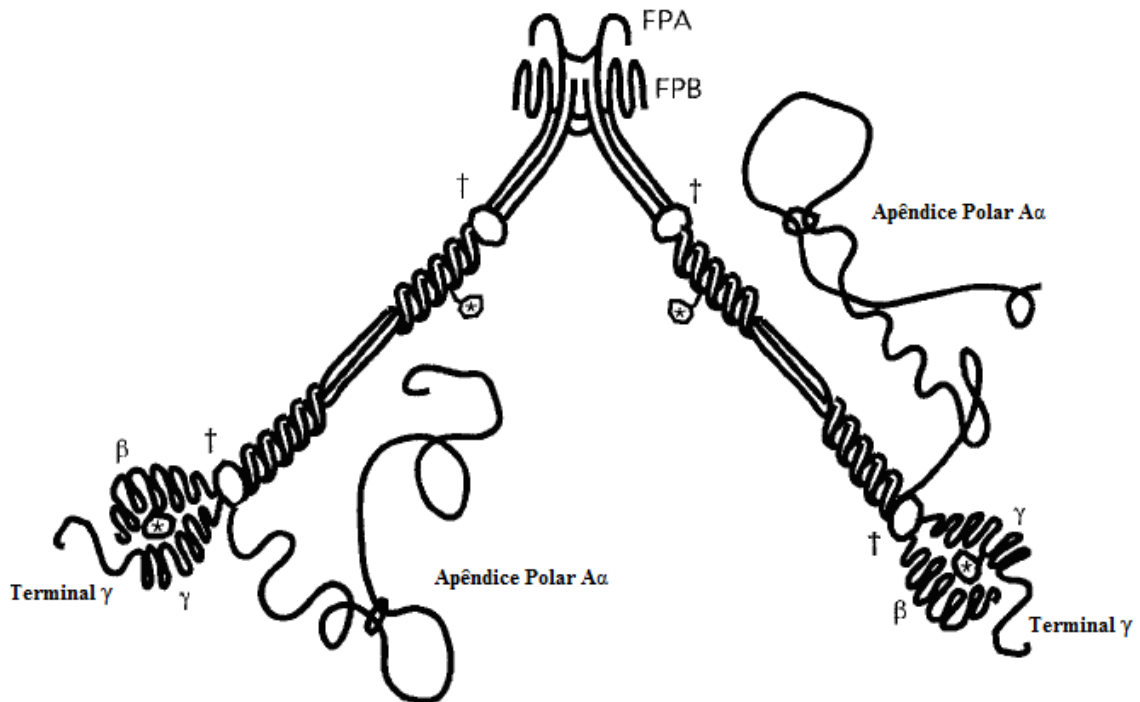


Figura 1. Representação esquemática da molécula de fibrinogênio. A estrutura básica consiste em três pares de cadeias polipeptídicas α , β e γ . FPA e FPB representam os fibrinopeptídeos A e B. * Grupos de Carboidratos. † Anéis dissulfeto. (Reproduzido por FUSS, 2004).

Diversas influências genéticas e ambientais permitem explicar as importantes variações detectadas nos valores de FB em diferentes populações (HUMPHRIES et al., 1999). No entanto, alguns estudos demonstraram que os determinantes ambientais desempenham um papel mais importante sobre as variações plasmáticas dessa proteína. O FB é uma proteína de fase aguda cuja concentração aumenta em numerosas situações como idade avançada, sexo feminino, menopausa, hipertensão arterial, tabagismo, diabetes, dislipidemia, obesidade, inflamação e infecções (MARGAGLIONE et al., 1998).

Esta proteína desempenha um papel essencial na coagulação sanguínea, agregação plaquetária e também está envolvida no processo inflamatório e na aterogênese (ERNST & RESCH, 1993). Neste contexto, estados inflamatórios agudos estão relacionados com um aumento dos valores de FB, principalmente quando estão associados à enfermidade vascular (MEADE et al., 1987). Além disso, esta proteína também tem sido associada com a síndrome metabólica. Deficiências hereditárias, insuficiência hepática e coagulação intravascular disseminada são situações na qual há uma redução nos níveis de FB (LINDAHL et al., 1996).

As concentrações de FB e produtos da degradação de fibrina/fibrinogênio (PDFs) também podem fornecer informações adicionais a respeito da hemostasia, a qual é um

processo fisiológico que tem como objetivos a manutenção da integridade e do fluxo vascular e o controle da hemorragia e trombose. Este processo depende de interações complexas entre o endotélio vascular, plaquetas, fatores de coagulação (e seus co-fatores) e fatores fibrinolíticos. Em adição, as plaquetas, fundamentais para a hemostasia, são ativadas, aderem ao local da adesão e secretam substâncias necessárias para a coagulação e para o processo de cicatrização, formando agregados que impedem a perda sanguínea (SMITH, 2010). Além disso, o FB exerce efeitos relevantes sobre a função plaquetária, visto que a hiperagregabilidade de plaquetas está associada com hiperfibrinogenemia e trombose (SCHNEIDER et al., 2001).

Considerando que o FB exerce um importante papel em uma série de condições patológicas, Maresca et al. (1999) demonstraram que os níveis plasmáticos de FB são preditores independentes de doenças cardiovasculares. Além disso, foi relatado que modificações oxidativas em proteínas também podem estar envolvidas no desenvolvimento de processos isquêmicos (TAJES et al., 2013) e que alterações na estrutura molecular do FB humano, como exemplo, a nitração dos resíduos de tirosina, resultou na aceleração da formação de coágulos de fibrina *in vitro* e *in vivo* (PARASTATIDIS et al., 2007).). III-Raga et al. (2015) também demonstraram que o estresse nitrativo pode afetar o processo de coagulação, através de um análise por tromboelastometria, a qual demonstrou que inicialmente a nitrotirosinação do fibrinogênio retarda a formação de coágulos, porém mais tardiamente fazem esses coágulos mais resistentes à fibrinólise. Assim, a nitração do FB pode ser considerada um importante fator para o desencadeamento de doenças cardiovasculares (CASTELLI et al., 1986).

1.2 Processos oxidativos envolvendo o fibrinogênio

O estresse oxidativo é um estado de desequilíbrio entre a produção de radicais livres, em particular EROs, 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. Essa característica confere um alto poder de reatividade aos radicais livres (HALLIWELL, 2006). As EROs, bem como as espécies reativas de nitrogênio (ERNs), são produzidas de forma contínua em concentrações fisiológicas pelo metabolismo celular

(VALKO et al., 2006). No entanto, em situação de desequilíbrio entre a formação e a remoção dessas espécies 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).

EROs podem ser derivados de fontes exógenas como a exposição a irradiações gama e ultravioleta, poluentes ambientais, tabagismo, drogas, álcool, pesticidas e solventes industriais, como também de processos essenciais do metabolismo endógeno (SHACTER, 2000). A formação das EROs ocorre continuamente nas células, em consequência de reações enzimáticas e não enzimáticas. Nas células dos mamíferos, locais conhecidos de geração de EROs incluem a mitocôndria e o retículo endoplasmático. Nos peroxissomos, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é produzido pela beta oxidação dos ácidos graxos (OCKNER et al, 1993), a qual também pode produzir radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), via transferência de elétron catalizada pela enzima Acetil-CoA oxidase (SCHONFELD et al., 2009). O estresse oxidativo favorece a ocorrência de ataques das EROs a componentes celulares, podendo resultar em danos oxidativos a macromoléculas e diversas estruturas celulares, tecidos e órgãos, intervindo, assim, em inúmeras funções fisiológicas vitais. Este processo está envolvido em uma grande variedade de condições patológicas e acredita-se que seja um agente patogênico em muitas dessas condições (DHALLA et al., 2000; VICTOR et al., 2009). Neste contexto, há uma constante investigação de substâncias biológicas que possam servir como potenciais biomarcadores em condições clínicas associadas à formação de EROs. Além disso, o estresse oxidativo pode ser considerado um importante alvo para o desenvolvimento de terapias farmacológicas que, ao reduzir ou prevenir o dano oxidativo, conferem proteção aos componentes celulares.

As proteínas são importantes alvos de várias modificações causadas pelo estresse oxidativo, levando a alterações estruturais e, conseqüentemente, a perda parcial ou total de suas funções (SILVA et al., 2015). O FB participa de um importante percentual destas proteínas plasmáticas, as quais podem sofrer modificações pós-translacionais em suas moléculas (MARTINEZ et al., 2013). Dentre essas modificações estão as reações de oxidação, que induzem a alterações nos resíduos de aminoácidos, alterando a estrutura e função das proteínas, além de poderem ocasionar a formação de ligações *cross-linking* e fragmentação proteica (DALLE-DONNE et al., 2006).

Como as proteínas desempenham diversas funções biológicas, o dano a essas estruturas pode promover várias conseqüências, incluindo alterações na atividade fisiológica destas moléculas (DALLE-DONNE et al., 2006). Dentre esses efeitos, destacam-se o dano a

enzimas, o qual promove modificações severas no metabolismo, e o dano a proteínas estruturais como, por exemplo, o FB, que pode resultar na inibição da coagulação (SHACTER, 2000). Um exemplo de marcador bem estabelecido de dano oxidativo proteico é a formação de grupos carbonil. Estes 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. Esses derivados carbonílicos, como o glioxal, metilglioxal, acroleína e o malondialdeído são compostos altamente reativos, resultantes tanto da oxidação das cadeias laterais de arginina, lisina, treonina e prolina ou ainda pela clivagem das ligações peptídicas (LIPINSKI, 2001). Os grupos carbonil também podem ser introduzidos nas proteínas através da decomposição oxidativa dos ácidos graxos poliinsaturados, gerando aldeídos, os quais reagem diretamente com os resíduos de lisina, histidina e cisteína. Por fim, os grupos carbonil ainda podem ser introduzidos nas proteínas através da reação do grupo amino primário da lisina com derivados carbonil reativos produzidos pela reação com os açúcares redutores (DALLE-DONE et al., 2006). Assim, o conteúdo de proteína carbonil pode ser considerado um biomarcador abrangente e inespecífico de dano oxidativo proteico. Uma vez formados, os grupos carbonil são quimicamente estáveis, o que facilita a sua detecção (DALLE-DONNE et al., 2006).

Existem outros tipos de modificações proteicas que podem ser induzidas por EROs, incluindo a perda de grupamentos tióis (-SH), a formação de ligações dissulfeto, sulfóxido de metionina, ligações ditirosina, nitrotirosina e glicoxidação. A perda de grupos -SH das proteínas pode ser induzida por várias EROs e é uma das respostas mais precoces em uma situação de estresse oxidativo (SHACTER, 2000). A formação de ligações ditirosina é outra importante modificação oxidativa que acomete as proteínas e estas ligações são formadas através da dimerização do aminoácido tirosina, sendo a formação destas ligações um marcador de dano oxidativo proteico (WITKO-SARSAT et al., 1996).

Devido as proteínas serem consideradas as macromoléculas mais suscetíveis ao dano oxidativo (DAVIES et al., 1999), a exposição de uma proteína a compostos reativos leva a modificações covalentes nas cadeias laterais de seus aminoácidos, que incluem a formação de grupos sulfóxido de metionina, ditirosina e grupos carbonil (ISCHIROPOULOS et al., 1998). Estas alterações induzem efeitos funcionais, incluindo modificação do sítio de ativação, inativação de enzimas e susceptibilidade à degradação proteolítica. Nesse contexto, evidências indicam que estas modificações oxidativas, como a nitração de proteínas plasmáticas envolvidas na coagulação sanguínea, podem levar à alteração do processo

hemostático (STIEF et al., 2000). Foi demonstrado que as proteínas plasmáticas apresentam susceptibilidade diferencial à modificação oxidativa, e, sobretudo, o FB é altamente susceptível ao ataque oxidante (SHACTER et al., 1995).

O FB oxidado está presente no plasma de pacientes com câncer de pulmão e fumantes (PIGNATELLI et al., 2001) e esta oxidação altera a sua atividade, bem como a agregação plaquetária (BELISARIO et al., 1997). Além disso, também foi evidenciado que pacientes diabéticos com complicações ateroscleróticas apresentaram depósitos fibrosos intravasculares que continham, além de LDL - colesterol oxidado, substâncias denominadas materiais semelhantes a fibrinogênio (FLM), e tem sido sugerido que a formação destas FLM está associada com a formação de ligações ditirosina entre as cadeias α do FB (LIPINSKI, 2001). O FB modificado por nitração, induzida por peroxinitrito, também foi encontrado no plasma de pacientes com síndrome do desconforto respiratório agudo e doença arterial coronariana (VADSETH et al., 2004).

Desse modo, há outros estudos que demonstraram que a nitração do FB pode levar a um aumento da taxa de formação do coágulo de fibrina, diminuição da taxa de lise do coágulo e alteração estrutural do coágulo de fibrina, bem como de suas propriedades viscoelásticas (VADSETH et al., 2004). Estes efeitos funcionais indicam que o FB oxidado por nitração pode representar um fator de risco para trombose durante a inflamação e estresse oxidativo (NOWAK et al., 2007).

Lee & Shacter (1995) observaram que o FB é uma proteína altamente susceptível à modificação oxidativa em comparação com outras proteínas plasmáticas. O FB e a albumina são proteínas que podem atuar como antioxidantes. Isso se deve a presença de aminoácidos em suas estruturas que possuem afinidade por espécies reativas, neutralizando o efeito pró-oxidante das mesmas (HALLIWELL et al., 1995). Nesse contexto, Karpel et al. (1991) demonstraram que radicais O_2^{\cdot} produzidos através da reação entre Cu^{2+} e ascorbato induziram modificações oxidativas no FB. Neste estudo, o FB comportou-se como uma molécula antioxidante, neutralizando as espécies reativas e, conseqüentemente, sofrendo alterações oxidativas. Além disso, a oxidação do FB conduziu a distúrbios do processo de coagulação (KARPEL et al., 1991).

Embora a concentração de albumina no plasma seja superior a do FB, durante o processo inflamatório ocorre um aumento da síntese de proteínas de fase aguda de elevados pesos moleculares, tais como ceruloplasmina (230kDa) e FB (340kDa). Nesse contexto, essas proteínas de fase aguda são consideradas antioxidantes complementares e são necessárias para neutralizar a produção excessiva de EROs liberadas pelos leucócitos ativados. Assim, estas

proteínas de elevado peso molecular são antioxidantes úteis na detoxificação de espécies reativas durante o processo oxidativo e no aumento de radicais livres decorrentes de condições inflamatórias, resultando na oxidação dessas proteínas (OLINESCU, 2001).

Desta forma, há uma constante investigação de indicadores biológicos que possam servir como potenciais biomarcadores em condições clínicas associadas ao estresse oxidativo. Neste contexto, a mensuração dos níveis de AOPP, os quais são considerados uma família heterogênea de compostos modificados oxidativamente, pode servir como um biomarcador de uma série de modificações oxidativas, como a formação de grupamentos carbonil e ligações ditirosina.

1.3 Produtos proteicos de oxidação avançada

A avaliação de biomarcadores das reações que envolvem as EROs tem potencial não apenas de determinar a extensão do dano oxidativo, mas também de prever a eficiência das estratégias terapêuticas destinadas a reduzir ou prevenir os danos promovidos pelo estresse oxidativo. Desse modo, o desenvolvimento de biomarcadores validados para doenças humanas é essencial para melhorar o diagnóstico e acelerar o desenvolvimento de novas terapias (COLOMBO et al., 2015). Há aproximadamente duas décadas, foi descrita e caracterizada uma nova classe de compostos formados em consequência do estresse oxidativo, designada como AOPP (WITKO-SARSAT et al., 1996). Esses compostos são considerados um grupo heterogêneo de proteínas, predominantemente a albumina, modificadas principalmente pela ação do HOCl (HENLE et al., 1999). Este ácido é um dos oxidantes formados *in vivo* pela ação da enzima MPO que catalisa a reação entre o íon cloreto (Cl⁻) e o H₂O₂ para gerar grandes quantidades de HOCl (KETTLE et al., 1997).

Evidências crescentes sugerem que as AOPP são mediadores patogênicos envolvidos em uma série de transtornos fisiológicos, o que justifica a necessidade urgente de compreender os seus efeitos sobre as células, tecidos e órgãos (XIE et al., 2014). Análises de espécies moleculares e das propriedades espectrais dos AOPP demonstraram que há modificações estruturais, como a formação de grupamentos carbonílicos e componentes ditirosina, induzidas pelo HOCl sobre as proteínas (CAPEILLÉRE-BLANDIN et al., 2004). Assim, Witko-Sarsat et al. (1996) demonstraram que é possível formar AOPP *in vitro* (albumina-AOPP), incubando a albumina sérica humana purificada em uma solução de HOCl.

Davies et al. (1999) observaram que grupos carbonil e ditirosina também são formados pela exposição da albumina ao HOCl. A fim de comprovar a formação dessas modificações estruturais, demonstrou-se que grupos carbonil e ditirosina foram correlacionados positivamente com os níveis de AOPP em pacientes urêmicos (WITKO-SARSAT et al., 1998). Assim, os AOPP podem ser considerados marcadores confiáveis para estimar o grau de modificações oxidativas de proteínas (PIWOWAR et al., 2007).

Tem sido sugerido que a albumina é a principal proteína plasmática responsável pela formação de AOPP. Esta formação ocorre principalmente através da oxidação promovida pelo HOCl secretado pela MPO durante o processo inflamatório (CAPEILLÈRE-BLANDIN et al., 2004). Esta enzima, além de liberar oxidantes clorados, também é responsável pela secreção de oxidantes derivados do nitrogênio (WITKO-SARSAT et al., 2003). Nesse sentido, foi demonstrado que a administração de lipopolissacarídeo, indutor do processo inflamatório, promoveu uma elevação dos níveis de FB oxidado por nitração, bem como o aumento da atividade da MPO. Assim, há uma associação entre o aumento da atividade da MPO e a oxidação do FB (HEFFRON et al., 2009).

Neste contexto, com o objetivo de avaliar as frações plasmáticas responsáveis pela reatividade dos AOPP, Selmeçli et al. (2006) demonstraram que os níveis plasmáticos deste biomarcador, utilizando EDTA e citrato como anticoagulantes, foram superiores aos níveis séricos, sugerindo que proteínas consumidas durante o processo de coagulação podem estar envolvidas na formação de AOPP. Além disso, neste mesmo estudo, foi observado que o FB contribui para reatividade dos AOPP. Assim, sugere-se que o FB também é uma importante proteína envolvida na formação de AOPP. Contudo, não há estudos que demonstrem a formação de AOPP através da interação entre o FB e o HOCl, bem como se este processo de oxidação altera sua estrutura e atividade.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial do FB como uma nova fonte para a formação de AOPP a partir de um modelo *in vitro*, bem como verificar alterações funcionais e estruturais nesta proteína.

2.2 Objetivos específicos

- Promover a indução da formação de AOPP *in vitro* através da incubação de FB e HOCl;
- Avaliar modificações estruturais do FB exposto ao HOCl, analisando seu perfil eletroforético através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE);
- Investigar alterações funcionais do FB oxidado através do ensaio de sua atividade.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

As seções “Métodos”, “Resultados” e “Discussão” estão apresentadas no artigo a seguir, o qual foi aceito para publicação no periódico *Inflammation*.

***In vitro* oxidation of fibrinogen promotes functional alterations and the formation of advanced oxidation protein products, an inflammation mediator**

Vanessa Dorneles Torbitz^{1,2}, Guilherme Vargas Bochi^{1,3}, José Antônio Mainardi de Carvalho^{1,2}, Rodrigo de Almeida Vaucher⁴, José Edson Paz da Silva², Rafael Noal Moresco^{1,2,3,*}

¹Laboratory of Clinical Biochemistry, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

²Pharmaceutical Sciences Postgraduate Program, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

³Pharmacology Postgraduate Program, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

⁴Laboratory of Microbiology, Center of Health Sciences, Franciscan University Center, Santa Maria, RS, 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, Brazil.

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

Email: rnmoresco@ufsm.br

Abstract

Fibrinogen (FB) is a soluble blood plasma protein and is a key molecule involved in coagulation. Oxidative modification of proteins, such as the formation of advanced oxidation protein products (AOPP), a heterogeneous family of protein compounds structurally modified and derived from oxidative stress, may be associated with the pathophysiology of a number of chronic inflammatory diseases. Therefore, the aim of this study was to determine whether the formation of this mediator of inflammation occurs from FB, and whether its generation is associated with structural changes. Results of the present study suggest that the oxidation of FB may provoke the formation of AOPP, which in turn, may promote functional alterations in FB, thus causing changes in its structural domains and increasing its pro-coagulant activity.

Keywords: Advanced oxidation protein products, coagulation, fibrinogen, inflammation, oxidative stress.

1. Introduction

Fibrinogen (FB) is a soluble blood plasma protein and is a key molecule involved in coagulation and hemostasis [1]. It is a dimeric glycoprotein with a molecular mass of 340 kDa that is synthesized primarily in the liver. After albumin and globulins, it represents the third most abundant protein in plasma, with an average concentration of 150–400 mg/dL and half-life of 3–5 days [2]. FB is composed of two pairs of three non-identical chains termed $A\alpha$, $B\beta$, and γ . Together, the chains comprise a symmetrical molecule composed of one globular E region flanked on each side by globular D regions that are connected by three-stranded alpha helical coiled-coils [3, 4]. The E region, which is composed of all three chains, contains fibrinopeptides A and B [3, 5]. Cleavage of these peptides by thrombin exposes knobs A and

B, thus resulting in the formation of fibrin monomers [6]. Specific sites in each of these chains are subject to oxidative modification [3]. Oxidative stress has been widely implicated in inflammatory processes related with diabetes mellitus, carcinogenesis, atherogenesis, and especially arterial and venous thrombosis. In this context, proteins are major targets for oxidants, and FB includes a large percentage of plasma proteins, which may be a target for oxidative posttranslational modifications [7].

Numerous mechanisms for the induction of protein modifications may lead to different types of these protein alterations. The detection of protein carbonyl groups is the most frequently used measure the level of protein modification [8]. However, advanced oxidation protein products (AOPP) are also markers of protein oxidation, as well as being mediators of inflammation [9]. AOPP are a heterogeneous family of compounds that are structurally modified and derived from oxidative stress, mainly from HOCl synthesized by myeloperoxidase (MPO), which is an enzyme broadly expressed in cells of the immune system. In some clinical conditions in which inflammation is involved, this enzyme can be constantly active, thus leading to an increased production of HOCl and the accumulation of AOPP in plasma. It has been demonstrated that the spectral characteristics of AOPP correspond to several chromophores, which include dityrosine, carbonyls, and pentosidine [10]. In this context, although albumin is considered the major target for the formation of AOPP, it is known that FB is also a key molecule in the reactivity of this product [11]. However, it has not been established yet whether FB is a source of AOPP formation. Since oxidative and inflammatory processes are implicated in the pathophysiology of a number of clinical conditions that involve the formation of AOPP, and since this biomarker can reflect these changes, it is important to evaluate the susceptibility of other proteins to form AOPP. Furthermore, it is important to investigate whether the formation of these products from FB may be associated with changes in the activity of this procoagulant protein. Therefore, the aim

of this study was to determine whether AOPP is formed from FB, and if this generation is associated with structural changes and the appearance of FB fragments associated with band formation.

2. Methods

2.1 Chemicals and reagents

Purified human FB, chloramine-T, and citric acid ($C_6H_8O_7$) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). Potassium iodide (KI) and sodium hydroxide (NaOH) were purchased from Vetec Chemistry (Rio de Janeiro, Brazil). FB solutions were prepared by diluting in 50 mM phosphate buffer (PBS). In this study, the term hypochlorous acid refers to the sum of both HOCl and OCl^- species. The hypochlorite concentration was determined spectrophotometrically using a wavelength of 292 nm ($\epsilon = 350 M^{-1} cm^{-1}$) after dilution with 10 mM NaOH. The assays were performed in 50 mM PBS (pH 7.4). All experiments were carried out in replicates ($n=5$).

2.2 Treatment of samples

FB was exposed to HOCl in order to produce FB-AOPP. The FB solution (300 mg/dL) was incubated for 30 min with different concentrations of HOCl (1, 2, and 4 mM) at 37 °C since it has been reported that this incubation time is suitable for the formation of AOPP [12]. FB samples exposed to HOCl were dialyzed overnight against PBS in order to reduce the HOCl interference. We used 300 mg/dL FB because this is close to physiological concentrations of FB. FB incubated only with PBS (FB-PBS) was used as the control. We also tested a sample of FB incubated with NaOH and PBS (FB-NaOH) in order to demonstrate that the NaOH used for diluting HOCl does not interfere with the AOPP levels.

2.3 Determination of AOPP

First, a curve with different concentrations of HOCl (1, 2, and 4 mM) was obtained to check the concentration-dependent increase of AOPP. Next, we tested different concentrations of FB (30, 100, and 300 mg/dL) in order to investigate the association between FB concentrations and AOPP levels. The AOPP concentrations were expressed in chloramines-T equivalents ($\mu\text{mol/L}$) and were measured spectrophotometrically using the Cobas Mira[®] automated analyzer (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) by a method previously described [13].

2.4 Spectrophotometric quantification of FB

In order to investigate the impact of FB exposure to HOCl on its concentration, FB was quantified using the UV-Visible Spectrophotometer UVmini-1240[®] (Shimadzu, Kyoto, Japan) at $\lambda=280$ nm. The results were obtained from a calculation using the molar extinction coefficient $\epsilon=1.6 \text{ mg mL}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [14]. PBS was used as the blank.

2.5 SDS-PAGE of FB-AOPP

To determine if the oxidation of FB was associated with structural alterations in order to generate bands associated with fragments or aggregates of this protein, FB-AOPP was subjected to electrophoresis as described previously [15] on a 12% polyacrylamide gel for 2.5 h at a constant current of 30 mA using the Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Gels were stained with Coomassie brilliant blue. FB-PBS was used as a control. The $A\alpha$, $B\beta$, and γ bands were quantified by scanning densitometry using DS-5000[®] (Loccus Biotechnology, Cotia, SP, Brazil). ImageJ software (National Institutes of Health, USA) was used to determine the concentration of the bands on the gel.

2.6 FB activity assays

To identify activity alterations of FB exposed to HOCl, we measured its activity through a detection method consisting of light scattering ($\lambda = 660 \text{ nm}$) in the automated coagulation Ca-1500[®] (Sysmex, Kobe, Japan) using a Thrombin reagent (Sigma Chemical Co; St. Louis, MO, USA).

2.7 Statistical analysis

All experiments were performed in replicates ($n = 5$). Data are expressed as mean \pm standard error and were compared using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test for multiple comparisons. $P < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism software version 4.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3. Results

Exposure of FB to HOCl promoted the formation of AOPP in a concentration-dependent manner, as shown in Figure 1. We also performed assays with different concentrations of FB (30, 100, and 300 mg/dL), and the highest formation of AOPP occurred in FB at a concentration of 300 mg/dL, as shown in Figure 2. In addition, we observed lower concentrations of FB in the FB-AOPP group (Figure 3). Based on this observation, FB-AOPP was subjected to SDS-PAGE so that we could observe the band formation with protein aggregates of higher molecular weight, as well as band alterations in the FB $A\alpha$, $B\beta$, and γ chains in relation to FB-PBS (Figure 4). In addition, densitometric scanning of the gel showed that FB concentrations decreased in the $A\alpha$, $B\beta$, and γ bands (FB-PBS: $A\alpha = 49.4 \text{ mg/dL}$; $B\beta = 29.8 \text{ mg/dL}$; $\gamma = 31.7 \text{ mg/dL}$; FB-NaOH: $A\alpha = 42.3 \text{ mg/dL}$; $B\beta = 34.2 \text{ mg/dL}$; $\gamma = 27.2 \text{ mg/dL}$; FB-AOPP: $A\alpha = 11.2 \text{ mg/dL}$; $B\beta = 15.4 \text{ mg/dL}$; and $\gamma = 16.5 \text{ mg/dL}$), and the percentage of FB

degradation in FB-AOPP in relation to FB-PBS was 32%. As shown in Figure 5, FB exposed to HOCl had increased activity when compared to FB-PBS, thus demonstrating that the formation of AOPP may lead to decreased clotting time.

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Figure 4

Figure 5

4. Discussion

In the present study, we demonstrated that FB is a target of HOCl-induced damage and may be a source for the formation of AOPP. In this context, HOCl oxidation significantly increased FB-AOPP levels in a concentration-dependent manner. Although albumin is the major protein susceptible to the formation of AOPP [9], Selmeçi et al. (2006) demonstrated that plasma samples showed increased levels of AOPP in relation to serum samples, suggesting that FB could be involved in the reactivity of AOPP. Interestingly, this notion was supported by the observation that higher FB concentrations were associated with an enhanced molar ratio of AOPP to FB [11]. In this present study, we have demonstrated that incubating FB with different concentrations of HOCl induced an increase in AOPP formation in a concentration-dependent manner, thus suggesting that FB may be involved not only in the reactivity of AOPP, but also in the formation of these products.

AOPP is a heterogeneous family of structurally modified proteins that are derived from oxidative stress, specifically from HOCl synthesized by MPO [16]. HOCl produced by myeloperoxidase is likely the major oxidant from neutrophils, and may be an important contributor to inflammatory tissue injury. The plasma fibronectin oxidized by the

myeloperoxidase system and by reagent HOCl resulted in the loss of tryptophan and cysteine [17]. FB treatment with HOCl leads to the preferential oxidation of specific methionine residues on the α , β , and γ chains. The oxidation of one or all of these residues is associated with reduced lateral aggregation of protofibrils, resulting in gels with smaller fibers and higher fiber density when compared to untreated fibrin gels [18]. Therefore, during pro-oxidant conditions associated with the formation of HOCl, FB may be a target of HOCl, thus triggering the formation of AOPP concomitantly with the formation of AOPP from albumin. In addition, AOPP formation from FB may promote functional and structural changes in this protein, and may contribute to disorders in the coagulation process.

FB is a dimeric glycoprotein with a molecular mass of 340 kDa that is synthesized primarily in the liver [2]. It plays an essential role in blood coagulation and platelet aggregation, and is also involved in inflammatory processes and atherogenesis. It is critical protein for clot formation, both in the fibrin network and in platelet aggregation, which are ultimately required for the generation of the hemostatic thrombus. Perturbations in these functions may influence the formation and properties of the fibrin network and promote pathological states, including thrombosis and thromboembolism [19, 20]. In this context, oxidative stress leads to covalent oxidative modifications of plasma proteins, including FB. It has been shown elsewhere that oxidized FB has an increased ability to form fibrin and that acetylation prevents the enhancement of clot formation [21]. We have also demonstrated that the FB exposure to HOCl promoted an increase in FB activity.

It has been reported that the treatment of FB with oxidizing reagents increased the concentration of the carbonyl proteins to approximately 20 times that of the levels observed in non-stressed cells. The formation of dityrosine, as well as the loss of tryptophan during the oxidation of FB [22], was also observed. In the present study, we demonstrated that FB treated with HOCl induced the formation of AOPP. We also observed changes in the

concentration and activity of the FB. We detected a decrease in the FB concentration, which was in contrast to the increase in FB activity that we observed. Furthermore, we have also shown the presence of structural changes in FB incubated with HOCl, as well as alterations in the band content of the A α , B β , and γ chains. We infer from this that the formation of high mass bands is likely a result of protein aggregation of FB. Moreover, based on the densitometry scanning analysis of the gels, a decrease in the FB concentration in the bands of the sample oxidized by HOCl was observed, thus suggesting that the change in the activity of this protein may be specifically related to changes in these structural domains of the molecule.

The main findings of this study was to demonstrate that the oxidation of FB may lead to the formation of AOPP in this *in vitro* model, and that this formation may promote functional alterations in FB, thus causing changes in their structural domains and increasing its activity. Finally, we suggest that the formation of FB-AOPP may contribute for the generation of thrombosis and that FB, as well as albumin, may be a source of AOPP formation. However, additional *in vivo* studies are required to confirm the role of FB-AOPP in the pathophysiology of thromboembolic diseases.

Acknowledgments

This study was supported by scholarships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil).

Declaration of Interest

There are no conflicts of interest to declare.

References

- [1] Liu C.Y., H.L. Nossel, and K.L. Kaplan. 1979. The binding of thrombin by fibrin. *The Journal of Biological Chemistry* 254: 10421-10425.
- [2] Collen, D., G. Tygat, H. Claeys, and R. Piessens. 1972. Metabolism and distribution of fibrinogen. I. Fibrinogen turnover in physiological conditions in humans. *British Journal of Haematology* 22 :681-700.
- [3] Brow, J.H., N. Volkmann, G. Jun, A.H. Henschen-Edman, and C. Cohen. 2000. The crystal structure of modified bovine fibrinogen. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 85-90.
- [4] Hall, C.E., and H.S Slayter. 1959. The fibrinogen molecule: its size, shape, and mode of polymerization. *The Journal of the Biophysical and Biochemical Cytology* 5: 11–16.
- [5] Kollman, J.M., L. Pandi, M.R. Sawaya, M. Riley, and R.F. Doolittle. 2009. Crystal structure of human fibrinogen. *Biochemistry* 48: 3877–3886.
- [6] Budzynski, A.Z., S.A. Olexa, and B.V. Pandya. 1983. Fibrin polymerization sites in fibrinogen and fibrin fragments. *Annals of the New York Academy of Sciences* 408: 301–314.
- [7] Martinez, M., J.W. Weisel, and H. Ischiropoulos. Functional impact of oxidative posttranslational modifications on fibrinogen and fibrin clots. 2013. *Free Radical Biology and Medicine* 65: 411-418.
- [8] Dalle-Donne, I., R. Rossi, D. Giustarini, A. Milzani, and R. Colombo. 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* 329: 23-38.
- [9] Witko-Sarsat, V., M. Friedlander, C. Capeillère-Blandin, A.T. Nguyen-Khoa, A.T. Nguyen, J. Zingraff, P. Jungers, et al. 1996. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney International* 49: 1304-1313.

- [10] Capeillere-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.
- [11] Selmeçi, L., M. Székely, P. Soós, L. Seres, N. Klinga, A. Geiger, et al. 2006. Human blood plasma advanced oxidation protein products (AOPP) correlates with fibrinogen levels. *Free Radical Research* 40: 952-958.
- [12] Bochi, GV.; V.D. Torbitz, L.P. Cargnin, M.B. Sangoi, R.C. Santos, P. Gomes, et al. 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.
- [13] Hanasand, M., R. Omdal, K.B. Norheim, L.G. Gøransson, C. Brede, and G. Jonsson. 2013. Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. *Clinica Chimica Acta* 413: 901-906.
- [14] Carr, Jr., and J. Hermans. 1978. Size and density of fibrin fibers from turbidity. *Macromolecules* 11: 46-50.
- [15] Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- [16] Witko-Sarsat, V., V. Gausson, A.T. Nguyen, M. Touam, T. Drüeke, F. Santangelo, et al. 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.
- [17] Margret C.M., and C.C. Winterbourn. 1991. Oxidative Damage to Fibrinogen I. The Effects of the Neutrophil Myeloperoxidase System and HOCl. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 15: 53-59.

- [18] Weigandt, K.M., N. White, D. Chung, E. Ellingson, Y. Wang, and X. Fu. 2012. Fibrin Clot structure and mechanics associated with specific oxidation of methionine residues in fibrinogen. *Biophysical Journal* 103: 2399-2407.
- [19] Kannel, W.B., P.A. Wolf, W.P. Castelli, and R.B. D'Agostino. 1987. Fibrinogen and risk of cardiovascular disease. the Framingham Study. *JAMA* 258: 1183–1186.
- [20] Stec, J.J., H. Silbershatz, G.H. Tofler, T.H. Matheney, P. Sutherland, I. Lipinska, et al. 2000. Association of fibrinogen with cardiovascular risk factors and cardiovascular disease in The Framingham offspring population. *Circulation* 102: 1634–1638.
- [21] Upchurch Jr G.R., N. Ramdev, M.T. Walsh, and J. Loscalzo. 1998. Prothrombotic consequences of the oxidation of fibrinogen and their inhibition by aspirin. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 5: 9–14.
- [22] Belisario, M.A., C. Di Domenico, A. Pelagalli, R. Della Morte, and N. Staiano. 1997. Metal-ion catalyzed oxidation affects fibrinogen activity on platelet aggregation and adhesion. *Biochimie* 79: 449–455.

Figures

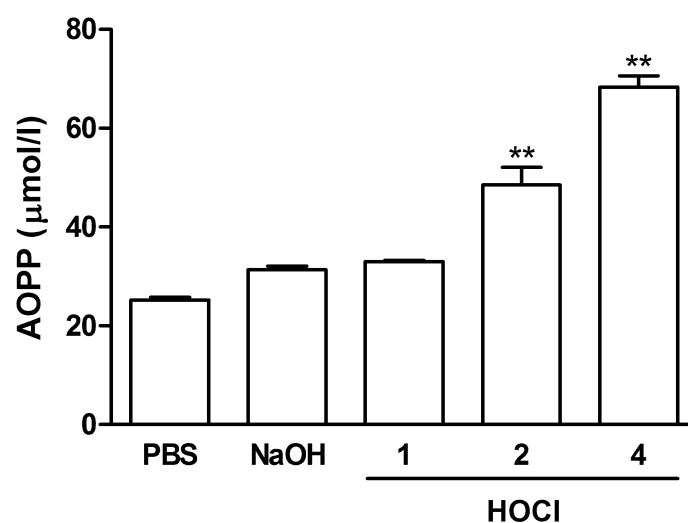


Figure 1 – HOCl versus FB-AOPP. Concentration-dependent effects of HOCl on FB-AOPP formation. the FB solution (300 mg/dL) was incubated for 30 min with the HOCl solution (1, 2, and 4 mM) at 37 °C (n=5). NaOH was used as the control. Data are expressed as mean \pm SEM. *p<0.05, **p<0.01.

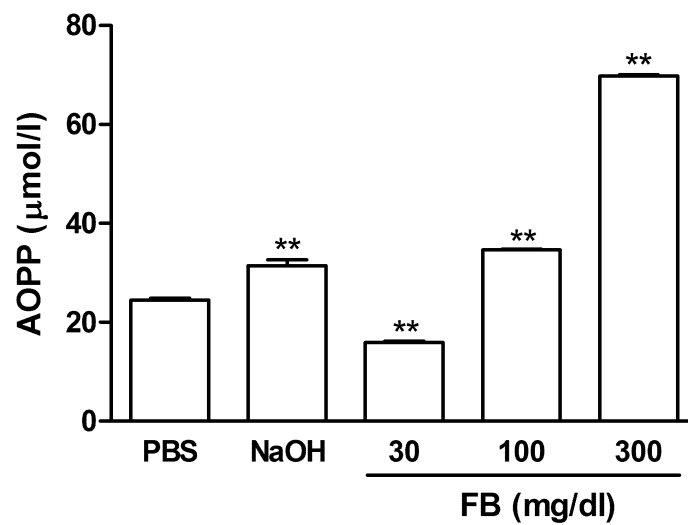


Figure 2 – FB versus FB-AOPP. Concentration-dependent effect of FB on FB-AOPP formation. FB solutions (30, 100, and 300 mg/dL) were incubated for 30 min with the HOCl solution (4 mM) at 37 °C (n=5). NaOH was used as the control. Data are expressed as mean \pm SEM. *p<0.05, **p<0.01.

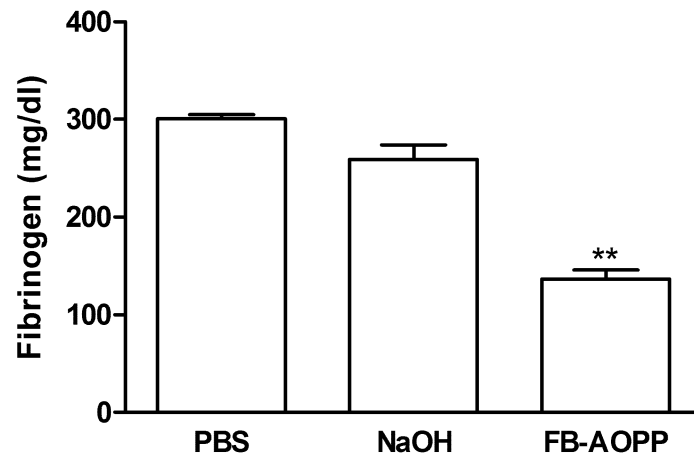


Figure 3 – FB spectrophotometric quantification. FB-AOPP was obtained by incubating FB (300 mg/dL) with HOCl (4 mM). The results were determined from a calculation using the extinction coefficient of $\epsilon=1.6 \text{ mg mL}^{-1}\text{cm}^{-1}$. NaOH was used as the control. Data are expressed as mean \pm SEM. * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

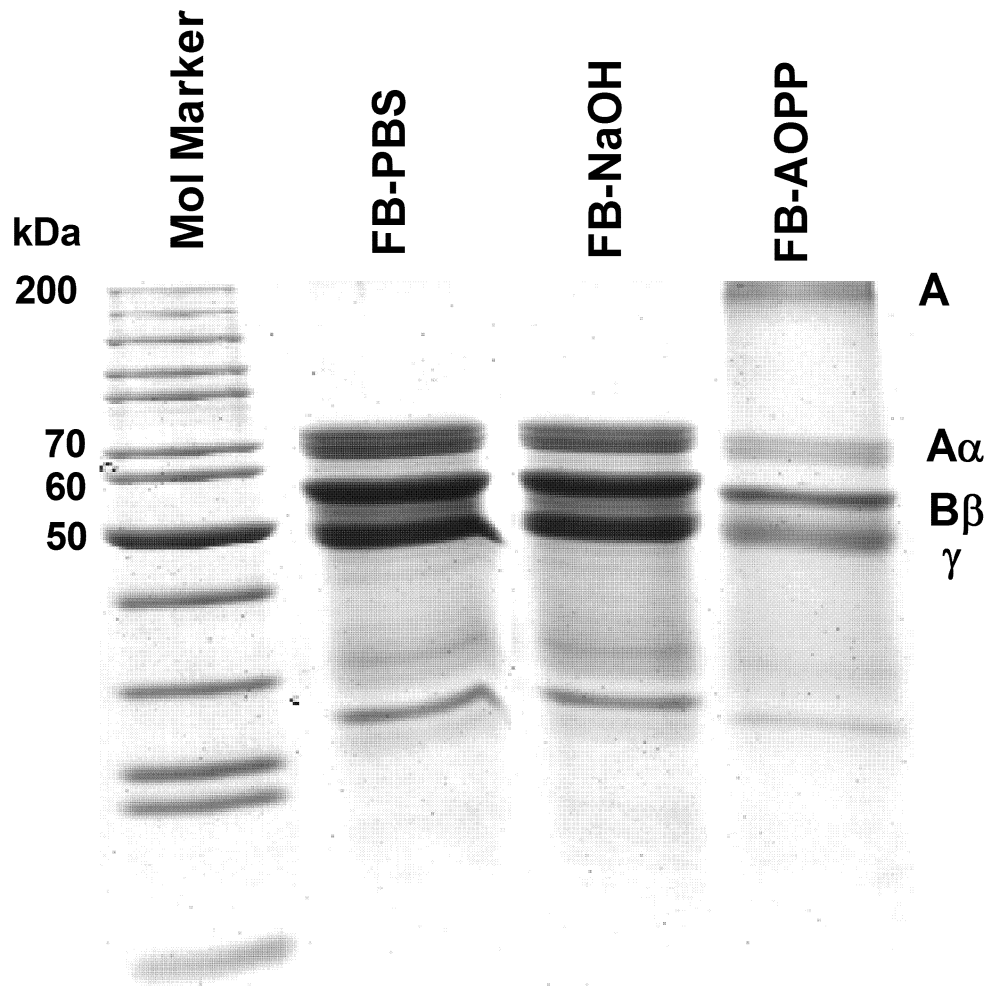


Figure 4 – Effects of FB oxidation on the electrophoretic pattern. Proteins bands on a 12% SDS-PAGE gel were visualized by Coomassie Blue staining. The positions of FB-AOPP, FB-NaOH, and FB-PBS are indicated. Approximately 15 μ L of sample was added to each lane. Molecular masses are shown on the right. (A) Protein aggregates of higher molecular mass. The intensity of the bands of the A α , B β , and γ FB chains were quantified by densitometry. The experiment was repeated at least three times.

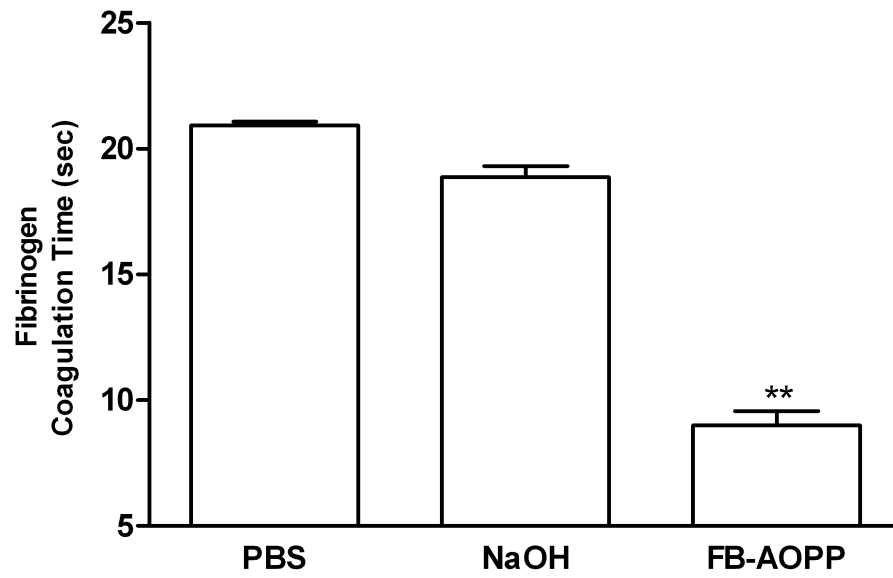


Figure 5 – Effects of oxidation on the activity of FB. FB-AOPP was obtained by incubating FB (300 mg/dL) with HOCl (4 mM). The results are expressed in coagulation time. Data are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4 CONCLUSÕES

- O FB quando incubado com HOCl, foi capaz de promover a formação de AOPP *in vitro*;
- A oxidação do FB para a formação de AOPP induziu a modificações estruturais na molécula desta proteína, modificando seu perfil eletroforético;
- O FB oxidado apresentou aumento em sua atividade pró-coagulante através de uma diminuição de seu tempo de coagulação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELISARIO, M. A. et al. Metal-ion catalyzed oxidation affects fibrinogen activity on platelet aggregation and adhesion. **Biochimie**. v.79, p.449–455, 1997.

CAPEILLÉRE-BLANDIN, C. et al. Biochemical and spectrophotometric significance of advanced oxidized protein products. **Biochim Biophys Acta**. v.1689, p.91-102, 2004.

CASTELLI, W. P. et al. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham study. **JAMA**. v.256, p.2835–2838, 1986.

COLLEN, D. et al. Metabolism and distribution of fibrinogen. I. Fibrinogen turnover in physiological conditions in humans. **Br J Hematol**. v.22, p.681–700, 1972.

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, p.1-12, 2015.

DALLE-DONE, I. et al. Protein carbonylation, cellular dysfunction and disease progression. **J Cell Mol Med**. v.10, p.389-406, 2006.

DAVIES, M. J. et al. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. **Free Radic Biol Med**. v.27, p.1151–1163, 1999.

DHALLA, N. S.; TEMSAH, R. M.; NETTICADAN, T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. **J Hypertens**. v.18, p.655-673, 2000.

ERNST, E.; RESCH, K. L. Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: a meta-analysis and review of the literature. **Ann Inter Med**. v.118, p.956-963, 1993.

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. **Biochem Pharmacol**. v.49, p.1341–1348, 1995.

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

HEFFRON, S. P. et al. Inflammation induces fibrinogen nitration in experimental human endotoxemia. **Free Radic Bio Med.** v.47, p.1140–1146, 2009.

HENLE, T. et al. Advanced glycated end-products (AGE) during haemodialysis treatment: discrepant results with different methodologies reflecting the heterogeneity of AGE compounds. **Nephrol Dial Transplant.** v.14, p.1968-1975, 1999.

HIMMELFARB, J.; MCMONAGLE, E. Albumin is the major plasma protein target of oxidant stress in uremia. **Kidney Int.** v.60, p.358-363, 2001.

HUMPHRIES, S. E. et al. Gene-environment interaction in the determination of levels of plasma fibrinogen. **Thromb Haemost.** v.82, p.818-825, 1999.

ILL-RAGA, GERARD. et al. Fibrinogen nitrotyrosination after ischemic stroke impairs thrombolysis and promotes neuronal death. **Biochim Biophys Acta.** v.1852, p.421-428, 2015.

ISCHIROPOULOS, H. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. **Arch Biochem Biophys.** v.356, p.1–11, 1998.

KARPEL, R.; MARX, G.; CHEVION, M. Free radical-induced fibrinogen coagulation: modulation of neofibrin formation by concentration, pH and temperature. **Isr J Med Sci.** v.27, p.61–66, 1991.

KETTLE, A. J.; VAN DALEN, C. J.; WINTERBOURN, C. C. Peroxynitrite and myeloperoxidase leave the same footprint in protein nitration. **Redox Rep.** v.3, p.257-258, 1997.

LEE, Y.; SHACTER, E. Role of carbohydrates in oxidative modification of fibrinogen and other plasma proteins. **Arch Biochem Biophys.** v.321, p.175–181, 1995.

LINDAHL, B. et al. Insulin resistance syndrome and fibrinolytic activity: The Northern Sweden MONICA Study. **Int J Epidemiol.** v.25, p.291-299, 1996.

LIPINSKI B. Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. **J Diabetes Complications.** v.15, p.203–210, 2001.

MARESCA, G. et al. Measuring plasma fibrinogen to predict stroke and myocardial infarction: an update. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v.19, p.1368–1377, 1999.

MARGAGLIONE, M. et al. Fibrinogen plasma levels in an apparently healthy general population. Relation to environmental and genetic determinants. **Thromb Haemost.** v.80, p.805-810, 1998.

MARTINEZ, M.; WEISEL, J. W.; ISCHIROPOULOS, H. Functional impact of oxidative posttranslational modifications on fibrinogen and fibrin clots. **Free Rad Biol Med.** v.65, p.411-418, 2013.

MEADE, T. W.; IMESON, J.; STIRLING, Y. Effects of changes in smoking and other characteristics on clotting factors and the risk of ischemic heart disease. **Lancet.** v.2, p.986-988, 1987.

MOSESSON, M. W.; SIEBENLIST, K. R.; MEH, D. A. The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. **Ann NY Acad Sci.** v.936, p.11-30, 2001.

MOSESSON, M. W. Fibrinogen and fibrin structure and functions. **J Thromb Haemost.** v.3, p.1894-1904, 2005.

NOWAK, P. et al. Different vulnerability of fibrinogen subunits to oxidative/nitrative modifications induced by peroxynitrite: functional consequences. **Thromb Res.** v.121, p.163-174, 2007.

OCKNER, R. K.; KAIKAUS, R. M.; BASS, N. M. Fatty-acid metabolism and the pathogenesis of hepatocelulr carcinoma: review and hypothesis. **Hepatology.** v.18, p.669-676, 1993.

OLINESCU, R. M.; KUMMEROW, F. A. Fibrinogen is an efficient antioxidant. **J Nutri Biochem.** v.12, p.162-169, 2001.

PARASTATIDIS, I. et al. Increased protein nitration burden in the atherosclerotic lesions and plasma of apolipoprotein A-I deficient mice. **Circ Res.** v.101, p.368-376, 2007.

PEREZ, R. L.; RITZENTHALER, J. D.; ROMAN, J. Transcriptional regulation of the interleukin-1 beta promoter via fibrinogen engagement of the CD18 integrin receptor. **Am J Respir Cell Mol Biol.** v.20, p.1059-1066, 1999.

PIGNATELLI, B. et al. Nitrated and oxidized plasma proteins in smokers and lung cancer patients. **Cancer Res.** v.61, p.778-784, 2001.

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, p.188-192, 2007.

ROBERTS, C. K.; SINDHU, K. K. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life Sci.** v.84, p.705-712, 2009.

SCHNEIDER, D. J. et al. Increased reactivity of platelets induced by fibrinogen independent of its binding to the IIb–IIIa surface glycoprotein: a potential contributor to cardiovascular risk. **J Am Coll Cardiol.** v.33, p.261–266, 2011.

SCHONFELD, P.; DYMKOWSKA, D.; WOJTCZAK, L. Acyl-CoA-induces generation of reactive oxygen species in mitochondrial preparations is due to the presence of peroxisomes. **Free Radic. Biol. Med.** v.47, p.503-509, 2009.

SCOTT, E. M.; ARIENS, R. A.; GRANT, P. J. Genetic and environmental determinants of fibrin structure and function. Relevance to clinical disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v.24, p.1558-1566, 2004.

SELMECI, L. et al. Human blood plasma advanced oxidation protein products (AOPP) correlates with fibrinogen levels. **Free Radic Res.** v.40, p.952-958, 2006.

SHACTER, E. et al. Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by western blot immunoassay. **Free Radic Biol Med.** v.17, p.423-437, 1994.

SHACTER, E.; WILLIAMS, J. A.; LEVINE, R. L. Oxidative modification of fibrinogen inhibits thrombin-catalyzed clot formation. **Free Radic Biol Med.** v.18, p.815–821, 1995.

SHACTER, E. Protein oxidative damage. **Methods Enzymol.** v.319, p.428-436, 2000.

SMITH, S. A. Overview of hemostasis. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. (Eds). **Schalm's veterinary hematology.** 6. Ed. USA: Willey-Blackwell, Chap.84. p.635-656, 2010.

SILVA, T.O. et al. Association between advanced oxidation protein products and 5-year mortality risk among amazon riparian elderly population. **Free Rad Res.** v.49, p.204-209. 2015.

STIEF, T. W. et al. Singlet oxygen inactivates fibrinogen, factor V, factor VIII, factor X, and platelet aggregation of human blood. **Thromb Res.** v.97, p.473–478, 2000.

TAJES, M. et al. Nitro-Oxidative Stress after Neuronal Ischemia Induces Protein Nitrotyrosination and Cell Death. **Oxid Med Cell Longev.** doi: 10.1155/2013/826143, 2013.

VADSETH, C. et al. Pro-thrombotic state induced by post-translational modification of fibrinogen by reactive nitrogen species. **J Biol Chem.** v.279, p.8820–8826, 2004.

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

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

VICTOR, V. M. et al. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in atherosclerosis: mitochondria-targeted antioxidants as potential therapy. **Curr Med Chem.** v.9, p.376-389, 2009.

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.16, p.1006, 2014.

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

WITKO-SARSAT, C. et al. Advanced Oxidation Protein Products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. **J Immunol.** v.161, 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, p.82-91, 2003.

Anexo A – Artigo científico no formato publicado no periódico *Inflammation*.

Inflammation, Vol. 38, No. 3, June 2015 (© 2014)
DOI: 10.1007/s10753-014-0085-x

***In Vitro* Oxidation of Fibrinogen Promotes Functional Alterations and Formation of Advanced Oxidation Protein Products, an Inflammation Mediator**

Vanessa Dorneles Torbitz,^{1,2} Guilherme Vargas Bochi,^{1,3} José Antônio Mainardi de Carvalho,^{1,2} Rodrigo de Almeida Vaucher,⁴ José Edson Paz da Silva,² and Rafael Noal Moresco^{1,2,3,5}

Abstract—Fibrinogen (FB) is a soluble blood plasma protein and is a key molecule involved in coagulation. Oxidative modification of proteins, such as the formation of advanced oxidation protein products (AOPP), a heterogeneous family of protein compounds structurally modified and derived from oxidative stress, may be associated with the pathophysiology of a number of chronic inflammatory diseases. Therefore, the aim of this study was to determine whether the formation of this mediator of inflammation occurs from FB and whether its generation is associated with structural changes. Results of the present study suggest that the oxidation of FB may provoke the formation of AOPP, which in turn, may promote functional alterations in FB, thus causing changes in its structural domains and increasing its procoagulant activity.

KEY WORDS: advanced oxidation protein products; coagulation; fibrinogen; inflammation; oxidative stress.

INTRODUCTION

Fibrinogen (FB) is a soluble blood plasma protein and is a key molecule involved in coagulation and hemostasis [1]. It is a dimeric glycoprotein with a molecular mass of 340 kDa that is synthesized primarily in the liver. After albumin and globulins, it represents the third most abundant protein in plasma, with an average concentration of 150–400 mg dL⁻¹ and half-life of 3–5 days [2]. FB is composed of two pairs of three nonidentical chains termed $A\alpha$, $B\beta$, and γ . Together, the chains comprise a symmetrical molecule composed of one globular E region flanked on each

side by globular D regions that are connected by three-stranded alpha-helical coiled coils [3, 4]. The E region, which is composed of all three chains, contains fibrinopeptides A and B [3, 5]. Cleavage of these peptides by thrombin exposes knobs A and B, thus resulting in the formation of fibrin monomers [6]. Specific sites in each of these chains are subject to oxidative modification [3]. Oxidative stress has been widely implicated in inflammatory processes related with diabetes mellitus, carcinogenesis, atherogenesis, and especially arterial and venous thrombosis. In this context, proteins are major targets for oxidants, and FB includes a large percentage of plasma proteins, which may be a target for oxidative posttranslational modifications [7].

Numerous mechanisms for the induction of protein modifications may lead to different types of these protein alterations. The detection of protein carbonyl groups is the most frequently used measure the level of protein modification [8]. However, advanced oxidation protein products (AOPP) are also markers of protein oxidation, as well as being mediators of inflammation [9]. AOPP are a heterogeneous family of compounds that are structurally modified and derived from oxidative stress, mainly from HOCl synthesized by myeloperoxidase (MPO), which is an

¹ Laboratory of Clinical Biochemistry, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

² Pharmaceutical Sciences Postgraduate Program, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

³ Pharmacology Postgraduate Program, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

⁴ Laboratory of Microbiology, Center of Health Sciences, Franciscan University Center, Santa Maria, RS, Brazil

⁵ To whom correspondence should be addressed at Laboratory of Clinical Biochemistry, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil. E-mail: rnmoresco@ufsm.br

enzyme broadly expressed in cells of the immune system. In some clinical conditions in which inflammation is involved, this enzyme can be constantly active, thus leading to an increased production of HOCl and the accumulation of AOPP in plasma. It has been demonstrated that the spectral characteristics of AOPP correspond to several chromophores, which include dityrosine, carbonyls, and pentosidine [10]. In this context, although albumin is considered the major target for the formation of AOPP, it is known that FB is also a key molecule in the reactivity of this product [11]. However, it has not been established yet whether FB is a source of AOPP formation. Since oxidative and inflammatory processes are implicated in the pathophysiology of a number of clinical conditions that involve the formation of AOPP, and since this biomarker can reflect these changes, it is important to evaluate the susceptibility of other proteins to form AOPP. Furthermore, it is important to investigate whether the formation of these products from FB may be associated with changes in the activity of this procoagulant protein. Therefore, the aim of this study was to determine whether AOPP is formed from FB, and if this generation is associated with structural changes and the appearance of FB fragments associated with band formation.

METHODS

Chemicals and Reagents

Purified human FB, chloramine-T, and citric acid ($C_6H_8O_7$) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). Potassium iodide (KI) and sodium hydroxide (NaOH) were purchased from Vetec Chemistry (Rio de Janeiro, Brazil). FB solutions were prepared by diluting in 50 mM phosphate buffer (PBS). In this study, the term hypochlorous acid refers to the sum of both HOCl and OCl^- species. The hypochlorite concentration was determined spectrophotometrically using a wavelength of 292 nm ($\epsilon=350 M^{-1}cm^{-1}$) after dilution with 10 mM NaOH. The assays were performed in 50 mM PBS (pH 7.4). All experiments were carried out in replicates ($n=5$).

Treatment of Samples

FB was exposed to HOCl in order to produce FB-AOPP. The FB solution ($300 mg dL^{-1}$) was incubated for 30 min with different concentrations of HOCl (1, 2, and 4 mM) at 37 °C since it has been reported that this incubation time is suitable for the formation of AOPP [12]. FB samples exposed to HOCl were dialyzed

overnight against PBS in order to reduce the HOCl interference. We used $300 mg dL^{-1}$ FB because this is close to physiological concentrations of FB. FB incubated only with PBS (FB-PBS) was used as the control. We also tested a sample of FB incubated with NaOH and PBS (FB-NaOH) in order to demonstrate that the NaOH used for diluting HOCl does not interfere with the AOPP levels.

Determination of AOPP

First, a curve with different concentrations of HOCl (1, 2, and 4 mM) was obtained to check the concentration-dependent increase of AOPP. Next, we tested different concentrations of FB (30, 100, and $300 mg dL^{-1}$) in order to investigate the association between FB concentrations and AOPP levels. The AOPP concentrations were expressed in chloramines-T equivalents ($\mu mol L^{-1}$) and were measured spectrophotometrically using the Cobas Mira® automated analyzer (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) by a method previously described [13].

Spectrophotometric Quantification of FB

In order to investigate the impact of FB exposure to HOCl on its concentration, FB was quantified using the UV-Visible Spectrophotometer UVmini-1240® (Shimadzu, Kyoto, Japan) at $\lambda=280 nm$. The results were obtained from a calculation using the molar extinction coefficient $\epsilon=1.6 mg mL^{-1} cm^{-1}$ [14]. PBS was used as the blank.

SDS-PAGE of FB-AOPP

To determine if the oxidation of FB was associated with structural alterations in order to generate bands associated with fragments or aggregates of this protein, FB-AOPP was subjected to electrophoresis as described previously [15] on a 12 % polyacrylamide gel for 2.5 h at a constant current of 30 mA using the Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Gels were stained with Coomassie brilliant blue. FB-PBS was used as a control. The $A\alpha$, $B\beta$, and γ bands were quantified by scanning densitometry using DS-5000® (Loccus Biotechnology, Cotia, SP, Brazil). ImageJ software (National Institutes of Health, USA) was used to determine the concentration of the bands on the gel.

FB Activity Assays

To identify activity alterations of FB exposed to HOCl, we measured its activity through a detection method

consisting of light scattering ($\lambda=660$ nm) in the automated coagulation Ca-1500[®] (Sysmex, Kobe, Japan) using a Thrombin reagent (Sigma Chemical Co; St. Louis, MO, USA).

Statistical Analysis

All experiments were performed in replicates ($n=5$). Data are expressed as mean \pm standard error and were compared using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test for multiple comparisons. $P<0.05$ was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism software version 4.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

RESULTS

Exposure of FB to HOCl promoted the formation of AOPP in a concentration-dependent manner, as shown in Fig. 1. We also performed assays with different concentrations of FB (30, 100, and 300 mg dL⁻¹), and the highest formation of AOPP occurred in FB at a concentration of 300 mg dL⁻¹, as shown in Fig. 2. In addition, we observed lower concentrations of FB in the FB-AOPP group (Fig. 3). Based on this observation, FB-AOPP was subjected to SDS-PAGE so that we could observe the band formation with protein aggregates of higher molecular weight, as well as band alterations in the FB $A\alpha$, $B\beta$, and γ chains in relation to FB-PBS (Fig. 4). In addition, densitometric scanning of the gel showed that FB concentrations

decreased in the $A\alpha$, $B\beta$, and γ bands (FB-PBS: $A\alpha=49.4$ mg dL⁻¹, $B\beta=29.8$ mg dL⁻¹, and $\gamma=31.7$ mg dL⁻¹; FB-NaOH: $A\alpha=42.3$ mg dL⁻¹, $B\beta=34.2$ mg dL⁻¹, and $\gamma=27.2$ mg dL⁻¹; FB-AOPP: $A\alpha=11.2$ mg dL⁻¹, $B\beta=15.4$ mg dL⁻¹, and $\gamma=16.5$ mg dL⁻¹) and the percentage of FB degradation in FB-AOPP in relation to FB-PBS was 32 %. As shown in Fig. 5, FB exposed to HOCl had increased activity when compared to FB-PBS, thus demonstrating that the formation of AOPP may lead to decreased clotting time.

DISCUSSION

In the present study, we demonstrated that FB is a target of HOCl-induced damage and may be a source for the formation of AOPP. In this context, HOCl oxidation significantly increased FB-AOPP levels in a concentration-dependent manner. Although albumin is the major protein susceptible to the formation of AOPP [9], Selmeçci *et al.* [11] demonstrated that plasma samples showed increased levels of AOPP in relation to serum samples, suggesting that FB could be involved in the reactivity of AOPP. Interestingly, this notion was supported by the observation that higher FB concentrations were associated with an enhanced molar ratio of AOPP to FB [11]. In this present study, we have demonstrated that incubating FB with different concentrations of HOCl induced an increase in AOPP formation in a concentration-dependent manner, thus suggesting that FB may be involved not only in the reactivity of AOPP, but also in the formation of these products.

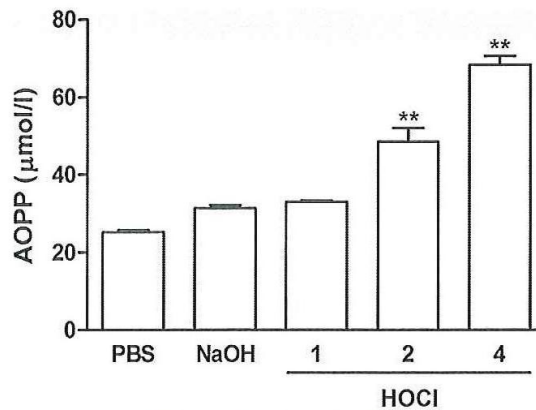


Fig. 1. HOCl versus FB-AOPP. Concentration-dependent effects of HOCl on FB-AOPP formation. The FB solution (300 mg dL⁻¹) was incubated for 30 min with the HOCl solution (1, 2, and 4 mM) at 37 °C ($n=5$). NaOH was used as the control. Data are expressed as mean SEM. * $p<0.05$; ** $p<0.01$.

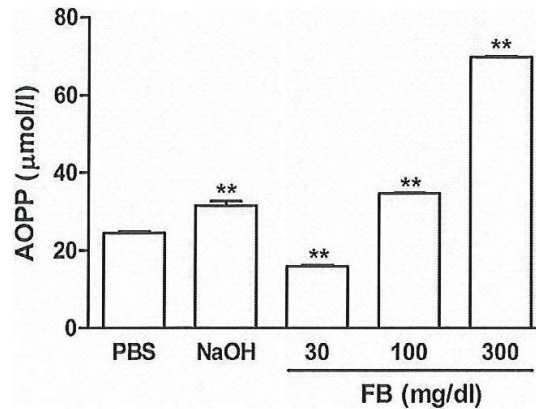


Fig. 2. FB versus FB-AOPP. Concentration-dependent effect of FB on FB-AOPP formation. FB solutions (30, 100, and 300 mg dL⁻¹) were incubated for 30 min with the HOCl solution (4 mM) at 37 °C (*n*=5). NaOH was used as the control. Data are expressed as mean SEM. **p*<0.05; ***p*<0.01.

AOPP is a heterogeneous family of structurally modified proteins that are derived from oxidative stress, specifically from HOCl synthesized by MPO [16]. HOCl produced by myeloperoxidase is likely the major oxidant from neutrophils, and may be an important contributor to inflammatory tissue injury. The plasma fibronectin oxidized by the myeloperoxidase system and by reagent HOCl resulted in the loss of tryptophan and cysteine [17]. FB treatment with HOCl leads to the preferential oxidation of specific methionine residues on the α , β , and γ chains. The oxidation of one or all of these residues is associated with reduced lateral aggregation of protofibrils, resulting in gels with smaller fibers and higher fiber density when compared to untreated fibrin gels [18]. Therefore, during oxidant conditions associated with the formation of HOCl, FB may be a target of HOCl, thus triggering the formation

of AOPP concomitantly with the formation of AOPP from albumin. In addition, AOPP formation from FB may promote functional and structural changes in this protein and may contribute to disorders in the coagulation process.

FB is a dimeric glycoprotein with a molecular mass of 340 kDa that is synthesized primarily in the liver [2]. It plays an essential role in blood coagulation and platelet aggregation and is also involved in inflammatory processes and atherogenesis. It is critical protein for clot formation, both in the fibrin network and in platelet aggregation, which are ultimately required for the generation of the hemostatic thrombus. Perturbations in these functions may influence the formation and properties of the fibrin network and promote pathological states, including thrombosis and thromboembolism [19, 20]. In this context, oxidative stress leads to covalent oxidative modifications of

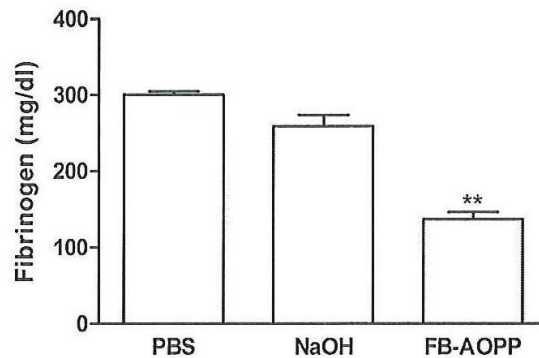


Fig. 3. FB spectrophotometric quantification. FB-AOPP was obtained by incubating FB (300 mg dL⁻¹) with HOCl (4 mM). The results were determined from a calculation using the extinction coefficient of $\epsilon = 1.6 \text{ mg mL}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. NaOH was used as the control. Data are expressed as mean SEM. **p*<0.05; ***p*<0.01.

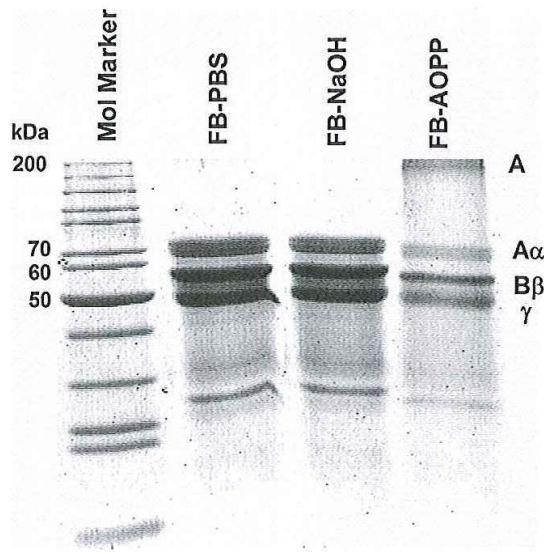


Fig. 4. Effects of FB oxidation on the electrophoretic pattern. Proteins bands on a 12 % SDS-PAGE gel were visualized by Coomassie Blue staining. The positions of FB-AOPP, FB-NaOH, and FB-PBS are indicated. Approximately 15 μ L of sample was added to each lane. Molecular masses are shown on the left. A Protein aggregates of higher molecular mass. The intensity of the bands of the A α , B β , and γ FB chains were quantified by densitometry. The experiment was repeated at least three times.

plasma proteins, including FB. It has been shown elsewhere that oxidized FB has an increased ability to form fibrin and that acetylation prevents the enhancement of clot formation [21]. We have also demonstrated that the FB exposure to HOCl promoted an increase in FB activity.

It has been reported that the treatment of FB with oxidizing reagents increased the concentration of the carbonyl proteins to approximately 20 times that of the levels observed in non-stressed cells. The formation of dityrosine, as well as the loss of tryptophan during the oxidation of FB

[22], was also observed. In the present study, we demonstrated that FB treated with HOCl induced the formation of AOPP. We also observed changes in the concentration and activity of the FB. We detected a decrease in the FB concentration, which was in contrast to the increase in FB activity that we observed. Furthermore, we have also shown the presence of structural changes in FB incubated with HOCl, as well as alterations in the band content of the A α , B β , and γ chains. We infer from this that the formation of high mass bands is likely a result of protein aggregation

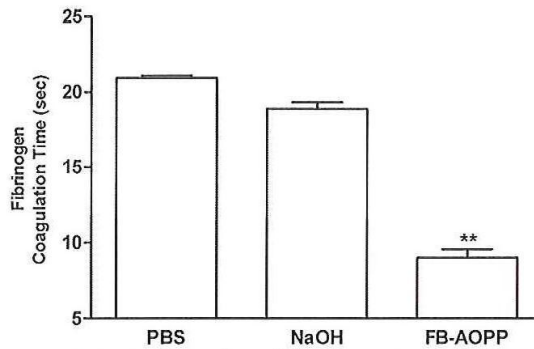


Fig. 5. Effects of oxidation on the activity of FB. FB-AOPP was obtained by incubating FB (300 mg dL^{-1}) with HOCl (4 mM). The results are expressed in coagulation time. Data are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

of FB. Moreover, based on the densitometry scanning analysis of the gels, a decrease in the FB concentration in the bands of the sample oxidized by HOCl was observed, thus suggesting that the change in the activity of this protein may be specifically related to changes in these structural domains of the molecule.

The main findings of this study was to demonstrate that the oxidation of FB may lead to the formation of AOPP in this *in vitro* model, and that this formation may promote functional alterations in FB, thus causing changes in their structural domains and increasing its activity. Finally, we suggest that the formation of FB-AOPP may contribute for the generation of thrombosis and that FB, as well as albumin, may be a source of AOPP formation. However, additional *in vivo* studies are required to confirm the role of FB-AOPP in the pathophysiology of thromboembolic diseases.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by scholarships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil).

Conflict of Interest. There are no conflicts of interest to declare.

REFERENCES

- Liu, C.Y., H.L. Nessel, and K.L. Kaplan. 1979. The binding of thrombin by fibrin. *The Journal of Biological Chemistry* 254: 10421–10425.
- Collen, D., G. Tygat, H. Claeys, and R. Piessens. 1972. Metabolism and distribution of fibrinogen. I. Fibrinogen turnover in physiological conditions in humans. *British Journal of Haematology* 22: 681–700.
- Brow, J.I.I., N. Volkman, G. Jun, A.H. Henschen-Edman, and C. Cohen. 2000. The crystal structure of modified bovine fibrinogen. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 85–90.
- Hall, C.E., and H.S. Slayter. 1959. The fibrinogen molecule: its size, shape, and mode of polymerization. *The Journal of the Biophysical and Biochemical Cytology* 5: 11–16.
- Kollman, J.M., L. Pandi, M.R. Sawaya, M. Riley, and R.F. Doolittle. 2009. Crystal structure of human fibrinogen. *Biochemistry* 48: 3877–3886.
- Budzynski, A.Z., S.A. Olexa, and B.V. Pandya. 1983. Fibrin polymerization sites in fibrinogen and fibrin fragments. *Annals of the New York Academy of Sciences* 408: 301–314.
- Martinez, M., J.W. Weisel, and H. Ischiropoulos. Functional impact of oxidative posttranslational modifications on fibrinogen and fibrin clots. 2013. *Free Radical Biology and Medicine* 65: 411–418.
- Dalle-Donne, I., R. Rossi, D. Giustarini, A. Milzani, and R. Colombo. 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* 329: 23–38.
- Witko-Sarsat, V., M. Friedlander, C. Capeillère-Blandin, A.T. Nguyen-Khoa, A.T. Nguyen, J. Zingraff, P. Jungers, et al. 1996. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney International* 49: 1304–1313.
- 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.
- Selmeci, L., M. Székely, P. Soós, L. Seres, N. Klinga, and A. Geiger. 2006. Human blood plasma advanced oxidation protein products (AOPP) correlates with fibrinogen levels. *Free Radical Research* 40: 952–958.
- Bochi, G.V., V.D. Torbitz, L.P. Cargin, M.B. Sangoi, R.C. Santos, P. Gomes, et al. 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.
- Hanasand, M., R. Omdal, K.B. Norheim, L.G. Göransson, C. Brede, and G. Jonsson. 2013. Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. *Clinica Chimica Acta* 413: 901–906.
- Carr, Jr., and J. Hemmans. 1978. Size and density of fibrin fibers from turbidity. *Macromolecules* 11: 46–50.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- Witko-Sarsat, V., V. Gausson, A.T. Nguyen, M. Touam, T. Driéke, F. Santangelo, et al. 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.
- Margret, C.M., and C.C. Winterbourn. 1991. Oxidative damage to fibrinogen I. Effects of the Neutrophil myeloperoxidase system and HOCl. *The Archives of Biochemistry and Biophysics* 15: 53–59.
- Weigandt, K.M., N. White, D. Chung, E. Ellingson, Y. Wang, and X. Fu. 2012. Fibrin clot structure and mechanics associated with specific oxidation of methionine residues in fibrinogen. *Biophysical Journal* 103: 2399–2407.
- Kannel, W.B., P.A. Wolf, W.P. Castelli, and R.B. D'Agostino. 1987. Fibrinogen and risk of cardiovascular disease. The Framingham Study. *JAMA* 258: 1183–1186.
- Stec, J.J., H. Silbershatz, G.I. Tofler, T.H. Matheny, P. Sutherland, I. Lipinska, et al. 2000. Association of fibrinogen with cardiovascular risk factors and cardiovascular disease in the Framingham Offspring Population. *Circulation* 102: 1634–1638.
- Upchurch Jr., G.R., N. Ramdev, M.T. Walsh, and J. Loscalzo. 1998. Prothrombotic consequences of the oxidation of fibrinogen and their inhibition by aspirin. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 5: 9–14.
- Belisario, M.A., C. Di Domenico, A. Pelagalli, R. Della Morte, and N. Staiano. 1997. Metal-ion catalyzed oxidation affects fibrinogen activity on platelet aggregation and adhesion. *Biochimie* 79: 449–455.