

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

**FRUTOSE-1,6-BISFOSFATO E N-ACETILCISTEÍNA
ATENUAM A FORMAÇÃO DE PRODUTOS PROTEICOS DE
OXIDAÇÃO AVANÇADA, UMA NOVA CLASSE DE
MEDIADORES INFLAMATÓRIOS, *IN VITRO***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Guilherme Vargas Bochi

**Santa Maria, RS, Brasil
2012**

**OSFATO E N-ACETILCISTEÍNA
ATENUAM A FORMAÇÃO DE PRODUTOS PROTEICOS DE
OXIDAÇÃO AVANÇADA, UMA NOVA CLASSE DE
MEDIADORES INFLAMATÓRIOS, *IN VITRO***

por

Guilherme Vargas Bochi

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. Rafael Noal Moresco
COORIENTADOR: Prof^a. Dr^a. Patrícia Gomes

Santa Maria, RS, Brasil
2012

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

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

**FRUTOSE-1,6-BISFOSFATO E N-ACETILCISTEÍNA ATENUAM A
FORMAÇÃO DE PRODUTOS PROTEICOS DE OXIDAÇÃO
AVANÇADA, UMA NOVA CLASSE DE MEDIADORES
INFLAMATÓRIOS, *IN VITRO***

elaborada por
Guilherme Vargas Bochi

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA

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

Maribel Antonello Rubin, Dr^a. (UFSM)

Maria Beatriz Moretto, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 19 de setembro de 2012.



Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Dedico este trabalho:

A minha família, pelo exemplo e amor incondicional, aos amigos, colegas e professores que admiram e acreditam na arte de fazer ciência.

AGRADECIMENTOS

Acredito que esta parte da dissertação é tão importante quanto o seu conteúdo, pois seu conteúdo foi construído com base no apoio, ensinamentos e empenho de vários envolvidos que foram fundamentais para que um dia esta página de agradecimentos fosse escrita.

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

Ao meu orientador, Prof. Rafael Noal Moresco, pela orientação e ensinamentos transmitidos ao longo de minha formação acadêmica e principalmente pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa. Além disso, também agradeço pela amizade e pelo voto de confiança na execução deste trabalho. Admiro-o pelos seus conhecimentos, dedicação ao seu trabalho e como pessoa. Espero sempre poder retribuir essa confiança e empenho no meu desenvolvimento, mantendo a admirável logística;

À minha coorientadora, Prof^a. Patrícia Gomes, pelas discussões, sugestões, pela transmissão de conhecimento e dedicação na realização desta dissertação;

À minha primeira orientadora a qual tenho muita consideração, Prof^a. 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. Além disso, agradeço por fazer parte da banca examinadora desta dissertação e por estar presente neste momento tão importante;

Aos professores Dr^a. Maria Beatriz e Dr. Fabio Comim, por disporem do seu tempo para compor a banca examinadora desta dissertação;

Ao professor Roberto Christ Vianna, por estar acompanhando a minha caminhada no mestrado, contribuindo de forma exponencial ao meu crescimento;

As professoras queridas Dr^a. Ivana e Dr^a. Marta que de alguma maneira sempre fazem parte da nossa família LaBiClin, incluindo nas nossas festinhas;

Um agradecimento especial à equipe LaBiClin, que considero minha segunda família e minha segunda casa, por toda convivência, cumplicidade e discussões científicas (e não científicas). Agradeço a todos pela amizade verdadeira e por tornarem essa caminhada tão prazerosa. Saibam que se as votações de “destaque do mês” dependesse apenas do meu voto todos seriam destaques e faltariam meses no ano. E a caminhada continua, sempre mantendo a principal característica do nosso grupo, a união e, claro, a seriedade. E de tudo isso, o melhor é pensar que esse foi só o começo;



PDF Complete

Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.

[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

logia e da Farmácia que acabaram contribuindo com o processo com muitas risadas, conversas, festas e momentos que foram essenciais nesta caminhada;

Em especial, aos meus pais, as pessoas mais importantes da minha vida, que ensinaram-me, 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 meu sobrinho Gabriel, 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 ao nosso coordenador Prof. Carlos Fernando de Mello e também aos funcionários; 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 e outra, compartilham de meus ideais, a minha gratidão e respeito. A todos meu muito obrigado!



Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

*õ Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor,
mas lutamos para que o melhor fosse feito.
Não somos o que deveríamos ser, não somos
o que iremos ser... mas graças a Deus,
não somos o que éramos õ*

Martin Luther King

RESUMO

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

FRUTOSE-1,6-BISFOSFATO E N-ACETILCISTEÍNA ATENUAM A FORMAÇÃO DE PRODUTOS PROTEICOS DE OXIDAÇÃO AVANÇADA, UMA NOVA CLASSE DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS, *IN VITRO*

AUTOR: GUILHERME VARGAS BOCHI
ORIENTADOR: PROF. DR. RAFAEL NOAL MORESCO
COORIENTADOR: PROF^a. DR^a. PATRÍCIA GOMES

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 19 de setembro de 2012.

A avaliação de biomarcadores das reações que envolvem as espécies reativas de oxigênio têm 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. Recentemente, foi descrita e caracterizada 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 várias condições patológicas, incluindo 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 uma série de efeitos tanto a nível celular quanto a nível sistêmico. Embora o mecanismo de ação pelo qual os AOPP agem não está totalmente esclarecido, sabe-se que estes produtos ativam o *burst* respiratório em fagócitos, incluindo neutrófilos e monócitos, através da ativação de complexos enzimáticos presentes nestas células. Além disso, tem sido demonstrado que os AOPP também podem promover efeitos deletéreos (pró-oxidantes e pró-inflamatórios) a vários tipos celulares, como células renais e endoteliais, através da ativação de uma cascata de sinalização, sendo em alguns aspectos desta cascata muito semelhante aos efeitos promovidos pelos produtos finais de glicação avançada (AGEs). Neste contexto, a avaliação da atividade antioxidante e antiinflamatória de compostos em modelos *in vitro* envolvendo a formação de AOPP pode apresentar especial interesse. Dentre esses compostos, a N-acetilcisteína (NAC) e a Frutose-1,6-bisfosfato (FBP) podem ser substâncias promissoras para esta finalidade. A NAC é um doador de grupo sulfidril muito semelhante ao aminoácido cisteína e a FBP é um açúcar bifosforilado e um metabólito intermediário altamente energético da glicólise. Assim, o principal objetivo deste estudo foi determinar o efeito da FBP e da NAC, bem como o efeito sinérgico de ambas, sobre a formação de AOPP *in vitro*. Para isso, a albumina purificada humana foi incubada com várias concentrações de ácido hipocloroso (HOCl) (1, 2 e 4 mM) para produzir AOPP *in vitro*, a qual foi denominada de albumina-produtos proteicos de oxidação avançada (albumina-AOPP). Neste contexto, tanto FBP quanto NAC foram capazes de inibir a formação de AOPP de maneira concentração-dependente, sendo que FBP 20 mg/mL e NAC 1mg/mL foram responsáveis pela inibição de 64% e 85% respectivamente. Além disso, o efeito sinérgico promovido pela associação de ambos os compostos foi mais efetivo em inibir a formação de AOPP quando comparado com o efeito promovido pelos



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

FBP e NAC podem ser candidatos promissores para amenizar ou neutralizar os efeitos pró-inflamatórios e pró-oxidantes desencadeados pelos AOPP.

Palavras-chave: Produtos protéicos de oxidação avançada; Frutose-1,6-bifosfato; N-acetilcisteína; Estresse Oxidativo; Inflamação.

ABSTRACT

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

FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATE AND N-ACETYLCYSTEINE ATTENUATE THE FORMATION OF ADVANCED OXIDATION PROTEIN PRODUCTS A NEW CLASS OF INFLAMMATORY MEDIATORS, *IN VITRO*

AUTHOR: GUILHERME VARGAS BOCHI
ADVISOR: PROF. DR. RAFAEL NOAL MORESCO
CO-ADVISOR: PROF^a. DR^a. PATRÍCIA GOMES

Place and Date: Santa Maria, September 19, 2012.

The assessment of biomarkers of reactions involving reactive oxygen species have the potential not only to determine the extent of oxidative damage, but also to predict the effectiveness of therapeutic strategies aimed at reducing or preventing the damage promoted by oxidative stress. Recently, it has been described and characterized a new class of compounds formed in consequence of oxidative stress, designated as advanced oxidation protein products (AOPP). The accumulation of AOPP was first described in patients with chronic renal failure undergoing hemodialysis and was subsequently found in 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, providing a range of effects at both the cellular and systemic levels. Although the mechanism of action by which AOPP act is not fully understood, it is known that these products activate respiratory burst in phagocytes, including neutrophils and monocytes, through the activation of enzymes present in these cells. Furthermore, it has been demonstrated that AOPP may promote these effects (pro-oxidants and pro-inflammatory) at several cell types such as endothelial and kidney cells via activation of a signaling cascade, and in some aspects of this cascade AOPP effects is very similar to effects caused by advanced glycation end products (AGEs). In this context, the evaluation of the antioxidant activity of compounds *in vitro* models involving the formation of AOPP may present special interest. Among these compounds, N-acetylcysteine (NAC) and Fructose-1,6-bisphosphate (FBP) may be promising substances for this purpose. The NAC is a sulfhydryl donor group very similar to the amino acid cysteine and FBP is a highly energetic intermediate metabolite of glycolysis. Thus, the aim of this study was to determine the effects of FBP and NAC, as well as the synergistic effect of both treatments on the formation of AOPP *in vitro*. For this purpose, purified human albumin was incubated with various concentrations of hypochlorous acid (HOCl) (1, 2 and 4 mM) to produce AOPP *in vitro*, which was named albumin-advanced oxidation protein products (albumin-AOPP). In this context, both FBP as NAC were able to inhibit the formation of AOPP concentration-dependent manner, with FBP 20mg/mL and NAC 1mg/mL were responsible for the inhibition of 64% and 85% respectively. Furthermore, the synergistic effect promoted by the association of both compounds was more effective in inhibiting the formation of AOPP. Therefore, FBP and NAC may be promising candidates to mitigate or neutralize the pro-inflammatory and pro-oxidant triggered by AOPP.



*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Keywords: Advanced oxidation protein products; Fructose-1,6-bisphosphate; N-acetylcysteine; Oxidative stress; Inflammation.

AGEs: produtos finais de glicação avançada

AOPP: produtos proteicos de oxidação avançada

ATP: adenosina trifosfato

CAT: catalase

Cl⁻: íons cloreto

COX-2: ciclooxigenase-2

DAC: doença arterial coronariana

DM: diabetes *mellitus*

ERK 1/2: quinase regulada por sinal extracelular

EROs: espécies reativas de oxigênio

ERNs: espécies reativas de nitrogênio

FBP: frutose-1,6-bisfosfato

FPLC: cromatografia líquida de desempenho rápido

GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GPx: glutathione peroxidase

GSH: glutathione reduzida

HbA1c: hemoglobina glicada

HOCl: ácido hipocloroso

H₂O: água

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HO₂[•]: radical hidroperoxila

IAM: infarto agudo do miocárdio

IRA: insuficiência renal aguda

IRC: insuficiência renal crônica

MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno

MCP-1: proteína quimiotática de monócitos-1

NAC: N-acetilcisteína

NADPH: nicotinamida adeninadineotídeo fosfato

NF-κB: fator nuclear de transcrição Kappa B

NH₃: amônia

LDL: lipoproteína de baixa densidade

lade oxidada

$O_2^{\cdot -}$: radical superóxido

1O_2 : oxigênio singleto

OH^- : ânion hidroxila

PAF: fator de ativação plaquetária

PCR: proteína C reativa

PKC: proteína quinase C

SCA: síndrome coronariana aguda

-SH: grupamentos tióis

RAGE: receptores multi-ligantes de AGEs

ROO^{\cdot} : radical peroxila

SOD: superóxido dismutase

TFG- : fator de crescimento transformador

TNF- : fator de necrose tumoral alfa

A DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Espécies reativas derivadas do oxigênio.....	19
Figura 2. NADPH oxidase, SOD e MPO em neutrófilos.....	24
Figura 3. Complexo da NADPH oxidase.....	25
Figura 4. Reações catalisadas pela MPO.....	25
Figura 5. Ativação de neutrófilos e monócitos durante a hemodiálise.....	30
Figura 6. Via de sinalização ativada por AOPP em células mesangiais.....	35

ARTIGO

Figura 1. Curva de concentração de HOCl	44
Figura 2. Efeito de FBP, NAC e FBP + NAC sobre os níveis de AOPP	45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Estresse oxidativo	18
1.2 Estresse oxidativo	20
1.3 Inflamação e <i>burst</i> oxidativo	22
1.4 Modificações oxidativas induzidas por HOCl	26
1.5 Produtos proteicos de oxidação avançada	28
1.6 Produtos proteicos de oxidação avançada e inflamação	32
1.7 Produtos proteicos de oxidação avançada e terapias antioxidantes	37
1.7.1 Frutose-1,6-bisfosfato.....	37
1.7.2 N-acetilcisteína.....	38
2. OBJETIVOS	40
2.1. Objetivo geral	40
2.2. Objetivos específicos	40
3. ARTIGO CIENTÍFICO	41
4. DISCUSSÃO	49
4. CONCLUSÕES	50
5. PERSPECTIVAS FUTURAS	51
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52



Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

PRESENTAÇÃO

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.

. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o papel dos radicais livres em processos fisiopatológicos relacionados ao estresse oxidativo tem sido intensamente investigado (ROBERTS et al., 2009). O termo radical livre refere-se a um átomo ou molécula que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica, sendo que este não emparelhamento de elétrons é o que confere sua alta reatividade. 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. O oxigênio molecular 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 ($O_2^{\dot{E}}$), hidroxila (OH) 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). Diferentes estruturas biológicas, incluindo proteínas plasmáticas como a albumina, são passíveis à oxidação. Himmelfarb e MacMonagle (2001) demonstraram em pacientes urêmicos que a albumina é o principal alvo de EROs no plasma (HIMMELFARB e MACMONAGLE, 2001). Assim, a associação do estresse oxidativo com a patogênese de uma série de desordens crônicas como diabetes *mellitus* (DM), aterosclerose e insuficiência renal crônica (IRC) já têm sido descrita em inúmeros trabalhos. Além do estresse oxidativo, essas doenças também estão associadas a um estado pró-inflamatório.

Em 1996 foi descrito um novo marcador do estresse oxidativo proteico em pacientes urêmicos, que foi denominado de produtos proteicos da oxidação avançada (AOPP) (WITKO-SARSAT et al., 1996). Entende-se por AOPP 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. Em algumas situações clínicas nas quais há um quadro inflamatório envolvido, esta enzima pode estar constantemente ativa, levando a um aumento da produção de HOCl e ao acúmulo de AOPP plasmático. Posteriormente, foi demonstrado que, além de ser um marcador fruto do estresse oxidativo, 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).

diferenciam-se dos demais marcadores usualmente mensurados com a finalidade de refletir o estado de estresse oxidativo, uma vez que, além de ser um novo biomarcador de estresse oxidativo, há evidências de que os AOPP participam como mediadores em diferentes processos fisiopatológicos (WITKO-SARSAT et al., 2003). Assim, inibir a formação dos AOPP poderia ser uma maneira de amenizar as comorbidades associadas a doenças como DM e IRC, ou até mesmo, ser útil no tratamento da própria condição patológica primária. Para isso, é imprescindível entender o mecanismo de ação e também como são formados os AOPP *in vitro* através da exposição da albumina humana ao HOCl (WITKO-SARSAT et al., 1996). Assim, é de grande aplicabilidade clínica a avaliação de possíveis compostos que possam inibir a formação e, conseqüentemente, os efeitos desencadeados pelos AOPP. Com esta finalidade, este estudo tem por objetivo avaliar a capacidade da frutose-1,6-bisfosfato (FBP) e da N-acetilcisteína (NAC), dois compostos com atividade antioxidante e antiinflamatória, em inibir a formação de AOPP em um modelo *in vitro*.

1.1 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é caracterizado pelo 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. Estas espécies reativas desempenham um importante papel fisiológico quando produzidos em baixas concentrações, participando em diversas respostas celulares, tais como a resposta a agentes infecciosos e na sinalização celular (VALOKO 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).

Os radicais derivados do oxigênio representam a classe mais importante de radicais gerados *in vivo* (VALKO et al., 2007). As EROs incluem o $O_2^{\dot{E}}$, o H_2O_2 , o $OH^{\dot{E}}$, o radical hidropoxila ($HO_2^{\dot{E}}$) e o oxigênio singlete (1O_2) (Figura 1) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

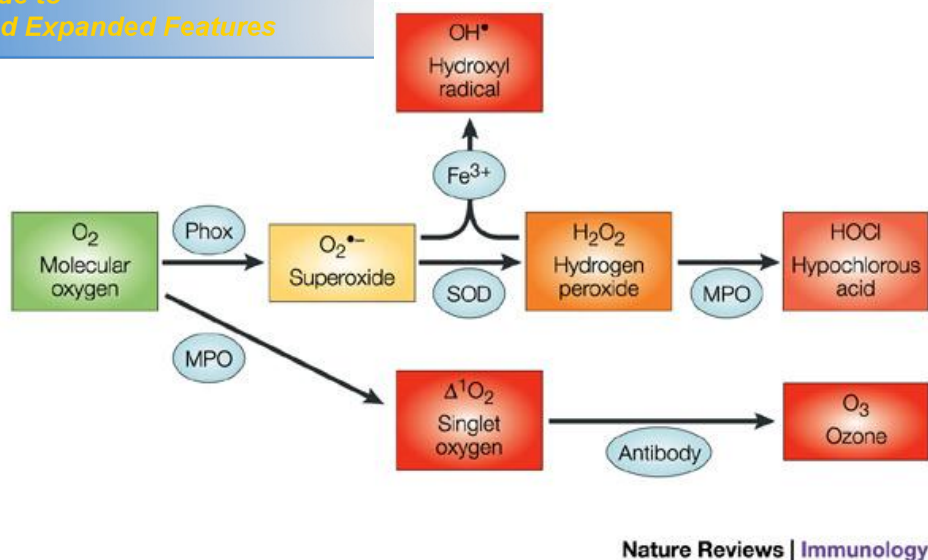


Figura 1 ó Espécies reativas derivadas do oxigênio gerados *in vivo* (Reproduzido por LAMBETH, 2004).

O $O_2^{\dot{E}}$ é produzido em quase todas as células aeróbicas durante a ativação de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Este radical é considerado pouco reativo, porém é rapidamente convertido a H_2O_2 e oxigênio (CONNER e GRISHAM, 1996). O H_2O_2 , apesar de não ser considerado um radical livre pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, sendo responsável pela síntese de $OH^{\dot{E}}$. Além disso, o H_2O_2 é capaz de atravessar membranas lipídicas, sendo altamente tóxico para as células. Contudo, o $OH^{\dot{E}}$ é considerado a ERO mais reativa em sistemas biológicos (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Os principais mecanismos de produção endógena das EROs incluem as reações mitocondriais, o metabolismo do citocromo P-450 e a ativação celular durante o processo inflamatório (VALKO et al., 2007). As EROs também podem ser provenientes de outras fontes, principalmente dos múltiplos sistemas enzimáticos, incluindo ciclooxygenase, lipoxigenase, xantina oxidase, MPO, óxido nítrico sintase e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, sendo esta última uma das principais fontes de $O_2^{\dot{E}}$ e amplamente expressa em células fagocíticas do sistema imunológico, células endoteliais vasculares e células do tecido renal (GEISZT et al., 2004). O estresse oxidativo favorece a ocorrência de ataques das EROs a componentes celulares, podendo resultar em danos

diversas estruturas celulares que, na ausência de reparação, podem alterar a funcionalidade de células, tecidos e órgãos. Ele está envolvido em uma grande variedade de condições patológicas e acredita-se que funcione como agente patogênico em muitas dessas condições (DHALA et al., 2000; VICTOR et al., 2009).

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 incluem defesas enzimáticas e não enzimáticas. As principais defesas enzimáticas de que uma célula dispõe incluem a glutatona peroxidase (GPx), a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD). Um dos mais efetivos antioxidantes enzimáticos intracelulares é a SOD, pois catalisa a dismutação do $O_2^{\cdot -}$ em oxigênio molecular e em H_2O_2 . Contudo, o H_2O_2 também é uma molécula que apresenta um potencial tóxico para o organismo e 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. A GPx catalisa a redução do H_2O_2 e peróxidos orgânicos para seus correspondentes álcoois à custa da oxidação de uma molécula de glutatona reduzida (GSH) (VALKO et al., 2006). Além do sistema de defesa antioxidante enzimático, as defesas antioxidantes não-enzimáticas são de fundamental importância para as células. As defesas não enzimáticas são constituídas pelas vitaminas C e E, β -caroteno e antioxidantes tiólicos como a GSH (VALKO et al., 2007). A GSH está presente na maioria das células, podendo estar livre ou ligada a proteínas, sendo o grupamento tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular. Sua capacidade redutora pode ser determinada pelo grupamento -SH presente no aminoácido cisteína. O papel protetor da GSH contra instalação de um estado de estresse oxidativo se deve a detoxificação direta de EROs, a participação como cofator para outras enzimas antioxidantes como a GPx, bem como a redução de outros antioxidantes a sua forma ativa (ARTEEL e SIES, 2001).

1.2 Estresse Oxidativo Proteico

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 50-75% dos radicais livres. As modificações oxidativas de proteínas são alterações covalentes que podem ser induzidas diretamente pelas EROs ou de maneira indireta através de reações com produtos secundários do estresse oxidativo (DALLE-DONE et al., 2006). Isto pode ser observado em alguns estudos que não diferenciam quais grupamentos carbonil são produzidos de maneira

s secundárias, fazendo com que esses grupamentos sejam considerados marcadores abrangentes de oxidação proteica (SHACTER, 2000).

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. Esses derivados carbonílicos altamente reativos são resultantes tanto da oxidação das cadeias laterais de arginina, lisina, treonina e prolina ou ainda pela clivagem das ligações peptídicas. 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 dos açúcares redutores (DALLE-DONNE et al., 2006).

O conteúdo de proteína carbonil pode ser considerado um biomarcador de dano oxidativo das proteínas. Uma vez formados, os grupos carbonil são quimicamente estáveis, o que facilita a sua detecção (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; DALLE-DONNE et al., 2006). Agentes que podem levar ao dano oxidativo proteico incluem o H_2O_2 , os xenobióticos como o paraquat, o tabagismo, a radiação gama, a radiação UV bem como os neutrófilos ativados (SHACTER, 2000). Visto que as proteínas desempenham diversas funções biológicas, o dano a essas estruturas pode promover várias consequências, incluindo alterações na atividade fisiológica destas moléculas (DALLE-DONNE et al., 2006). Dentre esses efeitos, destacam-se o dano a enzimas, o qual ocorre em modificações severas do metabolismo, e o dano a proteínas estruturais como, por exemplo, o fibrinogênio, que resulta na inibição da coagulação (SHACTER, 2000). De uma maneira geral, a carbonilação de proteínas pode vir a alterar a conformação da cadeia polipeptídica, o que poderá levar à inativação parcial ou total da função proteica (DALLE-DONNE et al., 2006).

Além da formação de grupos carbonil, há outros tipos de modificações proteicas que podem ser induzidas por EROs, incluindo a perda de grupos -SH, ligações dissulfeto, sulfóxido de metionina, ligações ditirosina, nitrotirosina e glicoxidação (também chamada de glicação). A perda de grupos -SH das proteínas pode ser induzido 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

ador de dano oxidativo proteico (WITKO-SARSAT et al., 1996).

Neste contexto, há uma constante investigação de indicadores biológicos que possam servir como potenciais biomarcadores em condições clínicas associadas ao estresse oxidativo. 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, podem conferir proteção aos componentes celulares.

1.3 Inflamação e *Burst* Oxidativo

A inflamação é uma resposta do organismo a diversos agentes lesivos, como, por exemplo, microorganismos, trauma físico ou células neoplásicas (DEJANA et al., 1995). Uma definição clássica para inflamação a classifica como um processo patológico caracterizado por lesão ou destruição de tecidos, causada por uma variedade de reações químicas e citológicas, além de reações sistêmicas (WHITE, 1999). A resposta inflamatória consiste basicamente de dois componentes principais: uma reação vascular e uma reação celular/tecidual. A reação vascular caracteriza-se pelo aumento do suprimento sanguíneo para as áreas afetadas, além do aumento da permeabilidade capilar que permite que moléculas de grande peso molecular, tais como anticorpos, possam atravessar o endotélio. As modificações vasculares que permitem essas alterações acontecem principalmente nas arteríolas e nas vênulas. Nas arteríolas, o relaxamento da musculatura lisa promove a vasodilatação, permitindo assim um maior fluxo sanguíneo para a região lesionada. Nas vênulas, é a contração das fibras de actina e miosina presentes no endotélio que promove espaço para a migração das células do sistema imune e das moléculas do leito vascular (LAWRENCE e 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 dentre as células fagocíticas as mais abundantes na circulação e também as primeiras células a serem ativadas na defesa pelo sistema imunológico inato contra infecções. Estas células migram por quimiotaxia até o local da infecção, onde elas fazem o reconhecimento, fagocitam e destroem microorganismos invasores através da liberação de

de EROs (LIBBY, 2002). Durante a ativação do sistema imune inato (fagócitos), 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.

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 et al., 2006). Os mediadores inflamatórios incluem proteases, constituintes do sistema complemento, sistema de cininas, sistema fibrinolítico e sistema de coagulação; mediadores liberados por fosfolípidios (prostaglandinas, leucotrienos e fator ativador de plaqueta); e outros mediadores como histamina, serotonina, substância P, neurocinina, fatores de transcrição, óxido nítrico, proteína C reativa (PCR) e MPO, além das citocinas (EISERICH et al., 2002; LAWRENCE e GILROY, 2007).

A geração de oxidantes pelos leucócitos está baseada na produção de EROs via redução da molécula de oxigênio molecular. Durante a exposição destas 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 $O_2^{\dot{E}}$, 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 estas células inflamatórias, como os neutrófilos e os monócitos são ativadas, ocorre uma série de eventos metabólicos, iniciando-se um processo de respiração não mitocondrial que resulta, inicialmente, na produção de $O_2^{\dot{E}}$ e também na síntese de outras EROs. Esta produção excessiva de EROs é suficiente para depletar a capacidade antioxidante local, favorecendo o que chamamos de *burst* oxidativo ou *burst* respiratório (CADENAS e DAVIES, 2000). A ativação de células fagocíticas tanto *in vivo* como *in vitro* resulta na geração de grandes concentrações de H_2O_2 e $O_2^{\dot{E}}$ através do *burst* respiratório e também na liberação da enzima MPO (NUSSBAUM et al., 2012).

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).

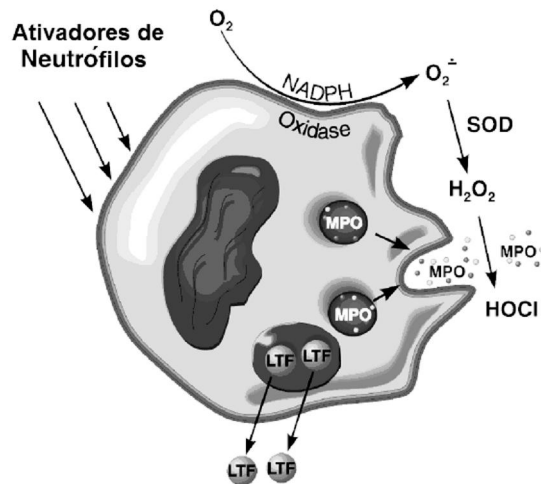


Figura 2 - Ação da NADPH oxidase, SOD e MPO presentes nos neutrófilos durante o *burst* oxidativo (Reproduzido por BRENNAN et al., 2003).

Sob condições normais, o complexo da NADPH oxidase encontra-se inativado e as subunidades que compõem este 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} e p22^{phox} e Rap1A) (BABIOR, 1999) (Figura 3). Após ativação, as subunidades citosólicas são translocadas para a membrana plasmática, onde se associam com o citocromo b558 para formar a oxidase ativa (BABIOR, 1999). Desta maneira, durante o *burst* respiratório, além da produção de EROs, as células fagocíticas também secretam uma variedade de substâncias com a finalidade de combater o organismo invasor, incluindo citocinas, tais como fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina-8 e fator de ativação plaquetária (PAF) (WITKO-SARSAT et al., 2003).

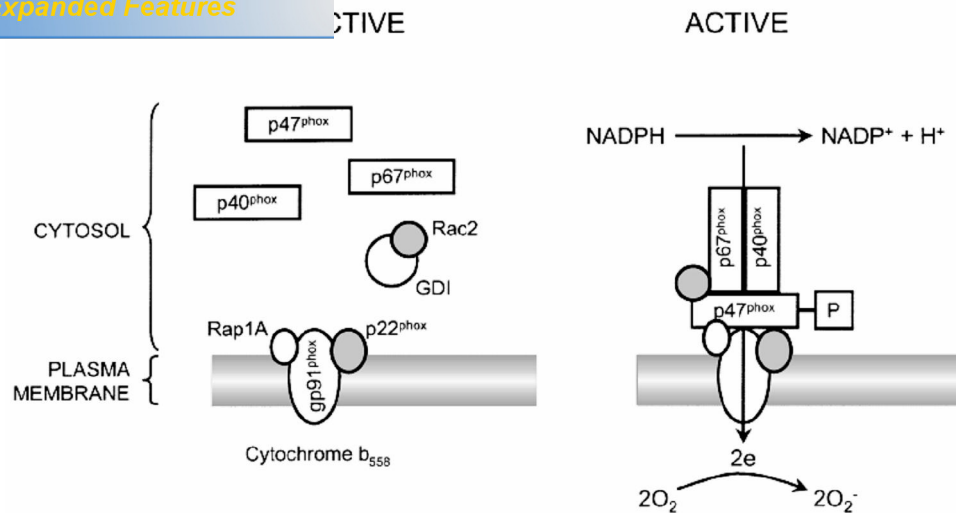


Figura 3 - Complexo da NADPH oxidase nos estados inativado e ativado (Representado por WARD et al., 2003).

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 (5% do peso seco dessas células), 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 H₂O₂ e íons cloreto (Cl⁻) (Figura 4). Seu mecanismo de ação envolve a reação entre MPO na forma férrica com H₂O₂, levando a formação da MPO-I através da transferência de dois elétrons (ABU-SOUD e HAZEM, 2000). A MPO I pode oxidar íons Cl⁻, formando o HOCl. Além disso, a MPO também pode utilizar íons brometo e tiocianeto como substrato para converter o H₂O₂ a ácido hipobromoso e ácido hipotiocianoso, respectivamente (SUMMERS et al., 2012).

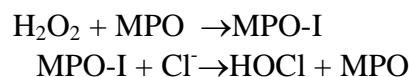


Figura 4 ó Reações catalisadas pela MPO (Reproduzido por ABU-SOUD e HAZEM, 2000).

Desta maneira, 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 et al., 2000). Além disso, a MPO mostrou-se capaz de ativar metaloproteinases e promover a desestabilização e ruptura da superfície da placa aterosclerótica (FU, 2001). A MPO também catalisa o consumo de NO derivado do endotélio, reduzindo a sua biodisponibilidade e prejudicando suas funções vasodilatadoras e antiinflamatórias (ABU-SOUD et al., 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).

1.3 Modificações oxidativas induzidas por HOCl

O HOCl é um potente oxidante que reage prontamente com as mais variadas moléculas biológicas, incluindo DNA, lipídios e proteínas (HAWKINS et al., 2003). A interação deste oxidante com a molécula de DNA resulta na dissociação da dupla fita de DNA devido à interrupção nas ligações pontes de hidrogênio (PRÜTZ, 1998), resultando na formação de cloraminas (HAYATSU et al., 1971; HAWKINS e DAVIES, 2001). Por outro lado, cloridrinas são exemplos de produtos formados quando há interação entre o HOCl e ácidos graxos insaturados e colesterol (WINTERBOURN e KETTLE, 2000). Estes produtos podem exercer efeitos fisiológicos, incluindo a desestabilização estrutural da membrana plasmática e citotoxicidade, porém, a formação de cloridrinas é relativamente lenta e, conseqüentemente, estas são encontradas em baixas concentrações (VISSERS et al., 2001;). Além dos lipídios, alguns antioxidantes também podem reagir rapidamente com o HOCl, tais como a GSH, o ascorbato, assim como alguns fenóis e hidroquinonas (PATTISON et al.,

os principais alvos para as modificações oxidativas do

HOCl devido à sua elevada reatividade com este oxidante aliado ao fato destas moléculas serem abundantes nos sistemas biológicos. Foi demonstrado que o tratamento de proteínas isoladas com o HOCl resultou principalmente em alterações nas cadeias laterais de aminoácidos, podendo promover a fragmentação de proteínas e o aparecimento de ligações cruzadas/agregação (HAWKINS et al., 2003).

O grupo tiol livre do aminoácido Cys e o grupo tioéter do aminoácido metionina são sítios particularmente reativos (PATTISON e DAVIES, 2006). No entanto, o HOCl interage preferencialmente com as cadeias laterais de aminoácidos. Além disso, este oxidante também 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 amônia (NH₃) ou com o grupo amino de aminoácidos e proteínas (THOMAS et al., 1986), sendo que N-cloraminas mantêm o potencial oxidante do HOCl, porém, apresentam maior seletividade em suas reações quando comparadas ao HOCl (PESKIN et al., 2003; PESKIN et al., 2006).

Foi demonstrado que a exposição de diferentes tipos celulares a concentrações fisiológicas e patológicas de HOCl resulta em lise celular e depleção dos níveis de GSH, tióis celulares e ATP, visto que este oxidante penetra facilmente nas membranas celulares (PULLAR et al., 1999). As N-cloraminas também induzem danos, porém, seus alvos celulares não estão totalmente elucidados e são diferentes dos alvos moleculares do HOCl (MIDWINTER et al., 2006). 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 deste oxidante são responsáveis pela iniciação do dano tecidual que desempenha 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), artrite reumatóide (SCHILLER et al., 2003), alguns tipos de câncer (WEITZMAN et al., 1990) e doença renal (MALLE et al., 2003).

Grupos tióis plasmáticos são alvos importantes para o HOCl e N-cloraminas, o que contribui para uma diminuição significativa da capacidade antioxidante do plasma. Neste contexto, o tiol livre presente na albumina (Cis-34) é o principal alvo presente no plasma humano para o ataque do HOCl (CARR et al., 2001). Além da albumina, também há outras proteínas plasmáticas que são suscetíveis à oxidação induzida pelo HOCl, tais como a α_1 -antitripsina (SUMMERS et al., 2008). Mais recentemente, Summers et al. (2012) demonstraram que a exposição de células endoteliais da artéria coronária humana em um meio contendo HOCl e N-cloraminas, o que mimetiza uma condição inflamatória, resultou na

possuem grupamentos tióis, incluindo a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), galectina-1, vimentina, α -tubulina e α -actina (SUMMERS et al., 2012).

As reações entre HOCl e proteínas também podem resultar na inibição da atividade enzimática, seja como consequência da modificação de aminoácidos reativos presentes nas cadeias laterais ou que fazem parte do sítio ativo da enzima ou, ainda, através de fragmentação protéica ou agregação. Enzimas com resíduos Cis no sítio ativo são altamente suscetíveis à inativação induzida por HOCl. A papaína, GAPDH e álcool desidrogenase são exemplos de enzimas que possuem resíduos de aminoácidos Cis no sítio ativo e que são rapidamente inativadas por quantidades equimolares de HOCl (ALBRICH et al., 1981). A GPx também é rapidamente inativada pelo HOCl. Além destas, foi demonstrado que a atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD foram reduzidas em presença de HOCl (ARUOMA e HALLIWELL, 1987).

Neste contexto, com o avanço de novas tecnologias, é possível avaliar todos os sítios reativos das proteínas que são suscetíveis à oxidação pelo HOCl através de modelos computacionais (PATTISON e DAVIES, 2006). Este modelo pode ser utilizado como um guia para prever as alterações oxidativas induzidas pelo HOCl em qualquer proteína, desde que se tenha conhecimento da sequência de aminoácidos desta proteína (HAWKINS et al., 2003).

1.4 Produtos proteicos de oxidação avançada

A identificação e a caracterização dos agentes oxidantes específicos responsáveis pelas modificações das biomoléculas em processos patológicos tem sido um desafio. A avaliação de biomarcadores das reações que envolvem as EROs têm potencial não apenas para determinar a extensão do dano oxidativo, mas também para prever a eficiência das estratégias terapêuticas destinadas a reduzir ou prevenir os danos promovidos pelo estresse oxidativo. Recentemente, foi descrita e caracterizada uma nova classe de compostos formados em consequência do estresse oxidativo, a qual foi designada como AOPP (WITKO-SARSAT et al., 1996). Esses compostos são considerados um grupo heterogêneo de proteínas modificadas principalmente pela ação do HOCl (WITKO-SARSAT et al., 1996; HENLE et al., 1999). Este ácido é um dos oxidantes formados *in vivo* pela ação da enzima MPO, que catalisa a reação entre o Cl^- e o H_2O_2 para gerar grandes quantidades de HOCl (KETTLE et al., 1997). Neste

2004) identificaram a albumina como o principal alvo do HOCl para originar os AOPP (CAPEILLÈRE-BLANDIN et al., 2004).

A fim de elucidar as propriedades moleculares de AOPP, foram realizadas análises de espécies moleculares e das propriedades espectrais destes produtos, sendo possível demonstrar que há modificações estruturais, como a formação de grupamentos carbonílicos e de ditirosina, ambas induzidas pela ação do HOCl sobre as proteínas (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, que AOPP são compostos de proteínas oxidadas de baixo peso molecular, representado pela albumina oxidada, e alto peso molecular, representado por agregados de albumina através de ligações dissulfeto e/ou ligações cruzadas contendo ditirosina. Além disso, foi realizada uma análise do sequenciamento de aminoácidos da albumina exposta ao HOCl e verificou-se que houve uma alteração no conteúdo de alguns resíduos de aminoácidos específicos quando comparado à albumina nativa, incluindo os aminoácidos 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). Neste contexto, considerando a existência destas modificações estruturais, também foi demonstrado que proteínas carbonil e ditirosina correlacionaram-se positivamente com os níveis de AOPP em pacientes urêmicos (WITKO-SARSAT et al., 1998). Desta maneira, os AOPP são considerados marcadores confiáveis e abrangentes para estimar o grau de modificações oxidativas de proteínas (PIWOWAR et al., 2007). Para contribuir com esses achados, Witko-Sarsat et al. (1996) demonstraram que é possível formar AOPP *in vitro* (albumina-AOPP), incubando a albumina em uma solução de HOCl (WITKO-SARSAT et al., 1996).

O estado de estresse oxidativo mostra-se bem estabelecido em pacientes submetidos à hemodiálise. Nestes pacientes, a interação entre o sangue e a membrana de diálise promove a ativação de células do sistema imunológico, como os neutrófilos e os monócitos, bem como a geração subsequente de EROs, incluindo o $O_2^{\dot{E}}$ e seus derivados H_2O_2 e OH^{\cdot} , via complexo enzimático da NADPH oxidase e o HOCl via MPO presentes nestas células (Figura 5). O acúmulo de AOPP foi primeiramente descrito nesses pacientes em hemodiálise com IRC (WITKO-SARSAT et al., 1996). Atualmente, sabe-se que outras condições clínicas relacionadas com o estresse oxidativo também estão associadas com o aumento dos níveis de AOPP, tais como diabetes (PIWOWAR et al., 2007; PANDEY et al., 2010), obesidade (ATABEK et al., 2006), nefrite glomerular (GRONE et al., 2002) e lesões ateroscleróticas (BRASEN et al., 2003).

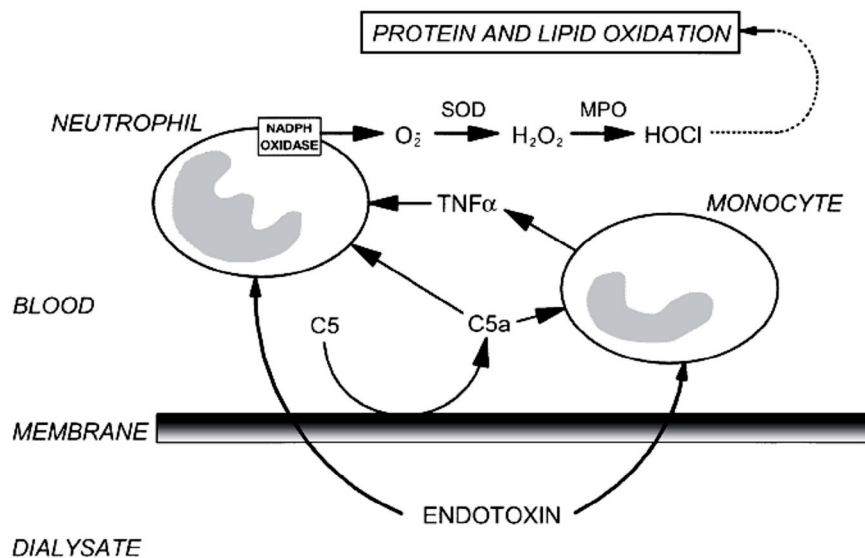


Figura 5 ó Potenciais vias de ativação de neutrófilos e monócitos durante a hemodiálise (Reproduzido de WARD et al., 2003).

A IRC 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 IRC, 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). Também foi verificado que indivíduos com IRC não submetidos à hemodiálise também apresentaram níveis elevados de AOPP (WITKO-SARSAT et al., 1998). Estudos mais recentes confirmam este aumento dos níveis plasmáticos de AOPP em pacientes com IRC e sugerem que o acúmulo crônico deste biomarcador/mediador desempenha um importante papel na patogênese, bem como na progressão, desta patologia, visto que há uma correlação inversa entre os níveis de AOPP 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 IRC (SARNAK, 2003). No entanto, os fatores que promovem aterosclerose nesses pacientes não está esclarecida. Neste contexto, foi demonstrado que os níveis de AOPP correlacionaram-se com a espessura da camada íntima da carótida (DRÜEKE et al., 2002) e este biomarcador/mediador pode estar relacionado com eventos cardiovasculares ateroscleróticos (LIU et al., 2006).

encontram-se 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 AOPP é um potencial preditor de efeitos adversos, incluindo a não recuperação de IRA nos pacientes deste estudo (LIANG et al., 2012).

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) (MARTINS, 2009). Skvarilova et al. (2005) observaram que os pacientes com SCA têm níveis aumentados de AOPP e que a concentração plasmática desses produtos difere significativamente de voluntários saudáveis (SKVARILOVÁ et al., 2005). Neste contexto, Kaneda et al. (2002) demonstraram que os níveis de AOPP também se apresentaram elevados em pacientes submetidos à angiografia coronária devido à suspeita de doença arterial coronariana (DAC) e observaram, através de modelos de análise multivariada, que a concentração plasmática de AOPP 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 AOPP tanto em pacientes com angina instável quanto em pacientes com IAM (BARSOTTI et al., 2011). Também foi demonstrado que o aumento dos níveis de AOPP, independentemente de fibrinogênio e de proteína C reativa (PCR), foi um preditor de eventos ateroscleróticos cardiovasculares em pacientes com elevado risco de aterotrombose (DESCAMPS-LATSCHA et al., 2005).

Os níveis de AOPP também foram estudados em pacientes diabéticos. Diabetes *mellitus* (DM) é um grupo de distúrbios metabólicos associados ao metabolismo dos carboidratos no qual a glicose é subutilizada, produzindo hiperglicemia (BURTIS et al., 2008), 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 AOPP apresentaram-se elevados em pacientes com DM tipo 2 quando comparados com indivíduos saudáveis. Além disso, também verificaram que os

opatas e os pacientes diabéticos obesos (com o índice de massa corpórea maior que 30) eram os que apresentaram os maiores níveis de AOPP (PIWOWAR et al., 2007). Pandey et al. (2010) também investigaram os níveis de AOPP em pacientes com DM tipo 2 e demonstraram que, além destes pacientes apresentarem níveis elevados deste marcador de oxidação protéica, também obtiveram níveis plasmáticos reduzidos de -SH (PANDEY et al., 2010). Além disso, foi observada uma forte correlação negativa entre os níveis séricos de albumina e de hemoglobina glicada (HbA1c) e uma correlação positiva entre os níveis séricos de AOPP e a concentração de HbA1c 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 DM 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 (CAKATAYET al., 2005; PIWOWAR et al., 2007; PANDEY et al., 2010).

1.5. Produtos proteicos de oxidação avançada e inflamação

As células fagocíticas, além de desempenharem um papel fundamental no processo inflamatório, são uma importante fonte de oxidantes reativos (ODAJIMA et al., 1998). Assim, sabe-se que essas células contêm a enzima MPO, e que esta é a única enzima capaz de sintetizar oxidantes clorados *in vivo*, promovendo a oxidação de proteínas (KETTLE et al., 1997) com consequente formação de AOPP.

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 AOPP em pacientes com IRC. Neste mesmo estudo, com a finalidade de determinar o papel de AOPP no desequilíbrio do sistema imunológico associado à IRC, foi verificado que estes pacientes apresentaram níveis significativamente elevados de TNF- α , bem como os de receptores solúveis de TNF- α (TNF-Sr75), e os níveis tanto desta citocina quanto dos receptores solúveis correlacionaram-se positivamente com as concentrações de AOPP. Além disso, os autores observaram que os AOPP produzidos *in vitro* (albumina-AOPP) mantiveram a capacidade de ativar o *burst* respiratório em monócitos humanos isolados (WITKO-SARSAT et al., 1998). Em um estudo posterior, foi observado que a albumina-AOPP também foi capaz de ativar neutrófilos *in vitro* de maneira concentração-dependente. Esta ativação foi observada com base na avaliação das atividades da NADPH oxidase e da MPO, as quais

WITKO-SARSAT et al., 2003). De maneira interessante, frações plasmáticas enriquecidas de AOPP (AOPP-derivados do plasma) extraídas de pacientes hemodialisados através de cromatografia líquida de desempenho rápido (FPLC) mantiveram a capacidade de ativar os monócitos e os neutrófilos, e esta 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, de maneira resumida, os AOPP 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). Portanto, com base nos experimentos *in vitro*, verificou-se que os AOPP promovem o estresse oxidativo e a resposta inflamatória, além de amplificarem a sua própria síntese via ativação do complexo NADPH oxidase, tendo como produto final o radical $O_2^{\dot{E}}$, e a MPO produzindo HOCl (WITKO-SARSAT et al., 2003), perpetuando o estado pró-oxidativo e pró-inflamatório. Desde então, tem-se sugerido que, além de um marcador de estresse oxidativo proteico, os AOPP podem ser considerados uma nova classe de mediadores inflamatórios. Porém, o mecanismo de ação pelo qual os AOPP agem não está completamente elucidado (WITKO-SARSAT et al., 2003; LENTINI et al., 2010).

A fim de investigar o potencial pró-inflamatório dos AOPP, demonstrou-se que a infusão intravenosa de albumina-AOPP aumentou significativamente a infiltração de macrófagos nos rins remanescentes de ratos nefrectomizados (LI et al., 2007). O aumento da infiltração de macrófagos para o meio tecidual também foi observado em aorta de coelhos hipercolesterolêmicos tratados com albumina-AOPP. Neste mesmo estudo, observou-se um aumento dos níveis de AOPP em homogenizado de aorta dos animais tratados com albumina-AOPP e também um aumento na deposição de oxLDL na aorta destes animais. Além disso, os coelhos controles (não-hipercolesterolêmicos) e que receberam administrações de albumina-AOPP apresentaram um aumento dos níveis plasmáticos de AOPP, uma redução na atividade da enzima GPx e um aumento dos níveis de oxLDL, bem como nos níveis de TNF- α , demonstrando o potencial oxidante e pró-inflamatório dos AOPP (LIU et al., 2006).

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 mensageiras (GEISZT et al., 2004). Foi demonstrado que a administração intravenosa de albumina-AOPP aumentou significativamente a produção dos radicais $O_2^{\dot{E}}$ via ativação da NADPH oxidase em homegenizado renal de ratos diabéticos, e também a expressão renal de subunidades fundamentais para ativação deste complexo enzimático, tais como a p47^{phox} e a gp91^{phox}. Estes efeitos promovidos pela administração de

pela administração oral de apocinina, um inibidor da NADPH oxidase. Neste estudo, a administração intravenosa de albumina-AOPP induziu um processo inflamatório nos rins, demonstrado pelo aumento da infiltração tecidual de macrófagos, bem como pelo aumento da expressão (a nível de RNA mensageiro e proteína) de citocinas inflamatórias, como a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e o fator de crescimento transformador (TFG-β). Além disso, através de análise imunohistoquímica do tecido renal, foi possível observar que albumina-AOPP também promoveu alterações estruturais, incluindo hipertrofia glomerular e acúmulo de matriz extracelular, além de promover anormalidades funcionais como a albuminúria (SHI et al., 2008). Estes dados sugerem que AOPP pode ser um indutor de estresse oxidativo e inflamação *in vivo*, via estimulação do complexo enzimático NADPH oxidase, em uma série de situações fisiopatológicas. Neste contexto, sugere-se ainda que as EROs geradas durante o estresse oxidativo promovido pelos AOPP podem desempenhar um importante papel na sinalização celular, uma vez que promovem a ativação do fator nuclear-κB (NF-κB), que é o fator de transcrição inflamatório mais importante (KUNSCH e MEDFORD, 1999).

Além de promover um estado pró-inflamatório sistêmico, os AOPP também geram alterações celulares. Wei et al. (2008) investigaram os mecanismos pelos quais estes produtos podem causar alterações celulares e demonstraram que a albumina-AOPP, quando incubada com células mesangiais renais, promoveu uma série de efeitos. Primeiramente, albumina-AOPP aumentou a geração de $O_2^{\dot{E}}$ citosólica através da ativação da NADPH oxidase das células mesangiais via fosforilação da subunidade $p47^{phox}$ e, subsequentemente, translocação desta subunidade para membrana plasmática. Também foi possível observar que a albumina-AOPP induziu a ligação entre as subunidades $p47^{phox}$ e $p22^{phox}$, sendo este processo imprescindível para ativação do complexo enzimático. Além disso, a elevada geração de $O_2^{\dot{E}}$ através da NADPH oxidase é dependente da ativação da proteína quinase C (PKC), visto que AOPP estimulou a fosforilação desta quinase e um inibidor da PKC (Ro-32-0432) bloqueou a ativação do complexo enzimático promovida pelos AOPP. A ativação desta via (ativação da NADPH oxidase-dependente de PKC) pelos AOPP (Figura 6) foi a responsável por resultar em um aumento da deposição de matriz extracelular, que 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 (WEI et al., 2008).

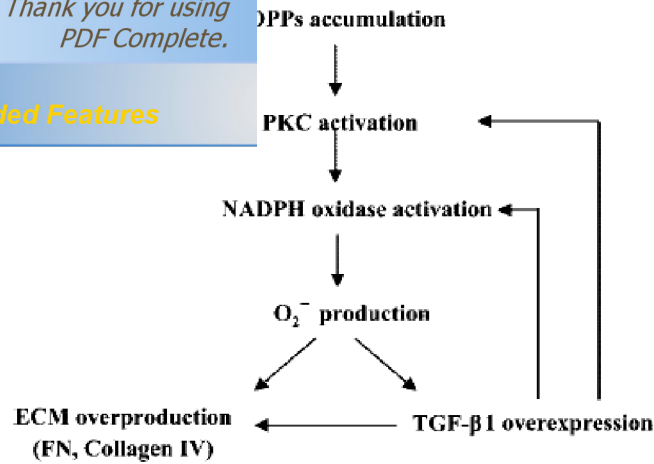


Figura 6 ó Via de sinalização, dependente de PKC, envolvida na elevação de $O_2^{\dot{E}}$ e de matriz extracelular promovida por AOPP em células mesangiais (Reproduzido de WEI et al., 2008).

Corroborando com esses achados, recentemente Zhou et al. (2009), através de um estudo realizado *in vitro* e *in vivo*, também observaram que a albumina-AOPP promoveu alterações em outro tipo celular, os podócitos renais. 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. Considerando que o acúmulo crônico de AOPP no plasma aumenta significativamente a excreção de proteínas, acelerando a glomerulosclerose (LI et al., 2007), e que a depleção de podócitos está envolvida no desenvolvimento de proteinúria (TOYODA et al., 2007), o estudo de Zhou et al., (2009) determinou que a administração crônica de albumina-AOPP em ratos induziu apoptose em podócitos, bem como em cultura de podócitos. Estes resultados foram confirmados por análise do tecido renal dos animais, sendo constatado uma redução do número e da densidade de podócitos. Neste sentido, foi observado que este processo apoptótico induzido por albumina-AOPP foi mediado pela ativação da NADPH oxidase e também pelo aumento da expressão de proteínas envolvidas nas cascatas pró-apoptóticas, incluindo a p53, Bax e caspase-3 (ZHOU et al., 2009). De maneira interessante, um estudo realizado *in vitro* demonstrou que AOPP também foi capaz de induzir danos em células tubulares renais através de uma via dependente de receptores *scavenger* CD-36 (IWAO et al., 2008). Neste contexto, Cao et al., (2012) demonstraram que albumina-AOPP induziu um aumento da expressão de proteínas envolvidas na ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona intrarenal tanto *in vivo* quanto *in vitro* via receptores CD-36. Considerando que a ativação desta via está envolvida na progressão de IRC, estes autores sugerem que o acúmulo

have na progressão desta patologia (CAPPEILLERRE-BLANDIN et al., 2006; CAO et al., 2012).

Além dos diferentes aspectos relacionados à formação de AOPP, níveis elevados de produtos finais de glicação avançada (AGEs) também têm sido relatados em uma série de distúrbios patológicos, incluindo DAC, DM e IRC. Considerando o envolvimento do AOPP nessas mesmas patologias e que estes produtos proteicos agem de forma semelhante aos AGEs, Witko-Sarsat et al. (1998) demonstraram que há uma forte correlação entre as concentrações plasmáticas de AOPP e os níveis de AGEs em pacientes urêmicos (WITKO-SARSAT et al., 1998). A hiperglicemia crônica é a responsável por promover a formação de AGEs, tais como pentosidina e carboximetilisina (CML), na qual a glicose reage de forma não enzimática com o grupo amino de proteínas, principalmente a hemoglobina e a albumina (WAUTIER et al., 2004). Neste contexto, foi demonstrado que os AOPP podem agir nos mesmos receptores que os AGEs, os os receptores multi-ligantes de AGEs (RAGE). Estes receptores transmembrânicos estão expressos em células renais, células endoteliais, bem como em macrófagos, e o aumento da expressão destes receptores têm sido implicado na patogênese de uma série de condições clínicas que envolvem o processo inflamatório e situações de hipóxia e isquemia (CHANG et al., 2008; BUCCIARELLI et al., 2008). Além disso, foi demonstrado que, após a interação entre AOPP e RAGE em células endoteliais, ocorre uma sequência de eventos que incluem a geração de radicais O_2^- , ativação da NADPH oxidase, ativação da quinase regulada por sinal extracelular (ERK 1/2) e ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) p38 (GUO et al., 2008). Marsche et al. (2007) também investigaram o envolvimento da albumina-AOPP com RAGE, e neste estudo foi possível observar que albumina-AOPP exerceu um papel chave na inflamação vascular mediada por RAGE. Primeiramente, eles demonstraram através de técnicas de imunohistoquímica a colocalização de proteínas modificadas por HOCl (albumina modificada por HOCl) e a expressão de RAGE em secções de aorta humana com lesões ateroscleróticas. Posteriormente, os autores demonstraram através de ensaios de *binding* que a albumina-AOPP tem grande afinidade por este receptor e que esta 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 (MARSCHÉ et al., 2007).

Atividade antioxidante e antiinflamatória

Sabe-se que o estresse oxidativo e a inflamação desempenham um importante papel na patogênese e na progressão de muitas condições clínicas e que em algumas dessas situações patológicas há estudos que demonstram que há um acúmulo de AOPP. Visto que este marcador/mediador é fruto de reações oxidativas, o uso de substâncias com potencial antioxidante e antiinflamatório pode promover um benefício no tratamento destas desordens, inibindo, conseqüentemente, os efeitos deletérios dos AOPP. Neste contexto, a avaliação da atividade antioxidante e antiinflamatória de compostos em modelos *in vitro* envolvendo a formação de AOPP pode apresentar especial interesse. Dentre esses compostos, a NAC e a FBP podem ser substâncias promissoras para esta finalidade.

1.6.1 N-acetilcisteína

NAC é um doador de grupo sulfidril muito semelhante ao aminoácido cisteína (ATKURI et al., 2007). A metabolização da NAC libera o aminoácido cisteína que atua como precursor direto da síntese da GSH (SATANGELO et al., 2003). 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). Na prática clínica, a NAC é amplamente utilizada devido a suas características mucolíticas e detoxificantes na intoxicação por paracetamol. Outros estudos demonstram que a NAC apresenta uma atividade complexante com metais (ATKURI, et al., 2007). Além disso, este composto também apresenta atividade antioxidante *per se* através do sequestro de radicais OH^\cdot e O_2^\cdot (BENRAHMOUNE et al., 2000).

Além disso, foi demonstrado que a NAC pode atuar no metabolismo mitocondrial influenciando a fosforilação oxidativa através de dois mecanismos principais: protegendo proteínas contra o dano oxidativo devido à manutenção dos grupos -SH que são essenciais para a atividade enzimática, além de inibir a oxidação lipídica presentes nas membranas mitocondriais (MIQUEL et al., 1995). Neste contexto, a NAC promoveu o relaxamento vascular endotelial pela supressão dos níveis de radicais livres, incluindo O_2^\cdot , e desta forma aumentou a biodisponibilidade de óxido nítrico (MARUI et al., 1993). Além disso, NAC reduziu em 90% a expressão de molécula de adesão de células vasculares 1 (VCAM-1) através da inibição do fator de transcrição NF- κ B. A NAC também inibiu a expressão de VCAM-1 e E-selectina estimulada pela interleucina-1 através de mecanismos ainda não

Assim, estes estudos sugerem que a NAC melhora a função endotelial e atenua o processo inflamatório vascular através do antagonismo dos efeitos intracelulares da geração de radicais livres, pelo aumento do óxido nítrico e pela redução da adesão leucocitária ao endotélio (ZAFARULLAH et al., 2003). Estudos experimentais demonstraram que a NAC também melhorou a função renal e reduziu a inflamação intersticial em ratos submetidos à lesão por isquemia e reperfusão. Estes efeitos estão associados ao aumento de glutatona renal, sugerindo que a NAC atenua o estresse oxidativo renal e sistêmico neste modelo (NITESCU et al., 2006). A NAC também protegeu de modo dose-dependente pacientes com IRC submetidos à hemodiálise, prevenindo a deteriorização da função renal induzida por contraste após procedimento de angiografia coronária (KAY et al., 2003). No contexto do estresse oxidativo promovido pelos AOPP, Witko-Sarsat et al. (2003) demonstraram que NAC inibiu a geração de espécies reativas provenientes da ativação do complexo NADPH oxidase e MPO induzida por albumina-AOPP em neutrófilos (WITKO-SARSAT et al., 2003)

1.6.2 Frutose-1,6-bisfosfato

FBP é um açúcar bifosforilado e um metabólito intermediário altamente energético da glicólise. Esta molécula tem sido objeto de muitos estudos, sendo que alguns destes atribuem a ela uma atividade protetora sobre diferentes órgãos, tecidos e células. Os efeitos da FBP têm sido atribuídos principalmente a: (a) sua capacidade de aumentar o metabolismo dos carboidratos por intervenção na rota glicolítica, não somente como um regulador metabólico, mas também como um substrato; (b) redução da demanda energética e um conseqüente aumento da eficiência metabólica; (c) estabilização das membranas celulares (ROIG et al., 1994). Assim, também há estudos demonstrando que a FBP apresenta capacidade antioxidante e antiinflamatória através da inibição do metabolismo oxidativo de neutrófilos (SCHINETTI et al., 1986).

Tem sido demonstrado que a FBP apresenta efeitos terapêuticos em várias condições patológicas, incluindo situações de isquemia, choque e lesões tóxicas (AIUB et al., 2003). Também foram documentados os efeitos benéficos de FBP em deficiências orgânicas cardíacas, renais, cerebrais, hepáticas e intestinais (intestino delgado) (Oliveira et al., 1992; Nunes et al., 2003). No entanto, os mecanismos pelos quais a FBP desempenha esse papel protetor ainda não foram totalmente elucidados. Um possível mecanismo de proteção inclui o metabolismo anaeróbico da FBP para gerar adenosina trifosfato (ATP) ou reduzir a sua perda,

e cálcio, inibindo o efeito citotóxico promovido por altas concentrações deste íon em algumas condições patológicas (DONOHOE et al., 2001). Esta capacidade da FBP em diminuir a concentração de cálcio extracelular melhora o rendimento mecânico e respiratório do coração isquêmico (DONOHOE et al., 2001).

Também foi demonstrado que a FBP reduziu a formação de $O_2^{\dot{E}}$ e o mecanismo envolvido nesta redução pode ser decorrente do aumento nos níveis de ATP, tendo em vista que o ATP é um regulador fisiológico da atividade catalítica do complexo NADPH oxidase (BABIOR et al., 1981). Além disso, foi demonstrado que a FBP inibiu 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). A inibição da formação de EROs também pode ser mediada em parte pela estabilização de glutathiona intracelular (VEXLER et al., 2003). A atividade anti-oxidante e citoprotetora da FBP tem sido documentada em várias desordens relacionadas com o estresse oxidativo, incluindo choque séptico (DE MELLO et al., 2011; SANTOS et al., 2012), lesão hepática promovida por isquemia (MORESCO et al., 2004), complicações diabéticas (XU et al., 2010), lesão induzida pela hipotermia (GÁMEZ et al., 2008). Além disso, o papel anti-oxidante e citoprotetor da FBP também tem sido evidenciado em processos como apoptose (CALAFELL et al., 2009), excitotoxicidade (ROGIDO et al., 2003) e produção de radicais livres por neutrófilos (LAZZARINO et al., 1992) e pelo complexo xantina desidrogenase/xantina oxidase (AKIMITSU et al., 1995). A capacidade que a FBP tem de capturar radicais livres parece estar relacionada com a sua atividade anti-inflamatória, promovendo uma inibição da produção de moléculas inflamatórias, incluindo a prostaglandina E2 (AHN et al., 2002) e citocinas, como por exemplo TNF- (LOPES et al., 2006), bem como a inibição da expressão da cicloxigenase- 2 (AHN et al., 2002).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estabelecer um modelo experimental de indução da formação de AOPP, bem como avaliar o potencial de alguns compostos em prevenir a formação destes produtos *in vitro*.

2.2. Objetivos Específicos

- Promover a indução da formação de AOPP *in vitro* através do HOCl;
- Avaliar a capacidade da NAC e da FBP em prevenir a formação de AOPP *in vitro*;
- Investigar o efeito da associação de NAC e FBP sobre a formação de AOPP *in vitro*.



Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo apresentado a seguir inclui as seções *Materials and Methods*, *Results*. Além disso, também é apresentada uma discussão dos resultados e a relação das referências utilizadas para a elaboração deste artigo, o qual está disposto no formato publicado no periódico *Inflammation*.

Fructose-1,6-Bisphosphate and *N*-Acetylcysteine Attenuate the Formation of Advanced Oxidation Protein Products, a New Class of Inflammatory Mediators, *In Vitro*

Guilherme Vargas Bochi,^{1,2} Vanessa Dorneles Torbitz,¹ Lara Peruzzolo Cargnin,¹ Manuela Borges Sangoi,^{1,3} Roberto Christ Vianna Santos,⁴ Patrícia Gomes,⁵ and Rafael Noal Moresco^{1,2,3,6}

Abstract—The accumulation of advanced oxidation protein products (AOPP) has been linked to several pathological conditions. Previous studies have identified AOPP as a novel biomarker of oxidative damage to proteins and a novel class of mediator of inflammation. The aim of this study was to determine the effects of fructose-1,6-bisphosphate (FBP) and *N*-acetylcysteine (NAC) as well as the synergistic effect of both treatments on the formation of AOPP *in vitro*. For this purpose, we incubated the human serum albumin (HSA) with various hypochlorous acid (HOCl) concentrations to produce albumin-advanced oxidation protein products (HSA-AOPP). Both FBP and NAC were capable of inhibiting the formation of HOCl-induced AOPP in a concentration-dependent manner. The synergistic effect promoted by the association of these drugs showed to be more effective than when tested alone. Thus, both FBP and NAC may be good candidates to mitigate and neutralize pro-inflammatory and pro-oxidant effects of AOPP in several diseases.

KEY WORDS: advanced oxidation protein products; fructose-1,6-bisphosphate; inflammation; *N*-acetylcysteine; oxidative stress.

INTRODUCTION

Physiological oxidative stress is caused by an imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and by the ability to detoxify the reactive intermediates or repair the resulting damage [1]. Numerous enzymatic and nonenzymatic mechanisms lead to the production of ROS [2]. Consequently, disturbances in the balance between ROS formation and antioxidants can damage cell components including proteins, lipids and DNA [3]. The oxidative modification of any of such biomolecules can result in diverse functional changes and contribute to the development of diseases that involve abnormalities of oxygen metabolism [4, 5]. There are several mechanisms which induce protein oxidation since all the amino acyl side chains can become oxidatively modified. Accordingly, there are numerous different types of protein oxidative modification, and new compounds and modified structures are formed. Furthermore, several methods may be used for

¹Laboratório de Bioquímica Clínica, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima 1000, Prédio 26, Sala 1401, Camobi, 97105-900 Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

²Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

³Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

⁴Laboratório de Microbiologia, Ciências da Saúde, Centro Universitário Franciscano, UNIFRA, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

⁵Programa de Pós-Graduação em Nanociências, Centro Universitário Franciscano, UNIFRA, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

⁶To whom correspondence should be addressed at Laboratório de Bioquímica Clínica, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima 1000, Prédio 26, Sala 1401, Camobi, 97105-900 Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. E-mail: rmmoresco@yahoo.com.br

the detection and quantification of such modifications [6].

Recently, advanced oxidation protein products (AOPP), new markers of protein oxidation, have begun to attract the attention of various investigators [7–10]. In the search for specific markers of protein oxidation in the plasma of hemodialysis patients, AOPP were firstly described as a novel family of oxidized protein compounds in 1996 by Witko-Sarsat [7]. Subsequently, the accumulation of plasma AOPP was found in subjects with diabetes [11–13], atherosclerotic lesions [14], metabolic syndrome [15], glomerular nephritis [16], coronary artery disease [17] and nondiabetic chronic kidney disease [18]. Biochemical characterization has revealed that AOPP are dityrosine-containing and cross linking protein products formed during oxidative stress by the reaction of plasma protein with chlorinated oxidants [19]. Previous studies have identified AOPP as a novel biomarker of oxidative damage to proteins and a novel mediator of inflammation, notably involved not only in the activation of monocytes but also of polymorphonuclear neutrophil [20, 21]. The mechanisms that are involved in the proinflammatory effects of AOPP remain to be clarified. However, it is already known that the mechanism might be mainly through the activation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase [8, 9].

AOPP can be formed *in vitro* by the exposure of proteins such as human serum albumin (HSA) to various oxidants, among which hypochlorous acid (HOCl) is the most powerful compound, originating albumin-advanced oxidation protein products (HSA-AOPP) [21]. Thus, HOCl may represent one of the pathways for AOPP production in plasma proteins exposed to activated phagocytes. Regarding the AOPP generation mechanism, *in vitro* studies pointed out that HOCl-treated HSA was also capable of triggering an oxidative burst [18]. Nevertheless, the counteraction of the oxidative stress and the inflammatory process has not been utilized as a therapeutic strategy in the treatment of conditions where increased levels of AOPP have been observed. One possible strategy is the use of new drugs such as fructose-1,6-bisphosphate (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 [22]. Furthermore, there is also evidence of FBP beneficial effects in cardiac, kidney, brain, liver and bowel (small intestine) dysfunctions [23, 24]. *N*-acetyl-

cysteine (NAC), an aminothiol and synthetic precursor of cysteine and glutathione, is another potential antioxidant drug which is worth testing [25]. Several studies have demonstrated the antioxidant effect of NAC in models *in vitro* [21] and *in vivo* [26].

The characterization of the specific oxidants responsible for the modification of biomolecules in disease processes has been challenging and AOPP has been established as an important mediator involved with the oxidative and inflammatory processes. In addition, antioxidant therapeutic strategies have not yet been extensively explored in pathologies in which the accumulation of AOPP is observed. One possible strategy is the use of new drugs that have therapeutic effects in several pathological conditions associated with the activation of the inflammatory process and the formation of ROS. Therefore, the purpose of the present study was to induce the *in vitro* formation of AOPP, a new class of inflammatory mediators, through HOCl-treated HSA and to investigate whether this generation could be counteracted by FBP and NAC.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Reagents

HSA was obtained from LFB Biomedicaments (Les Ulis, France). Potassium iodide (KI), acetic acid (C₂H₄O₂) and sodium hydroxide (NaOH) were purchased from Vetec Química (Rio de Janeiro, Brazil). The chloramine-T, *N*-acetylcysteine and fructose-1,6-bisphosphate were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Solutions of HOCl/OCl⁻ were prepared by diluting commercial sodium hypochlorite in 10 mM NaOH before use. In this study, the term hypochlorous acid (HOCl) refers to the sum of both species HOCl/OCl⁻. The hypochlorite concentration was determined spectrophotometrically at 292 nm ($E=350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) after dilution with 10 mM NaOH [27]. 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.

Preparation of HSA-AOPP and Determination of AOPP

HSA was exposed to HOCl to produce HSA-AOPP [7]. Briefly, HSA solution (30 mg/mL) was incubated for 30 min with various HOCl concentrations from 1 to

Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features

tein Products

4 mM at room temperature. The analyses were conducted in replicates ($n=5$). This concentration of HSA was used since it is close to the physiological albumin concentration. We used the same commercial preparation of HSA for all experiments (LFB Bio-medicaments, France, lot number 08 L13315) in order to minimize the influence of the glycation status on HOCl concentration and on AOPP generation. We verified in preliminary experiments that 30 min was an optimal time of incubation. A control HSA sample was incubated likewise without HOCl. The AOPP concentration was measured by a spectrophotometric assay, as described previously [18]. Briefly, 200 μ L of HSA-AOPP or HSA preparation in PBS was mixed with 20 μ L of acetic acid. AOPP concentrations were measured spectrophotometrically at 340 nm and calibrated versus standard reference containing 200 μ L of chloramine-T solutions (0 to 100 μ mol/L), 10 μ L of 1.16 mol/L potassium iodide and 20 μ L of acetic acid. The content of AOPP in the AOPP-HSA or HSA preparations was expressed in micromoles per liter.

Effect of FBP and NAC on AOPP Formation

The effect of FBP and NAC as well as the synergistic effect promoted by the combination of low doses of both drugs on the levels of HSA-AOPP induced by HOCl 4 mM were evaluated by a concentration-effect curve. Briefly, HSA was incubated for 30 min with FBP (5 up to 20 mg/mL) or NAC (0.25 up to 1 mg/mL), along with HOCl 4 mM, or PBS as control. To investigate the possibility of the synergistic effects between the tested drugs, we incubated HSA with FBP (5 mg/mL) associated with NAC (0.25 mg/mL) and compared with the same concentration of the compounds isolated.

Statistical Analysis

All experiments were performed in replicates ($n=5$). Values exhibited normal distribution on the basis of Kolmogorov-Smirnov test. All data, expressed as mean \pm SEM, were compared using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey post test for multiple comparisons. $P<0.05$ was considered statistically significant. Statistical analyses were conducted with GraphPad Prism version 4.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

RESULTS

To test the effects of HOCl on the AOPP formation, we first determined the optimal conditions for HSA oxidation assessed by AOPP levels. As shown in Fig. 1, the treatment of HSA with HOCl (1, 2 and 4 mM) induced a concentration-dependent increase in the AOPP levels compared with native HSA (PBS). Since the HOCl 4 mM appeared to be the most efficient oxidant concentration in inducing AOPP-HSA, we further studied the antioxidant potential of FBP and NAC. The incubation of HSA with FBP significantly reduced the formation of HOCl-induced AOPP ($P<0.001$, Fig. 2a). As shown in Fig. 2a, all tested concentrations of FBP were able to prevent the AOPP formation. At a FBP concentration of 20 mg/mL, a 64 % reduction of HSA-AOPP formation was observed. At a lower concentration (5 mg/mL), FBP still inhibited around 32 % of the formation of HOCl-induced AOPP. Similarly, the treatment with NAC also significantly reduced the HSA-AOPP formation when compared with the HOCl group without NAC ($P<0.001$, Fig. 2b). NAC 1 mg/mL inhibited approximately 85 % of HSA-AOPP formation. In an attempt to investigate the synergistic effect promoted by the association of FBP (5 mg/mL) and NAC (0.25 mg/mL), we incubated the HSA with the combination of drugs and compared with the groups treated with only FBP or NAC at the same concentrations (Fig. 2c). The group treated with FBP+NAC reduced approximately 70 % the formation of HSA-

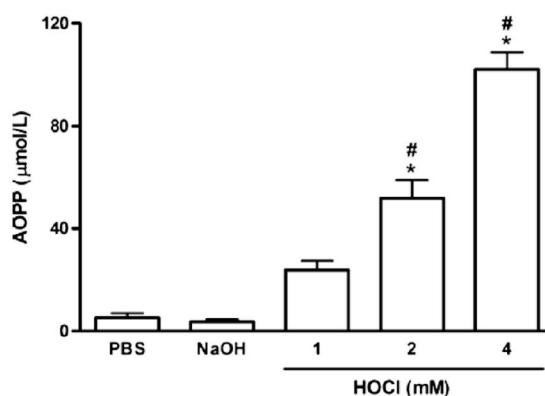


Fig. 1. Concentration-dependent effect of HOCl on HSA-AOPP formation. HSA solution (30 mg/mL) was incubated for 30 min with HOCl solution (1 to 4 mM) at room temperature ($n=5$). NaOH was used as control. Data are expressed as mean \pm SEM. * $P<0.001$ vs control (PBS). # $P<0.001$ vs NaOH group.

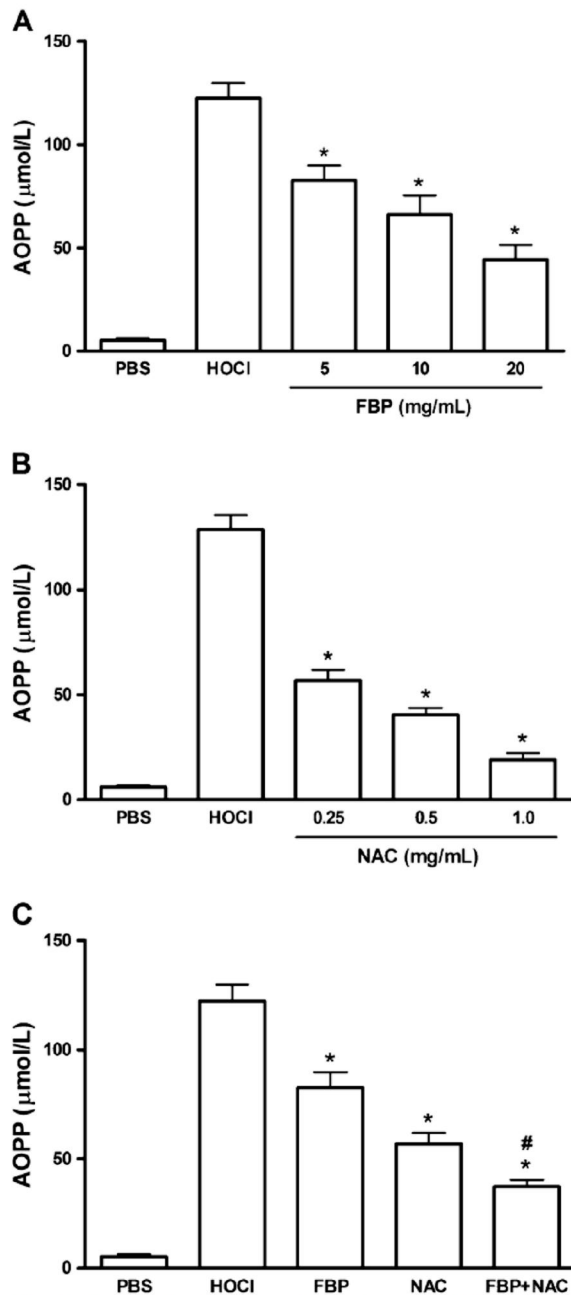


Fig. 2. Concentration-dependent effects of fructose-1,6-bisphosphate (FBP) and *N*-acetylcysteine (NAC) as well as the combination of FBP 5 mg/mL and NAC 0.25 mg/mL (FBP+NAC) on the formation of HSA-AOPP—induced HOCl 4 mM. HSA solution (30 mg/mL) was previously treated (30 min at room temperature) with HOCl 4 mM, along with FBP from 5 to 20 mg/mL (a), NAC from 0.25 to 1 mg/mL (b) and FBP 5 mg/mL +NAC 0.25 mg/mL (c). Data are expressed as mean±SEM. * $P < 0.01$ vs HOCl group. # $P < 0.05$ vs FBP and NAC groups.

AOPP compared with FBP 5 mg/mL (32 %) and NAC 0.25 mg/mL (53 %).

DISCUSSION

In the present study, we demonstrate that the incubation of HSA with HOCl was effective in the formation of AOPP-HSA in a concentration-dependent manner. This observation is in agreement with previous studies that showed AOPP can be formed *in vitro* by the exposure of HSA to HOCl [7]. In addition, we first described the potential of FBP and NAC in inhibiting the *in vitro* AOPP formation. To establish the optimum conditions of oxidation of HSA, we made the concentration curve of HOCl. Although there are studies showing that higher concentrations of HOCl (100–200 mM) were efficient in the formation of HSA-AOPP [9, 21], it has been observed that HSA-AOPP may be formed by lower concentrations of HOCl [19, 28]. In the current study, concentrations of HOCl ranged to 1–4 mM and the concentration of HSA was below those concentrations usually employed in preparation of AOPP-HSA [9, 21]. The intention to use these concentrations of HOCl and HSA was trying to reproduce a physiological situation since normal value for serum albumin range to 35–50 mg/mL.

HOCl, once formed, reacts readily with a wide variety of biological molecules, including proteins [29]. Interestingly, it has been shown that the HSA is the major target for HOCl oxidation [19] and AOPP may be formed from this reaction in a similar manner both *in vivo* and *in vitro*. It is known that the interaction of HOCl with tyrosine, tryptophan, lysine and methionine residues leads to several structural modifications and consequently the formation of chlorotyrosine, chloramines, aldehydes and methionine sulfoxide [30–32]. This report was supported by a previous study, when purified HSA was used as a model protein to investigate the modifications in plasma proteins by chlorinated oxidants, the HOCl treatment mediated attacks on lysine residues known to form chloramine [33]. Mera *et al.* showed that the incubation of glycated human serum albumin (glycated-HSA) with HOCl led to *N*^c-(carboxymethyl)lysine (CML) formation, increasing HOCl concentration and decreasing pH [34]. Due to the diversity of structural modifications, AOPP may be considered not as a single species but rather as a family of heterogeneous compounds [19]. Among these, both dityrosine and carbonyls were found to be present in HOCl-modified HSA preparation [21, 35, 36]. Furthermore, studies *in vivo* demonstrated that

the plasma levels of AOPP closely correlate with levels of dityrosine, a hallmark of oxidized proteins [18]. Furthermore, it is well documented that HSA is continuously exposed to oxidative stress, so that alterations of the conformation and function of HSA could occur, resulting in modification of its biological properties [37]. Then, we speculate that the treatment of HSA with HOCl may promote a decrease in the content of thiol groups, impairing the functional properties of HSA, specially its antioxidant activity [19, 38].

The increased recognition of AOPP as a class of potential proinflammatory mediators and the multiple ways by which they are formed in diverse disorders have highlighted the importance of determining pertinent therapeutic strategies aimed at reducing oxidative stress in several clinical conditions. In this context, the possibility of forming AOPP *in vitro*, by exposing the HSA to HOCl, has facilitated the investigation of the involvement of this marker in these disorders. Moreover, with such *in vitro* experiments, it is possible to investigate drugs which have the ability to inhibit AOPP formation. Among several potential antioxidant drugs, we showed that FBP at a concentration of 5 to 20 mg/mL significantly reduced the formation of HSA-AOPP obtained by the exposure of HSA to HOCl. This inhibitory effect of FBP on HSA-AOPP formation may be due to its anti-oxidative potential through reactive species scavenging [39]. This hypothesis agrees with published reports that FBP stood out as having a surprisingly high anti-oxidative capacity against hydroxylradical (OH[•]) production in the Fenton reaction. Moreover, it has been documented that FBP counteracts the Fenton system via both iron sequestration and radical scavenging [40]. Another possible mechanism by which FBP has the ability to inhibit the formation of AOPP *in vitro* is due to the protective potential of this molecule. Under physiological conditions, most of FBP is present in the form of an ion with negative charges [41]. Moreover, although HSA has a negative net charge, the albumin binds more anions than cations [42], allowing the connection between FBP and HSA. Thus, FBP may be binding to HSA and preventing the action of HOCl. Interestingly, a study with the intention to show the possibility of connection between HSA and chlorides ion demonstrated that chloride ions may be distributed on the HSA surface and, consequently, promote structural changes [42]. To the best of our knowledge, this is the first study showing the association between FBP and AOPP as well as the inhibitory effects of this drug on HSA-AOPP formation *in vitro* model.

The anti-oxidative and cytoprotective activity of FBP has been documented in several oxidative stress-related conditions such as septic shock [43, 44], convulsions [45], reperfusion injury [46], diabetic complications [47], hypothermia-induced injury [48] and UV-provoked skin damage [49]. Furthermore, processes such as apoptosis [50], excitotoxicity [51], neutrophil [52] and xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase free-radical production [53] have also been observed. In addition to scavenging the ROS, this pharmacological activity of FBP seems also to be related to the inhibition of the production of inflammatory molecules including prostaglandin E2 [54] and cytokines (e.g. tumour necrosis factor α , TNF- α [55] and cyclooxygenase-2 expression [54]).

The anti-oxidative activity also holds true for NAC. Our results showed that all concentrations tested of NAC were also able to prevent the formation of HSA-AOPP obtained by the exposure of HSA to HOCl. 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 [21]. More specifically, NAC is capable of directly scavenging ROS and HOCl [56]. 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 [57] and chronic renal failure [58]. 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 [7]. Another new finding of this study is that FBP and NAC may exert a synergistic effect on the inhibition of HSA-AOPP formation compared with the effects exerted by the drugs when tested alone. It seems that the synergistic action exerted by the combination of these drugs may be due to distinct mechanisms of action. Thus, we hypothesized that the FBP may play a protective role of HSA, while NAC may have greater ability to capture reactive species.

Considering that AOPP is a biomarker formed in several pathological conditions involving inflammation and oxidative stress and that the FBP can influence the AOPP formation *in vitro*, it is of great relevance to the development of new studies to establish whether the FBP is capable of inhibiting the formation of AOPP *in vivo* as well as to elucidate the possible mechanism by which this occurs. Furthermore, clinical trials should be

Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features

Bochi, Torbitz, Cargnin, Sangoi, Santos, Gomes, and Moresco

developed in order to verify whether this new indication of FBP is relevant and whether this drug can be useful in the treatment of some clinical conditions. We have also demonstrated that the combination of NAC and FBP is more effective in reducing the HSA-AOPP formation than the use of a drug alone. In conclusion, despite the limitations of the study, it is important to point out that FBP and NAC may be useful as a potential therapeutic strategy to mitigate and neutralize pro-inflammatory and pro-oxidants effects of AOPP in different clinical conditions. Additional studies are required to investigate the antioxidant activity of AOPP-HSA and the formation of CML in order to provide information about posttranslational modifications in the preparations.

ACKNOWLEDGMENTS

G. V. Bochi is recipient of CAPES master degree fellowship and M. B. Sangoi is recipient of CNPq master degree fellowship. R. N. Moresco is recipient of CNPq research fellowship (304349/2011-9).

REFERENCES

1. Hancock, J.T., R. Desikan, and S.J. Neill. 2001. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathway. *Biochemical Society Transactions* 29: 345–350.
2. Asaba, K., A. Tojo, M.L. Onozato, A. Goto, M.T. Quinn, T. Fujita, and C.S. Wilcox. 2005. Effects of NADPH oxidase inhibitor in diabetic nephropathy. *Kidney International* 67: 1890–1898.
3. Halliwell, B. 1992. Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of Neurochemistry* 59: 1609–1623.
4. Dalle-Donne, I., R. Rossi, R. Colombo, D. Giustarini, and A. Milzani. 2006. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry* 52: 601–623.
5. Miyata, T., and C.Y. de Zeeuw. 2010. Diabetic nephropathy: a disorder of oxygen metabolism? *Nature Reviews Nephrology* 6: 83–95.
6. Shacter, E. 2000. Protein oxidative damage. *Methods in Enzymology* 319: 428–436.
7. 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 International* 49: 1304–1313.
8. 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: 1829–1839.
9. 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.
10. Hanasand, M., R. Omdal, K.B. Norheim, L.G. Göransson, C. Brede, and G. Jonsson. 2012. Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. *Clinica Chimica Acta* 413: 901–906.

11. 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.
12. 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 & Medicine* 34: 1563–1574.
13. Tabak, O., R. Gelisgen, H. Erman, F. Erdenen, C. Muderrisoglu, H. Aral, and 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.
14. 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.
15. Atabek, M.E., M. Keskin, C. Yazici, M. Kendirci, N. Hatipoglu, E. Koklu, and S. Kurtoglu. 2006. Protein oxidation in obesity and insulin resistance. *European Journal of Pediatrics* 165: 753–756.
16. Gröne, H.J., E.F. Gröne, and E. Malle. 2002. Immunohistochemical detection of hypochlorite-modified proteins in glomeruli of human membranous glomerulonephritis. *Laboratory Investigation* 82: 5–14.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. Descamps-Latscha, B., and V. Witko-Sarsat. 2001. Importance of oxidatively modified proteins in chronic renal failure. *Kidney International. Supplement* 78: 108–113.
21. 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.
22. Fahlman, C.S., P.E. Bickler, B. Sullivan, and G.A. Gregory. 2002. Activation of the neuroprotective ERK signaling pathway by fructose-1,6-bisphosphate during hypoxia involves intracellular Ca²⁺ and phospholipase C. *Brain Research* 958: 43–51.
23. De Oliveira, J.R., J.L. Rosa, S. Ambrosio, and R. Bartrons. 1992. Effect of galactosamine on hepatic carbohydrate metabolism: protective role of fructose 1,6-bisphosphate. *Hepatology* 15: 1147–1153.
24. Nunes, F.B., C.M. Graziottin, J.C. Alves Filho, A. Lunardelli, M.G. Pires, P.H. Wächter, and J.R. De Oliveira. 2003. An assessment of fructose-1,6-bisphosphate as an antimicrobial and anti-inflammatory agent in sepsis. *Pharmacological Research* 47: 35–41.
25. Cotgreave, I.A. 1997. N-acetylcysteine: pharmacological considerations and experimental and clinical applications. *Advances in Pharmacology* 38: 205–227.
26. Nascimento, M.M., M.E. Suliman, M. Silva, T. Chinaglia, J. Marchioro, S.Y. Hayashi, M.C. Riella, B. Lindholm, and B. Anderstam. 2010. Effect of oral N-acetylcysteine treatment on plasma inflammatory and oxidative stress markers in peritoneal dialysis patients: a placebo-controlled study. *Peritoneal Dialysis International* 30: 336–342.
27. Morris, J.C. 1966. The acid ionization constant of HOCl from 5 to 35. *The Journal of Physical Chemistry* 70: 3798–3805.

Fructose-1,6-Bisphosphate and Advanced Oxidation Protein Products

28. Iwao, Y., M. Anraku, M. Hiraike, K. Kawai, K. Nakajou, T. Kai, A. Suenaga, and M. Otogiri. 2006. The structural and pharmacokinetic properties of oxidized human serum albumin, advanced oxidation protein products (AOPP). *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 21: 140–146.
29. Hawkins, C.L., D.I. Pattison, and M.J. Davies. 2003. Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. *Amino Acids* 25: 259–274.
30. Hazell, L.J., J.J. van den Berg, and R. Stocker. 1994. Oxidation of low-density lipoprotein by hypochlorite causes aggregation that is mediated by modification of lysine residues rather than lipid oxidation. *The Biochemical Journal* 302: 297–304.
31. Kettle, A.J. 1996. Neutrophils convert tyrosyl residues in albumin to chlorotyrosine. *FEBS Letters* 379: 103–106.
32. Yang, C.Y., Z.W. Gu, H.X. Yang, M. Yang, A.M. Gotto, and C.V. Smith. 1997. Oxidative modifications of apoB-100 by exposure of low density lipoproteins to HOCl *in vitro*. *Free Radical Biology & Medicine* 23: 82–89.
33. Thomas, E.L., M.B. Grisham, and M.M. Jefferson. 1986. Preparation and characterization of chloramines. *Methods in Enzymology* 132: 569–585.
34. Mera, K., R. Nagai, N. Haraguchi, Y. Fujiwara, T. Araki, N. Sakata, and M. Otogiri. 2007. Hypochlorous acid generates *N* epsilon-(carboxymethyl)lysine from Amadori products. *Free Radical Research* 41: 713–718.
35. Fu, S., H. Wang, M. Davies, and R. Dean. 2000. Reactions of hypochlorous acid with tyrosine and peptidyl-tyrosyl residues give dichlorinated and aldehydic products in addition to 3-chlorotyrosine. *The Journal of Biological Chemistry* 75: 10851–10858.
36. Himmelfarb, J., E. McMonagle, and E. McMenamin. 2000. Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. *Kidney International* 58: 2571–2578.
37. Mera, K., M. Anraku, K. Kitamura, K. Nakajou, T. Maruyama, and M. Otogiri. 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.
38. Peskin, A.V., and C.C. Winterbourn. 2001. Kinetics of the reactions of hypochlorous acid and amino acid chloramines with thiols, methionine and ascorbate. *Free Radical Biology & Medicine* 30: 572–579.
39. 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.
40. 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.
41. McGilvery, R.W. 1953. Cyclohexylammonium fructose-1, 6-diphosphates. *The Journal of Biological Chemistry* 200: 835–838.
42. Song, Y., and M.R. Gunner. 2009. Using multiconformation continuum electrostatics to compare chloride binding motifs in alpha-amylase, human serum albumin and Omp32. *Journal of Molecular Biology* 387: 840–856.
43. 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*. doi:10.1007/s10753-012-9436-7.
44. 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: 539–50.
45. Lian, X.Y., F.A. Khan, and J.L. Stringer. 2007. Fructose-1,6-bisphosphate has anticonvulsant activity in models of acute seizures in adult rats. *The Journal of Neuroscience* 27: 12007–12011.
46. Moresco, R.N., R.C. Santos, J.C. Alves Filho, A.A. Cunha, C. Dos Reis, C.L. Reichel, and J.R. De Oliveira. 2004. Protective effect of fructose-1,6-bisphosphate in the cold storage solution for liver preservation in rat hepatic transplantation. *Transplantation Proceedings* 36: 1261–1264.
47. Xu, M., D.Z. Dai, Q. Zhang, Y.S. Cheng, and Y. Dai. 2010. Upregulated NADPH oxidase contributes to diabetic testicular complication and is relieved by strontium fructose 1,6-diphosphate. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 118: 459–465.
48. Gámez, A., N. Alva, T. Roig, J. Bermúdez, and T. Carbonell. 2008. Beneficial effects of fructose 1,6-biphosphate on hypothermia-induced reactive oxygen species injury in rats. *European Journal of Pharmacology* 590: 115–119.
49. Ahn, S.M., J.S. Hwang, and S.H. Lee. 2007. Fructose 1,6-diphosphate alleviates UV-induced oxidative skin damage in hairless mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 30: 692–697.
50. Calafell, R., J. Boada, A.F. Santidrian, J. Gil, T. Roig, J.C. Perales, and J. Bermudez. 2009. Fructose 1,6-bisphosphate reduced TNF-alpha-induced apoptosis in galactosamine sensitized rat hepatocytes through activation of nitric oxide and cGMP production. *European Journal of Pharmacology* 610: 128–133.
51. Rogido, M., I. Husson, C. Bonnier, M.C. Lallemand, C. Mérierne, G.A. Gregory, A. Sola, and P. Gressens. 2003. Fructose-1,6-biphosphate prevents excitotoxic neuronal cell death in the neonatal mouse brain. *Brain Research* 140: 287–297.
52. Lazzarino, G., B. Tavazzi, D. Di Pierro, and B. Giardina. 1992. Ischemia and reperfusion: effect of fructose-1,6-bisphosphate. *Free Radical Research Communications* 16: 325–339.
53. Akimitsu, T., J.A. White, D.L. Carden, D.C. Gute, and R.J. Korthuis. 1995. Fructose-1,6-diphosphate or adenosine attenuate leukocyte adherence in postschemic skeletal muscle. *The American Journal of Physiology* 269: 1743–1751.
54. Ahn, S.M., H.Y. Yoon, B.G. Lee, K.C. Park, J.H. Chung, C.H. Moon, and S.H. Lee. 2002. Fructose-1,6-diphosphate attenuates prostaglandin E2 production and cyclo-oxygenase-2 expression in UVB-irradiated HaCaT keratinocytes. *British Journal of Pharmacology* 137: 497–503.
55. Lopes, R.P., A. Lunardelli, T. Preissler, C.E. Leite, J.C. Alves-Filho, F.B. Nunes, J.R. de Oliveira, and M.E. Bauer. 2006. The effects of fructose-1,6-bisphosphate and dexamethasone on acute inflammation and T-cell proliferation. *Inflammation Research* 55: 354–358.
56. 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.
57. Fishbane, S. 2008. *N*-acetylcysteine in the prevention of contrast-induced nephropathy. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 3: 281–287.
58. 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.

4. DISCUSSÃO

No presente estudo foi demonstrado que a incubação de albumina purificada humana em um meio contendo HOCl foi eficaz para a formação de albumina-AOPP de maneira concentração-dependente. Além disso, foi descrito pela primeira vez o potencial de FBP e NAC em inibir a formação de AOPP neste modelo *in vitro*. Primeiramente, a fim de estabelecer as condições ótimas de oxidação da albumina, foi realizado uma curva de concentração de HOCl. Neste contexto, também foram avaliadas diferentes temperaturas e tempos de incubação para estabelecer um modelo de oxidação da albumina induzida por HOCl. Considerando que a albumina é o principal alvo da oxidação promovida por HOCl e que AOPP é resultado desta reação promovida por HOCl, é de grande relevância a implantação de modelos *in vitro* que permitam a avaliação de compostos que tenham a capacidade de prevenir ou inibir a formação de AOPP. Esta importância é devido ao envolvimento dos AOPP no desenvolvimento do processo inflamatório, bem como na propagação do estresse oxidativo em várias desordens clínicas, podendo servir como mediadores inflamatórios empregados na fisiopatogênese destas patologias. Neste sentido, foi demonstrado que tanto NAC quanto FBP foram capazes de inibir a formação de AOPP induzida por HOCl. A FBP nas concentrações de 5 a 20 mg/mL reduziu significativamente a formação de albumina-AOPP obtida pela exposição da albumina ao HOCl. Este efeito inibidor de FBP em prevenir a formação de AOPP pode ser devido ao seu potencial anti-oxidante (BAJI et al., 2011), que pode ter contribuído para a proteção da molécula de albumina ou ainda ter contribuído de forma a impedir ou diminuir a ação do HOCl. Esta ação anti-oxidante também é válida para a NAC. Foi demonstrado que todas as concentrações testadas de NAC também foram capazes de inibir a formação de albumina-AOPP. De maneira interessante, foi demonstrado que a NAC, em concentrações semelhantes às utilizadas neste estudo (0,5 a 1,0 mg/mL), inibiu a atividade da NADPH oxidase e da MPO induzida por AOPP (WITKO-SARSAT et al., 2003). Além disso, foi demonstrado que FBP e NAC podem exercer um efeito sinérgico na inibição da formação de albumina-AOPP. Portanto, é de grande importância o desenvolvimento de novos estudos para estabelecer se a FBP e NAC mantem a capacidade de inibir a formação de AOPP *in vivo*, bem como elucidar os mecanismos pelos quais estes compostos promovem esses efeitos benéficos.

5. CONCLUSÃO

É O HOCl, quando incubado com a albumina, foi capaz de promover a formação de AOPP *in vitro*;

É A NAC e a FBP foram capazes de inibir a formação de AOPP *in vitro* de maneira concentração-dependente;

É A associação NAC + FBP apresentou efeito sinérgico sobre a inibição da formação de AOPP *in vitro*.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Investigar vias alternativas de formação AOPP através de modelos de formação deste marcador *in vitro*;
- Avaliar o efeito de NAC, FBP e outros compostos que apresentam potencial antioxidante em prevenir a formação de AOPP *in vitro*;
- Investigar o mecanismo de ação de albumina-AOPP formado por estas vias alternativas e comparar com o efeito promovido por albumina-AOPP formado através do HOCl. Neste sentido, é de grande importância avaliar a expressão de proteínas que possam estar envolvidas nos efeitos deletérios promovidos por AOPP em células;
- Avaliar o potencial de NAC, FBP e outros compostos sobre a expressão de proteínas envolvidas na cascata de sinalização promovidas pelos AOPP;
- Investigar o efeito de albumina-AOPP (induzida por HOCl e por vias alternativas) sobre a atividade de algumas enzimas envolvidas no processo inflamatório e estresse oxidativo.

NCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-SOUD, H.M.; HAZEN, S.L. Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 5425-5430, 2000.

AHN, S.M.; YOON, H.Y.; LEE, B.G.; PARK, K.C.; CHUNG, J.H.; MOON, C.H.; LEE, S.H. Fructose-1,6-diphosphate attenuates prostaglandin E2 production and cyclo-oxygenase-2 expression in UVB-irradiated HaCaT keratinocytes. **Br J Pharmacol**, v. 137, p. 497-503, 2002.

AKIMITSU, T.; WHITE, J.A.; CARDEN, D.L., GUTE, D.C.; KORTHUIS, R.J. Fructose-1,6-diphosphate or adenosine attenuate leukocyte adherence in postischemic skeletal muscle. **Am J Physiol**, v. 269, p. 1743-1751, 1995.

ALBRICH, J.M.; MCCARTHY, C.A.; HURST, J.K. Biological reactivity of hypochlorous acid: implications for microbicidal mechanisms of leukocyte myeloperoxidase. **Proc Natl Acad Sci**, v. 78, p. 210-214, 1981.

ARTEEL, G. E.; SIES, H. B. The biochemistry of selenium and the glutathione system. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 10, p. 153-158, 2001.

ARUOMA, O.I.; HALLIWELL, B. Action of hypochlorous acid on the antioxidant protective enzymes superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase. **Biochem J**, v. 248, p. 973-976, 1987.

ATABEK, M. E.; KESKIN, M.; YAZICI, C.; KENDIRCI, M.; HATIPOGLU, N.; KOKLU, E.; KURTOGLU, S. Protein oxidation in obesity and insulin resistance. **Eur J Pediatr**, v.165, p.753-756, 2006.

ATKURI, K. R.; MANTOVANI, J. J.; HERZENBERG, L. A.; N-Acetylcysteine ó a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. **Curr Opin Pharmacol**, v. 7, p. 355-359, 2007.

BABIOR, B.M.; PETERS, W.A. The O₂⁻ producing enzyme of human neutrophils. Further properties. **J Biol Chem**, v. 256, p. 2321-2323, 1981.

BABIOR, B.M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, v. 93, p. 1464-1476, 1999.

BALDUS, S.; HEESCHEN, C.; MEINERTZ, T.; ZEIHNER, A.M.; EISERICH, J.P.; MÜNDEL, T.; SIMOONS, M.L.; HAMM, C.W.; CAPTURE Investigators. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. **Circulation**, v. 108, p. 1440-1445, 2003.

BAJI A, ZAKRZEWSKA J, GODJEVAC D, ANDJUS P, JONES DR, SPASI M, SPASOJEVI I. Relevance of the ability of fructose 1,6-bis(phosphate) to sequester ferrous but not ferric ions. **Carbohydr Res**, v. 346, p. 416-420, 2011.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

BARSOGLI, A.; FABBRI, F.; FEDELE, M.; GARIBALDI, S.; BALBI, M.; BEZANTE, G.P.; RISSO, D.; INDIVERI, F.; GHIGLIOTTI, G.; BRUNELLI, C. Role of advanced oxidation protein products and Thiol ratio in patients with acute coronary syndromes. **Clin Biochem**, v. 44, p. 605-611, 2011.

BENRAHMOUNE, M.; THÉRON, P.; ABEDINZADEH, Z. The reaction of superoxide radical with N-acetylcysteine. **FREE Radic Biol Med**, v. 29, p. 775-782, 2000.

BRASEN, J. H.; HAKKINEN, T.; MALLE, E.; BEISIEGEL, U.; YLA-HERTTUALA, S. Patterns of oxidized epitopes, but not NF-kappa B expression, change during atherogenesis in WHHL rabbits. **Atherosclerosis**, v. 166, p. 13-21, 2003.

BUCCIARELLI, L.G.; ANANTHAKRISHNAN, R.; HWANG, Y.C.; KANEKO, M.; SONG, F.; SELL, D.R.; STRAUCH, C.; MONNIER, V.M.; YAN, S.F.; SCHMIDT, A.M.; RAMASAMY, R. RAGE and modulation of ischemic injury in the diabetic myocardium. **Diabetes**, v. 57, p. 1941-1951, 2008.

BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R.; BRUNS, D.E. **Tietz Fundamentos de Química Clínica**, 6ª edição, Rio de Janeiro, ed: Elsevier, 2008.

CADENAS, E.; DAVIES, K.J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Rad Biol Med**, v. 29, p. 222-230, 2000.

CAKATAY, U. Protein oxidation parameters in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control. **Diabetes Metab**, v. 31, p. 551-557, 2005.

CALAFELL, R.; BOADA, J.; SANTIDRIAN, A.F.; GIL, J.; ROIG, T.; PERALES, J.C., BERMUDEZ, J. Fructose 1,6-bisphosphate reduced TNF-alpha-induced apoptosis in galactosamine sensitized rat hepatocytes through activation of nitric oxide and cGMP production. **Eur J Pharmacol**, v. 610, p. 128-133, 2009.

CAO, W.; XU, J.; ZHOU, Z.M.; WANG, G.B.; HOU, F.F.; NIE, J. Advanced Oxidation Protein Products Activate Intrarenal Renin-Angiotensin System via a CD36-Mediated, Redox-Dependent Pathway. **Antioxid Redox Signal**, 2012.

CAPPEILLERRE-BLANDIN, C.; GAUSSON, V.; DESCAMPS-LATSCHA, B.; WITKO-SARSAT, V. Biochemical and spectrophotometric significance of advanced oxidized protein products. **Biocim Biophys Acta**, v. 1689, p. 91-102, 2004.

CAPPEILLERRE-BLANDIN, C.; GAUSSON, V.; NGUYEN, A. T.; DESCAMPS-LATSCHA, B.; DRUEKE, T.; WITKO-SARSAT, V. Respective role of uremic toxins and myeloperoxidase in the uremic state. **Nephrol Dial Transplant**, v. 21, p. 1555-1563, 2006.

CHANG, J.S.; WENDT, T.; QU, W.; KONG, L.; ZOU, Y.S.; SCHMIDT, A.M.; YAN, S.F.; Oxygen deprivation triggers upregulation of early growth response-1 by the receptor for advanced glycation end products. **Circ Res**, v. 102, p. 905-913, 2008.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

CHOI, S.B.; YOON, H.J.; LEE, D.K.; KIM, I.H.; SUK, K.; CHOI, D.K.; PARK, E.J. Dual functionality of myeloperoxidase in rotenone-exposed brain-resident immune cells. **Am J Pathol**, v.179, p.964-979, 2011.

CONNER, E. M.; GRISHAM, M. B. Inflammation, Free Radicals, and Antioxidants. **Nutrition**, v. 12, p. 274-277, 1996.

DALLE-DONE, I.; ALDINI, G.; CARINI, M.; COLOMBO, R.; ROSSI, R.; MILZANI, A. Proteincarbonylation, cellular dysfunction and disease progression. **J Cell Mol Med**, v. 10, p. 389-406, 2006.

DE MELLO, R.O.; LUNARDELLI, A.; CABERLON, E.; DE MORAES, C.M.; CHRIST VIANNA SANTOS, R.; DA COSTA, V.L.; DA SILVA, G.V.; DA SILVA SCHERER, P.; BUAES, L.E.; DA SILVA MELO, D.A.; DONADIO, M.V.; NUNES, F.B.; DE OLIVEIRA, J.R. Effect of N-acetylcysteine and fructose-1,6-bisphosphate in the treatment of experimental sepsis. **Inflammation**, v. 34, p. 539-550, 2011.

DEJANA, E.; CORADA, M.; LAMPUGNANI, M. G. Endothelial cell-to-cell junctions. **FASEB Journal**, v. 9, p. 910-918, 1995.

DESCAMPS-LATSCHA, B.; WITKO-SARSAT, V.; NGUYEN-KHOA, T.; NGUYEN, A.T.; GAUSSON, V.; MOTHU, N.; LONDON, G.M.; JUNGERS, P. Advanced oxidation protein products as risk factors for atherosclerotic cardiovascular events in nondiabetic predialysis patients. **Am J Kidney Dis**, v. 45, p. 39-47, 2005.

DONOHUE, P.H.; FAHLMAN, C.S.; BICKLER, P.E.; VEXLER, Z.S.; GREGORY, G.A. Neuroprotection and intracellular Ca^{2+} modulation with fructose-1,6-bisphosphate during in vitro hypoxia-ischemia involves phospholipase C-dependent signaling. **Brain Res**, v. 917, p. 158-166, 2001.

DRÜEKE, T.; WITKO-SARSAT, V.; MASSY, Z.; DESCAMPS-LATSCHA, B.; GUERIN, A.P.; MARCHAIS, S.J.; GAUSSON, V.; LONDON, G.M. Iron therapy, advanced oxidation protein products, and carotid artery intima-media thickness in end-stage renal disease. **Circulation**, v. 106, p. 2212-2217, 2002.

EISERICH, J.P.; BALDUS, S.; BRENNAN, M.L.; MA, W.; ZHANG, C.; TOUSSON, A.; CASTRO, L.; LUSIS, A.J.; NAUSEEF, W.M.; WHITE, C.R.; FREEMAN, B.A. Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular no oxidase, **Science**, v. 296, p. 2391-2394, 2002.

FARUQI, R.M.; POPTIC, E.J.; FARUQI, T.R.; DE LA MOTTE, C.; DICORLETO, P.E. Distinct mechanisms for N-acetylcysteine inhibition of cytokine-induced E-selectin and VCAM-1 expression. **Am J Physiol**, v. 273, p. 817-826, 1997.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997.

GAUT, J.P.; YEH, G.C.; TRAN, H.D.; BYUN, J.; HENDERSON, J.P.; RICHTER, G.M.; BRENNAN, M.L.; LUSIS, A.J.; BELAAOUAJ, A.; HOTCHKISS, R.S.; HEINECKE, J.W.

idase system to generate antimicrobial brominating and chlorinating oxidants during sepsis. **Proc Natl Acad Sci**, v. 98, p. 11961-11966, 2001.

GÁMEZ, A.; ALVA, N.; ROIG, T.; BERMÚDEZ, J.; CARBONELL, T. Beneficial effects of fructose 1,6-biphosphate on hypothermia-induced reactive oxygen species injury in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 590, p. 115-119, 2008.

GEISZT, M.; LETO, T. L. The Nox family of NADPH oxidases: host defense and beyond. **J Biol Chem**, v. 279, p. 51715-51718, 2004.

GRONE, H. J.; GRONE, E. F.; MALLE, E. Immunohistochemical detection of hypochlorite-modified proteins in glomeruli of human membranous glomerulonephritis. **Lab. Invest**, v. 82, p. 5-14, 2002.

GRUYS, E.; TOUSSAINT, M.J.; NIEWOLD, T.A.; KOOPMANS, S.J. Acute phase reaction and acute phase proteins. **Journal of Zhejiang University**, v. 6, p. 1045-1056, 2005.

GUO, Z.J.; NIU, H.X.; HOU, F.F.; ZHANG, L.; FU, N.; NAGAI, R.; LU, X.; CHEN, B.H.; SHAN, Y.X.; TIAN, J.W.; NAGARAJ, R.H.; XIE, D.; ZHANG, X. Advanced oxidation protein products activate vascular endothelial cells via a RAGE-mediated signaling pathway. **Antioxid Redox Signal**, v. 10, p. 1699-1712, 2008.

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, p. 982-1014, 2005.

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxidative stress: adaptation, damage, repair and death. **Free Radicals in Biology & Medicine**. 3 ed. Oxford:Oxford University Press, 1999. cap.4, p. 246-350.

HAYATSU, H.; PAN, S.; UKITA, T. Reaction of sodium hypochlorite with nucleic acids and their constituents. **Chem Pharm Bull**, v. 19, p. 2189-2192, 1971.

HAWKINS, C.L.; DAVIES, M.J. Hypochlorite-induced damage to nucleosides: formation of chloramines and nitrogen-centered radicals. **Chem Res Toxicol**, v. 14, 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, p. 259-274, 2003.

HEINECKE, J. W. Mechanisms of oxidative damage by myeloperoxidase in atherosclerosis and other inflammatory disorders. **J Lab Clin Med**, v. 133, p. 321-325, 1999.

HENLE, T.; DEPPISCH, R.; BECK, W.; HERGESELL, O.; HANSCH, G.M.; RITZ, E. Advanced glycate 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.

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

IWAO, Y.; NAKAJOU, K.; NAGAI, R.; KITAMURA, K.; ANRAKU, M.; MARUYAMA, T.; OTAGIRI, M. CD36 is one of important receptors promoting renal tubular injury by advanced oxidation protein products. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 295, p. 1871-1880, 2008.

JUNIOR, J.E.R. Doença Renal Crônica: Definição, Epidemiologia e Classificação. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 26, p.1-3, 2004.

KANEDA, H.; TAGUCHI, J.; OGASAWARA, K.; AIZAWA, T.; OHNO, M. Increased level of advanced oxidation protein products in patients with coronary artery disease. **Atherosclerosis**. v. 162, p. 221-225, 2002.

KARIN, M.; LAWRENCE, T.; NIZET, V. Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. **Cell**, v. 124, p. 823-835, 2006.

KAY, T.D.; PLAYFORD, H.R.; JOHNSON, D.W. Hemodialysis versus continuous veno-venous hemodiafiltration in the management of severe valproate overdose. **Clin Nephrol**, v. 59, p. 56-58, 2003.

KUNSCH, C.; MEDFORD, R.M. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. **Circ Res**, v. 85, p. 753-766, 1999.

LAWRENCE, T.; GILROY, D.W. Chronic inflammation: a failure of resolution? **International Journal of Experimental Pathology**, v. 88, p. 85-94, 2007.

LAZZARINO, G.; TAVAZZI, B.; DI PIERRO, D.; GIARDINA, B. Ischemia and reperfusion: effect of fructose-1,6-bisphosphate. **Free Radic Res Commun**, v. 16, p. 325-339, 1992.

LENTINI, P.; DE CAL, M.; CRUZ, D.; CHRONOPOULOS, A.; SONI, S.; NALESSO, F.; ZANELLA, M.; GARZOTTO, F.; BRENDOLAN, A.; PICCINNI, P.; RONCO, C. The role of advanced oxidation protein products in intensive care unit patients with acute kidney injury. **J Crit Care**, v. 25, p. 605-609, 2010.

LI, H.Y.; HOU, F. F.; ZHANG, X.; CHEN, P. Y.; LIU, S. X.; FENG, J. X.; LIU, Z. Q.; SHAN, Y. X.; WANG, G. B.; ZHOU, Z. M.; TIAN, J. W.; XIE, D. Advanced oxidation protein products accelerate renal fibrosis in a remnant kidney model. **J Am Soc Nephrol**, v. 18, p. 528-538, 2007.

LIANG, X.; CHEN, Y.; ZHUANG, J.; ZHANG, M.; XIONG, W.; GUO, H.; JIANG, F.; HU, P.; GUO, D.; SHI, W. Advanced oxidation protein products as prognostic biomarkers for recovery from acute kidney injury after coronary artery bypass grafting. **Biomarkers**, v. 17, p. 507-512, 2012.

LIBBY, P.; RIDKER, P.M.; MASERI, A. Inflammation and atherosclerosis. **Circulation**, v. 5, p. 1135-1143, 2002.

- NAGAI, R.; ZHANG, W.R.; LIU, Z. Q.; ZHOU, Z. M.; ZHOU, M.; XIE, D.; WANG, G. B.; ZHANG, X. Advanced oxidation protein products accelerate atherosclerosis through promoting oxidative stress and inflammation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 38, p. 1156-1162, 2006.
- LOCATELLI, F.; CANAUD, B.; ECKARDT, K.U.; STENVINKEL, P.; WANNER, C.; ZOCCALI, C. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 18, p. 1272-1280, 2003.
- LOPES, R.P.; LUNARDELLI, A.; PREISSLER, T.; LEITE, C.E.; ALVES-FILHO, J.C.; NUNES, F.B., DE OLIVEIRA, J.R.; BAUER, M.E. The effects of fructose-1,6-bisphosphate and dexamethasone on acute inflammation and T-cell proliferation. **Inflamm Res**, v. 55, p. 354-358, 2006.
- MALLE, E.; BUCH, T.; GRONE, H.J. Myeloperoxidase in kidney disease. **Kidney Int**, v. 64, p. 1956-1967, 2003.
- MARTINS, H.S. **Emergências Clínicas**, 4. ed. Editora Manole, 2009.
- MARUI, N.; OFFERMANN, M.K.; SWERLICK, R.; KUNSCH, C.; ROSEN, C.A.; AHMAD, M.; ALEXANDER, R.W.; MEDFORD, R.M. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. **J Clin Invest**, v. 92, p. 1866-1874, 1993.
- MIDWINTER, R.G.; CHEAH, F.C.; MOSKOVITZ, J.; VISSERS, M.C.; WINTERBOURN, C.C. IkappaB is a sensitive target for oxidation by cell-permeable chloramines: inhibition of NF-kappaB activity by glycine chloramine through methionine oxidation. **Biochem**, v. 396, p. 71-78, 2006.
- MIQUEL, J.; FERRÁNDIZ, M.L.; DE JUAN, E.; SEVILA, I.; MARTÍNEZ, M. N-acetylcysteine protects against age-related decline of oxidative phosphorylation in liver mitochondria. **Eur J Pharmacol**, v. 292, p. 333-335, 1995.
- MORESCO, R.N.; SANTOS, R.C.; ALVES FILHO, J.C.; DE OLIVEIRA, J.R. Effect of fructose-1,6-bisphosphate in the cold storage solution after 12 and 36 hours of rat liver preservation. **Transplant Proc**, v. 36, p. 2593-2595, 2004.
- NITESCU, N.; RICKSTEN, S.E.; MARCUSSEN, N.; HARALDSSON, B.; NILSSON, U.; BASU, S.; GURON, G. N-acetylcysteine attenuates kidney injury in rats subjected to renal ischaemia-reperfusion. **Nephrol Dial Transplant**, v. 21, p. 1240-1247, 2006.
- NUNES, F.B.; GRAZIOTTIN, C.M.; ALVES FILHO, J.C.; LUNARDELLI, A.; CABERLON, E.; PERES, A.; DE OLIVEIRA, J.R. Immunomodulatory effect of fructose-1,6-bisphosphate on T-lymphocytes. **Int Immunopharmacol**, v. 3, p. 267-272, 2003.
- NUSSBAUM, C.; KLINKE, A.; ADAM, M.; BALDUS, S.; SPERANDIO, M. Myeloperoxidase - a leukocyte-derived protagonist of inflammation and cardiovascular disease. **Antioxid Redox Signal**, 2012.

VI, S.I. Protein oxidation biomarkers in plasma of type 2 diabetic patients. **Clin Biochem**, v. 43, p. 508-511, 2010.

PATTISON, D.I.; HAWKINS, C.L.; DAVIES, M.J. Hypochlorous acid-mediated oxidation of lipid components and antioxidants present in low-density lipoproteins: absolute rate constants, product analysis, and computational modeling. **Chem Res Toxicol**, v. 16, p. 439-449, 2003.

PATTISON, D.I.; DAVIES, M.J. Evidence for rapid inter- and intramolecular chlorine transfer reactions of histamine and carnosine chloramines: implications for the prevention of hypochlorous-acid-mediated damage. **Biochemistry**, v. 4, p. 8152-8162, 2006.

PEACOCK, W.F.; NAGURNEY, J.; BIRKHAHN, R.; SINGER, A.; SHAPIRO, N.; HOLLANDER, J.; GLYNN, T.; NOWAK, R.; SAFDAR, B.; MILLER, C.; PEBERDY, M.; COUNSELMAN, F.; CHANDRA, A.; KOSOWSKY, J.; NEUENSCHWANDER, J.; SCHROCK, J.; PLANTHOLT, S.; LEWANDROWSKI, E.; WONG, V.; KUPFER, K.; DIERCKS, D. Myeloperoxidase in the diagnosis of acute coronary syndromes: the importance of spectrum. **Am Heart J**, v. 162, p. 893-899, 2011.

PESKIN, A.V.; WINTERBOURN, C.C. Histamine chloramine reactivity with thiol compounds, ascorbate and methionine and with intracellular glutathione. **Free Radical Biol Med**, v. 35, p. 1252-1260, 2003.

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 Radical Biol Med**, v. 40, p. 4565-4573, 2006.

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.

PODREZ, E.A.; ABU-SOUD, H.M.; HAZEN, S.L. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. **Free Radic Biol Med**, v. 28, p. 1717-1725, 2000.

PRÜTZ, W.A. Interactions of hypochlorous acid with pyrimidine nucleotides, and secondary reactions of chlorinated pyrimidines with GSH, NADH, and other substrates. **Arch Biochem Biophys**, v. 349, p. 183-191, 1998.

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

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

ROGIDO, M.; HUSSON, I.; BONNIER, C.; LALLEMAND, M.C.; MÉRIENNE, C.; GREGORY, G.A.; SOLA, A.; GRESSENS, P. Fructose-1,6-biphosphate prevents excitotoxic neuronal cell death in the neonatal mouse brain. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 140, p. 287-297, 2003.

BARTRONS, R.; BERMÚDEZ, J. Fructose-1,6-biphosphate protects against D-galactosamine toxicity in isolated rat hepatocytes. **Am J Physiol**, v. 266, p. 1722-1728, 1994.

SANTAGELO, F. Intracellular thiol concentration modulating inflammatory response: influence in the regulation of cell functions trough cysteine produg approach. **Curr Med Chem**, v. 10, p. 2599-2610, 2003.

SANTOS, R.C.; MORESCO, R.N.; PEÑA RICO, M.A.; SUSPERREGUI, A.R., ROSA, J.L.; BARTRONS, R.; VENTURA, F.; MÁRIO, D.N.; ALVES, S.H.; TATSCH, E.; KOBER, H.; DE MELLO, R.O.; SCHERER, P.; DIAS, H.B.; DE OLIVEIRA, J.R. Fructose-1,6-Bisphosphate Reduces the Mortality in Candida albicans Bloodstream Infection and Prevents the Septic-Induced Platelet Decrease. **Inflammation**, v. 35, p. 1256-1261, 2012.

SARNAK, M.J.; LEVEY, A.S.; SCHOOLWERTH, A.C.; CORESH, J.; CULLETON, B.; HAMM, L.L.; MCCULLOUGH, P.A.; KASISKE, BL, KELEPOURIS E, KLAG MJ, PARFREY P, PFEFFER M, RAIJ L, SPINOSA DJ, WILSON PW; American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. **Circulation**, v. 108, p. 2154-2169, 2003.

SCHINETTI, B. F. ; LAZZARINO, G. Inhibition of phorbol ester-stimulated chemiluminescence and superoxide production in human neutrophils by fructose 1,6-diphosphate. **Biochem Pharmacol**, v. 35, p. 1762-1764, 1986.

SCHILLER, J.; FUCHS, B.; ARNHOLD, J.; ARNOLD, K. Contribution of reactive oxygen species to cartilage degradation in rheumatic diseases: molecular pathways, diagnosis and potential therapeutic strategies. **Curr Med Chem**, v. 10, p. 2123-2145, 2003.

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

SHI, X. Y. ; HOU, F. F. ; NIU, H. X. ; WANG, G. B. ; XIE, D. ; GUO, Z. J. ; ZHOU, Z. M. ; YANG, F. ; TIAN, J. W. ; ZHANG, X. Advanced oxidation protein products promote inflammation in diabetic kidney trough activation of renal nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. **Endocrinology**, v. 149, p. 1829-1839, 2008.

SKVARILOVÁ, M.; BULAVA, A.; STEJSKAL, D.; ADAMOVSKÁ, S.; BARTEK, J. 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, p. 83-87, 2005.

SOLA, A.; PANÉS, J.; XAUS, C.; HOTTER, G. Fructose-1,6-biphosphate and nucleoside pool modifications prevent neutrophil accumulation in the reperfused intestine. **J Leukoc Biol**, v. 73, p. 74-81, 2003.

SRISAWAT, N.; MURUGAN, R.; WEN, X.; SINGBARTL, K.; CLERMONT, G.; EIAM-ONG, S.; KELLUM, J.A. Recovery from acute kidney injury: determinants and predictors. **Contrib Nephrol**, v. 165, p. 284-291, 2010.

SUMMERS, F.A.; MORGAN, F.E.; DAVIES, M.J.; HAWKINS, C.L. Identification of plasma proteins that are susceptible to thiol oxidation by hypochlorous acid and N-chloramines. **Chem Res Toxicol**, v. 21, p. 1832-1840, 2008.

SUMMERS, F.A.; FORSMANQUIGLEY, A.; HAWKINS, C.L. Identification of proteins susceptible to thiol oxidation in endothelial cells exposed to hypochlorous acid and N-chloramines. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 425, p. 157-161, 2012.

THOMAS, E.L.; GRISHAM, M.B.; JEFFERSON, M.M. Preparation and characterization of chloramines. **Methods Enzymol**, v. 132, p. 569-585, 1986.

TOYODA, M.; NAJAFIAN, B.; KIM, Y.; CARAMORI, M.L.; MAUER, M. Podocyte detachment and reduced glomerular capillary endothelial fenestration in human type 1 diabetic nephropathy. **Diabetes**, v. 56, p. 2155-2160, 2007.

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interact**, v. 160, p. 1-40, 2006.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VAN DER VLIET, A.; NGUYEN, M.N.; SHIGENAGA, M.K.; EISERICH, J.P.; MARELICH, G.P.; CROSS, C. E. Myeloperoxidase and protein oxidation in cystic fibrosis. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 279, p. 5376546, 2000.

VEXLER, Z.S.; WONG, A.; FRANCISCO, C.; MANABAT, C.; CHRISTEN, S.; TÄUBER, M.; FERRIERO, D.M.; GREGORY, G. Fructose-1,6-bisphosphate preserves intracellular glutathione and protects cortical neurons against oxidative stress. **Brain Res**, v. 960, p. 90-98, 2003.

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.

VISSERS, M.C.; LEE, W.G.; HAMPTON, M.B. Regulation of apoptosis by vitamin C. Specific protection of the apoptotic machinery against exposure to chlorinated oxidants. **J Biol Chem**, v. 276, p. 46835-46840, 2001.

WAUTIER, M.P.; BOULANGER, E.; GUILLAUSSEAU, P.J.; MASSIN, P.; WAUTIER, J.L. AGEs, macrophage colony stimulating factor and vascular adhesion molecule blood levels are increased in patients with diabetic microangiopathy. **Thromb Haemost**, v. 91, p. 879-885, 2004.

WEI, X.F.; ZHOU, Q.G.; HOU, F.F.; LIU, B.Y.; LIANG, M. Advanced oxidation protein products induce mesangial cell perturbation through PKC-dependent activation of NADPH oxidase. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 296, p. 427-437, 2008.

WEISS, S. J. Tissue destruction by neutrophils. **N Engl J Med**, v. 320, p. 3656376, 1989.

WELTZMAN, S.A.; GORDON, L. I. Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. **Blood**, v. 76, p. 6556-663, 1990.

WINTERBOURN, C.C.; KETTLE, A.J. Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. **Free Radic Biol Med**, v. 29, p. 403-409, 2000.

WITKO-SARSAT, V.; FRIEDLANDER, M.; CAPEILLE`RE-BLANDIN, C.; NGUYEN-KHOA, T.; NGUYEN, A.T.; ZINGRAFF, J.; JUNGERS, P.; DESCAMPS-LATSCHA, B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. **Kidney Int**, v. 49, p. 1304-1313, 1996.

WITKO-SARSAT, C.; FRIEDLANDER, M.; NGUYEN-KHOA, T.; CAPPEILLÈRE-BLANDIN, C.; NGUYEN, A.T.; CANTELOUP, S.; DAYER J.M.; JUNGERS, P.; DRUEKE, T.; DESCAMPS-LATSCHA, B. 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.; GAUSSON, V.; NGUYEN, A.T.; TOUAM, M.; DRUEKE, T.; SANTANGELO, F.; DESCAMPS-LATSCHA, B. 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.

XU, M.; DAI, D.Z.; ZHANG, Q.; CHENG, Y.S.; DAI, Y. Upregulated NADPH oxidase contributes to diabetic testicular complication and is relieved by strontium fructose 1,6-diphosphate. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v. 118, p. 459-465, 2010.

ZAFARULLAH, M.; LI, W.Q.; SYLVESTER, J.; AHMAD, M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. **Cell Mol Life Sci**, v. 60, p. 6-20, 2003.

ZHOU, L. L.; HOU, F. F.; WANG, G. B.; YANG, F.; XIE, D.; WANG, Y. P.; TIAN, J. W. Accumulation of advanced oxidation protein products induces podocyte apoptosis and deletion through NADPH-dependent mechanisms. **Kidney Int**, v. 76, p. 1148-1160, 2009.



*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)