

OXIDAÇÃO DE PROTEÍNAS POR OXIGÊNIO SINGLETE: MECANISMOS DE DANO, ESTRATÉGIAS PARA DETECÇÃO E IMPLICAÇÕES BIOLÓGICAS

Graziella E. Ronsein, Sayuri Miyamoto, Etelvino Bechara e Paolo Di Mascio*

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 748, 05508-900 São Paulo - SP, Brasil

Glaucia R. Martinez

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, CP 19046, 81531-990, Curitiba - PR, Brasil

Recebido em 4/4/05; aceito em 26/7/05; publicado na web em 16/2/06

SINGLET OXYGEN-MEDIATED PROTEIN OXIDATION: DAMAGE MECHANISMS, DETECTION TECHNIQUES AND BIOLOGICAL IMPLICATIONS. Proteins are potential targets for singlet molecular oxygen ($^1\text{O}_2$) oxidation. Damages occur only at tryptophan, tyrosine, histidine, methionine, and cysteine residues at physiological pH, generating oxidized compounds such as hydroperoxides. Therefore, it is important to understand the mechanisms by which $^1\text{O}_2$, hydroperoxides and other oxidized products can trigger further damage. The improvement and development of new tools, such as clean sources of $^1\text{O}_2$ and isotopic labeling approaches in association with HPLC/mass spectrometry detection will allow one to elucidate mechanistic features involving $^1\text{O}_2$ -mediated protein oxidation.

Keywords: singlet oxygen; protein oxidation; protein peroxide.

INTRODUÇÃO

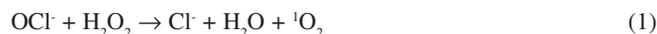
Oxigênio singlete

O oxigênio molecular, no estado fundamental, possui dois elétrons com spins paralelos ocupando dois orbitais π de mesma energia, chamados de degenerados, caracterizando, portanto, um estado triplete ($^3\Sigma_g^-$). Conseqüentemente, a redução direta do oxigênio por dois elétrons é proibida pela regra de conservação do spin. Uma forma mais reativa do oxigênio, conhecida como oxigênio singlete, pode ser gerada por um acréscimo de energia. Nela, a restrição da regra de conservação do spin é removida. Sendo assim, o oxigênio singlete é muito mais oxidante que o oxigênio molecular no seu estado fundamental. Existem dois estados singlete do oxigênio: o primeiro estado excitado, $^1\Delta_g$, tem dois elétrons com spins opostos no mesmo orbital, possui uma energia de 22,5 kcal acima do estado fundamental e tempo de meia vida em solvente aquoso de aproximadamente 10^{-6} s; o segundo estado excitado, $^1\Sigma_g^+$, tem um elétron em cada orbital π degenerado, com spins opostos, e possui uma energia de 37,5 kcal acima do estado fundamental. O estado $^1\Sigma_g^+$ tem um tempo de vida muito curto (10^{-11} s) em meio aquoso, sendo rapidamente desativado para o estado $^1\Delta_g$. Portanto, apenas o primeiro estado apresenta interesse em sistemas biológicos e será denotado por $^1\text{O}_2$ (Tabela 1)¹.

Por se tratar de uma espécie eletronicamente excitada, o $^1\text{O}_2$ decai para o estado fundamental emitindo luz. A investigação espectroscópica da luminescência vermelha que acompanha a decomposição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na presença de hipoclorito (OCl^-) (Equação 1), realizada por Khan e Kasha², revelou a existência de duas bandas de emissão centradas em 634 e 703 nm, atribuídas ao decaimento para o estado fundamental do $^1\text{O}_2$ gerado na reação.

Tabela 1. Distribuição eletrônica nos orbitais moleculares (π^*) do oxigênio no estado excitado singlete ($^1\Sigma_g^+$, $^1\Delta_g$) e no estado fundamental triplete ($^3\Sigma_g^-$)

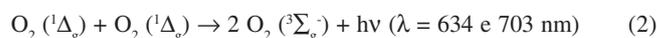
Estado	Orbitais π^*	Energia (kcal/mol)	Tempo de vida (s)
$^1\Sigma_g^+$	$\uparrow \downarrow$	37,5	10^{-11}
$^1\Delta_g$	$\uparrow\downarrow$	22,5	10^{-6}
$^3\Sigma_g^-$	$\uparrow \uparrow$		



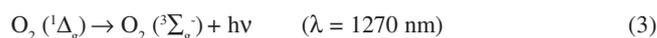
Atualmente, está bem estabelecido que essas bandas correspondem à transição simultânea de duas moléculas de $^1\text{O}_2$ ao estado fundamental triplete, também conhecida como emissão bimolecular (Equação 2). Esta emissão pode ser monitorada por meio de uma fotomultiplicadora sensível à região do vermelho do espectro visível, termoelectricamente resfriada, conectada a um sistema discriminador e amplificador³.

Além do decaimento bimolecular do $^1\text{O}_2$, também existe a transição monomolecular do $^1\text{O}_2$, que ocorre na região do infravermelho próximo (Equação 3). A luminescência desta transição pode ser detectada por um espectrômetro acoplado a um fotodetector cons-

Emissão bimolecular:



Emissão monomolecular:



*e-mail: pdmascio@iq.usp.br

tituído de um fotodiodo de germânio resfriado com nitrogênio líquido⁴. Recentemente, nosso laboratório desenvolveu um sistema de detecção composto por uma fotomultiplicadora sensível na região do infravermelho (800 a 1700 nm), que é refrigerada a -80 °C por meio de nitrogênio líquido. Este sistema está conectado a uma fonte de alta tensão e a um monocromador capaz de varrer as regiões do ultravioleta, visível e infravermelho. Para o infravermelho, utiliza-se uma grade capaz de varrer entre 800 e 2700 nm (Figura 1). A intensidade da emissão monomolecular é diretamente proporcional à concentração do $^1\text{O}_2$ e, portanto, fornece uma medida direta da quantidade produzida⁵.

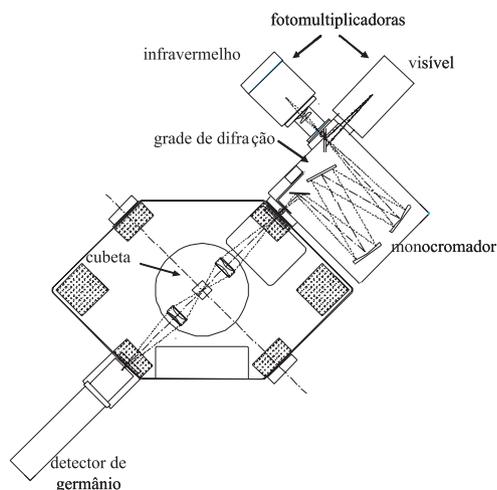


Figura 1. Equipamento de detecção utilizado para medidas de emissão de luz no infravermelho e no visível. O equipamento contém uma câmara para amostra e dois sistemas de detecção: o detector de germânio e duas fotomultiplicadoras acopladas a um monocromador

Fontes de $^1\text{O}_2$

Em laboratório, o $^1\text{O}_2$ é geralmente gerado por reações de fotossensibilização. Nestas reações, são utilizadas moléculas conhecidas como fotossensibilizadores (tais como azul de metileno e rosa bengala)¹. Quando estes fotossensibilizadores são irradiados com luz ultravioleta ou visível em determinados comprimentos de onda, absorvem energia e passam a um estado excitado singlete ($^1\text{S}^*$). Este estado $^1\text{S}^*$ pode decair para o estado fundamental singlete (^0S) com emissão de fluorescência, ou cruzar para um estado triplete excitado ($^3\text{S}^*$) por inversão espontânea do spin do elétron excitado. Uma vez formado o $^3\text{S}^*$, esta espécie pode participar em várias reações: pode decair ao estado ^0S com emissão de fosforescência, ou reagir por mecanismos fotoquímicos do tipo I ou II. Na reação do tipo I, o $^3\text{S}^*$ pode reagir com um substrato orgânico ou uma segunda molécula fotossensibilizadora, por transferência de elétrons ou hidrogênio. No tipo II, o fotossensibilizador $^3\text{S}^*$ pode transferir energia para o oxigênio molecular, gerando ^0S e $^1\text{O}_2$. Estes processos podem ocorrer simultaneamente e a importância de cada um depende da molécula alvo, da eficiência da transferência de energia do sensibilizador para o O_2 , do solvente e da concentração de O_2 ⁶⁻⁸ (Figura 2).

O $^1\text{O}_2$ pode ainda ser formado na termod decomposição de dioxetanos⁹ ou endoperóxidos de compostos policíclicos aromáticos^{10,11}, na reação de H_2O_2 com OCl^- ou peroxinitrito (ONOO^-)¹²⁻¹⁴ (Figura 3).

A geração de $^1\text{O}_2$ também tem sido evidenciada em meio biológico por reações que envolvem enzimas como as peroxidases, tais como lactoperoxidase¹⁵, mieloperoxidase^{16,17}, cloroperoxidase¹⁸

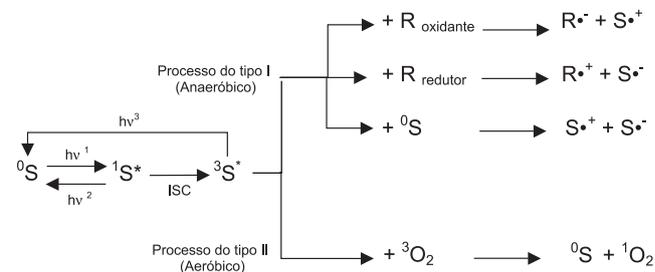


Figura 2. Representação esquemática dos mecanismos fotoquímicos do tipo I e do tipo II. Abreviaturas: $h\nu^1$: radiação incidente; $h\nu^2$: emissão de fluorescência; $h\nu^3$: emissão de fosforescência; ^0S : fotossensibilizador no estado fundamental; $^1\text{S}^*$: fotossensibilizador no estado singlete excitado; $^3\text{S}^*$: fotossensibilizador no estado triplete excitado; $\text{S}^{\bullet-}$: radical ânion do fotossensibilizador; $\text{S}^{\bullet+}$: radical cátion do fotossensibilizador; R : substrato orgânico; $\text{R}^{\bullet-}$: radical ânion do substrato orgânico; $\text{R}^{\bullet+}$: radical cátion do substrato orgânico; ISC: cruzamento intersistemas

$^1\text{O}_2$		
FONTES	REAÇÕES	ALVOS
Físicas	$\text{R}-\text{C}=\text{CH} \xrightarrow{^1\text{O}_2} \text{R}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}(\text{O})-\text{R}$ endoperóxido	Lipídios
Químicas	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{ClO}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{Cl}^- + ^1\text{O}_2$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{ONOO}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{NO}_2^- + ^1\text{O}_2$	DNA
Biológicas	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{ClO}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{Cl}^- + ^1\text{O}_2$ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{ONOO}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{NO}_2^- + ^1\text{O}_2$	Proteínas
enzimas	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{ClO}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{Cl}^- + ^1\text{O}_2$	
lipoperoxidação	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{ClO}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{Cl}^- + ^1\text{O}_2$	
fagocitose	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{ClO}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{Cl}^- + ^1\text{O}_2$	
O_3 + biomoléculas	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{ClO}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{Cl}^- + ^1\text{O}_2$	

Figura 3. Fontes, reações e alvos do $^1\text{O}_2$

e peroxidase de raiz forte¹⁹. Também foram relatadas evidências da geração de $^1\text{O}_2$ na fagocitose²⁰, na reação de ozônio (O_3) com biomoléculas²¹ e no processo de lipoperoxidação²²⁻²⁴ (Figura 3). A formação de $^1\text{O}_2$ na lipoperoxidação ocorre principalmente por meio do mecanismo discutido por Russell²², no qual radicais peróxila interagem entre si, gerando um tetraóxido intermediário que se decompõe gerando como produtos um álcool, uma cetona e $^1\text{O}_2$.

Alvos biológicos do $^1\text{O}_2$

O $^1\text{O}_2$ pode interagir com outras moléculas de duas maneiras: através de reações químicas ou transferindo sua energia de excitação para estas moléculas e retornando ao estado fundamental. O último processo é conhecido como supressão física do $^1\text{O}_2$ e pode ser realizado por carotenóides, bilirrubina, tocoferóis, fenóis e azida¹.

Algumas reações químicas do $^1\text{O}_2$ podem ser destacadas: adição a dienos conjugados (cicloadição do tipo Diels-Alder, 2 + 4) geralmente resultando na formação de endoperóxidos²⁵; adição 1,3 a uma dupla ligação, formando "ene" hidroperóxidos²⁶ e, com alcenos substituídos por grupos contendo átomos de nitrogênio ou enxofre, formando 1,2-dioxetanos²⁷ (Figura 3). O $^1\text{O}_2$ pode ainda reagir com compostos fenólicos para formar hidroperoxidienonas²⁸ e com sulfetos, formando sulfóxidos²⁹. Muitos estudos *in vitro* têm demonstrado que o $^1\text{O}_2$ oxida biomoléculas incluindo lipídios, pro-

teínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, carboidratos e tióis através dos mecanismos acima citados. Cabe ressaltar, entretanto, que as proteínas estão presentes em altas concentrações nos sistemas biológicos e as cadeias laterais de seus aminoácidos possuem constantes elevadas de desativação total do $^1\text{O}_2$ (constante total de desativação, k_t , $\sim 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)³⁰⁻³², quando comparadas a outras biomoléculas, tais como, lipídios (k_t , $\sim 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)³³ e bases do DNA (k_t , $\sim 10^4 - 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)³⁴ (Tabela 2). Desta forma, pode-se esperar que as proteínas sejam alvos importantes para o $^1\text{O}_2$ ³⁵.

Tabela 2. Constantes de desativação total (k_t) do $^1\text{O}_2$ com algumas biomoléculas.

Composto	k_t ($10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	Ref.
Triptofano	32 ^a	30
Histidina	46 ^b	30
Tirosina	2 - 5 ^a	30
Cisteína	50 ^a	30
Meionina	13 ^a	30
Ácido linoleico	0,073 ^b	33
Colesterol	0,057 ^b	33
Guanina	3,0 ^c	34
Citosina	0,058 ^c	34

^a em água deuterada:etanol (1:1); ^b em benzeno deuterado; ^c em 1,1,2-triclorotrifluoreto.

Aminoácidos e peptídeos como alvos para o $^1\text{O}_2$

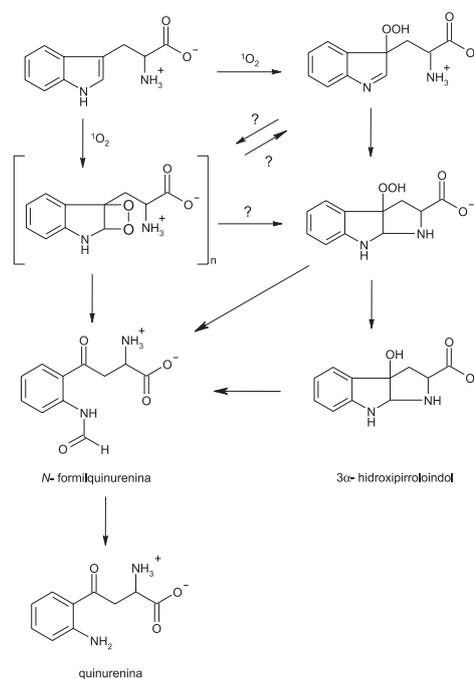
A maioria das interações do $^1\text{O}_2$ com aminoácidos, peptídeos e proteínas ocorre via rotas químicas e não através de supressão física, sendo que ambos os mecanismos concorrem significativamente somente no caso do triptofano³⁶. As constantes para a reação química do $^1\text{O}_2$ com as cadeias laterais dos aminoácidos livres variam dramaticamente, resultando em um dano seletivo a certos resíduos. Dos aminoácidos comuns, apenas triptofano, histidina, tirosina, metionina, cisteína e cistina reagem significativamente com $^1\text{O}_2$ em pH fisiológico^{31,32}.

Reação com resíduos de triptofano

A reação do $^1\text{O}_2$ com o triptofano produz um hidroperoxipirrolindol isolável, entretanto, o precursor deste composto ainda não foi identificado³⁷. Postula-se que ele seja um dióxetano formado com a dupla ligação dos carbonos $\text{C}_2 - \text{C}_3$ do anel indólico, ou ainda um hidroperóxido no carbono C_3 . A decomposição subsequente destes intermediários via quebra da ligação entre os carbonos $\text{C}_2 - \text{C}_3$ origina *N*-formilquinurenina, 3 α -hidroperoxipirrolindol e 3 α -hidroxipirrolindol. A decomposição do 3 α -hidroperoxipirrolindol e do 3 α -hidroxipirrolindol também gera *N*-formilquinurenina e quinurenina - têm sido detectados tanto em resíduos livres do aminoácido quanto em resíduos de triptofano de peptídeos e proteínas³⁵. Cabe ressaltar que a oxidação do triptofano em dipeptídeos leva preferencialmente à formação do hidroperoxipirrolindol e seu álcool correspondente e, em menores quantidades, quinurenina⁴¹.

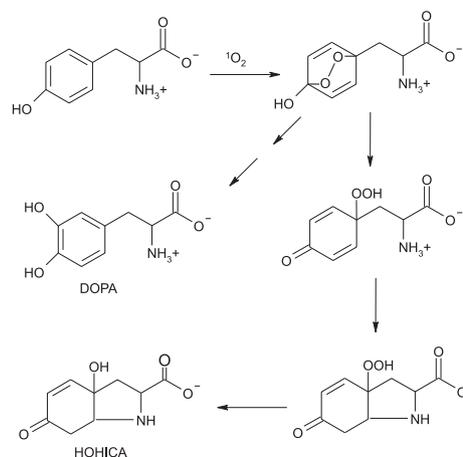
Reação com resíduos de tirosina

Com o aminoácido livre, demonstrou-se a formação de 3 α -hidroxi-6-oxo-2,3,3 α ,6,7,7 α -hexaidro-1H-indol-2-ácido carboxílico (HOHICA) na reação com o $^1\text{O}_2$. Acredita-se que este produto seja gerado via um intermediário endoperóxido instável, pela cicloadição [4 + 2] do $^1\text{O}_2$. A subsequente abertura do anel forma



Esquema 1. Proposta do mecanismo de reação do $^1\text{O}_2$ com resíduos de triptofano. Adaptado das refs. 37-39

um hidroperóxido no carbono C_1 , o qual via uma reação do tipo de Michael sofre ciclização, resultando em um peróxido cíclico. Tem sido proposto que a decomposição do endoperóxido também gera 3,4-diidroxifenilalanina (DOPA)⁴²⁻⁴⁴ (Esquema 2).



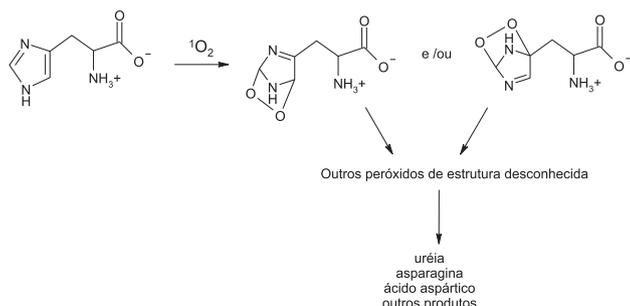
Esquema 2. Proposta do mecanismo de reação do $^1\text{O}_2$ com resíduos de tirosina. DOPA: diidroxifenilalanina; HOHICA: 3 α -hidroxi-6-oxo-2,3,3 α ,6,7,7 α -hexaidro-1H-indol-2-ácido carboxílico. Adaptado da ref. 44

A reação do $^1\text{O}_2$ com resíduos de tirosina em peptídeos gera como produto principal um hidroperóxido no carbono C_1 , que, em baixas temperaturas, decai lentamente para seu álcool correspondente. A 37 °C e, particularmente, na presença de luz UV ou íons metálicos este hidroperóxido pode dar origem a oxi-radicais, que podem promover danos a outros alvos biológicos⁴⁴.

Reação com resíduos de histidina

A oxidação de histidina livre pelo $^1\text{O}_2$ parece envolver a formação inicial de um ou mais endoperóxidos instáveis, através da 1,4 cicloadição do $^1\text{O}_2$ aos carbonos 2,4 e/ou 2,5 do anel imidazólico.

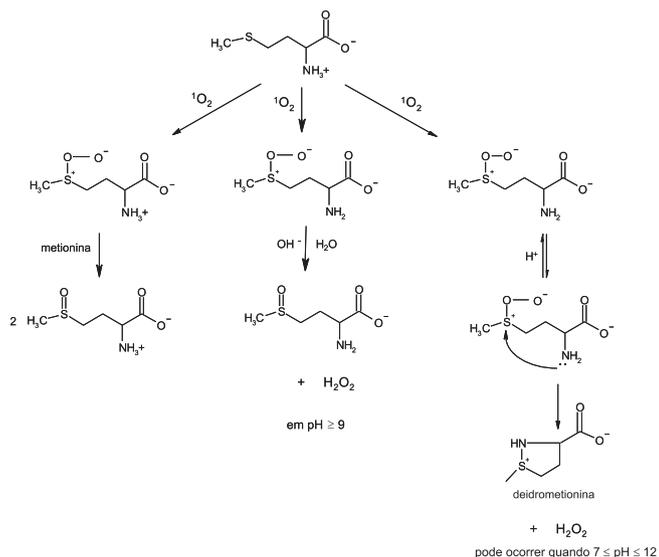
Recentemente, evidências desta formação foram obtidas quando endoperóxidos de derivados imidazólicos foram identificados em temperaturas extremamente baixas⁴⁵. Estes endoperóxidos sofrem rearranjo para um hidroperóxido. A decomposição deste hidroperóxido intermediário a um derivado carbonilado é seguida pela adição de uma molécula de água, produzindo uma imidazolona hidroxilada⁴⁶. Os produtos finais desta oxidação incluem derivados do ácido aspártico, asparagina, uréia e outros produtos ainda não identificados⁴⁷ (Esquema 3).



Esquema 3. Proposta do mecanismo de reação do $^1\text{O}_2$ com resíduos de histidina. Adaptado das refs. 46 e 47

Reação com resíduos de metionina

A fotooxidação de resíduos de metionina é dependente do pH: em $\text{pH} \leq 6$, propõe-se que a oxidação ocorre via formação de uma espécie zwitterionica, que reage com uma segunda molécula de metionina resultando em duas moléculas de sulfóxido; com o aumento do pH, outras reações podem ocorrer: em $\text{pH} \geq 9$ íons hidróxido podem levar a uma substituição no átomo de enxofre da espécie zwitterionica, resultando em um mol de peróxido de hidrogênio para cada mol de sulfóxido formado. Além dessas reações, quando $7 \leq \text{pH} \leq 12$ também pode ser formado um intermediário cíclico estável, chamado deidrometionina, e um mol de peróxido de hidrogênio^{8,29,48}.



Esquema 4. Proposta do mecanismo de reação do $^1\text{O}_2$ com resíduos de metionina em diferentes pHs. Adaptado das refs. 8 e 29

Reação com resíduos de cisteína

Resíduos de cisteína livres reagem rapidamente com o $^1\text{O}_2$, produzindo o dissulfeto correspondente, de um modo não quantitativo. Além disso, oxiácidos como o ácido cistéico também podem

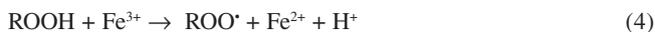
ser formados em algumas condições. Outros produtos precisam ainda ser identificados. Em proteínas, espera-se que a razão entre a formação de dissulfeto e oxiácidos varie dependendo da estrutura da proteína, devido às barreiras estérica e eletrônica na formação do dímero^{8,29,37}.

Oxidação de proteínas pelo $^1\text{O}_2$

Existem poucos trabalhos que estudam a oxidação de proteínas por $^1\text{O}_2$. Um destes trabalhos envolveu as ligações cruzadas de colágeno, existentes naturalmente na pele. Neste estudo, foi demonstrado que o $^1\text{O}_2$ oxida seletivamente os resíduos de histidina deste agregado protéico, podendo levar à destruição do mesmo, com formação de novas ligações cruzadas aberrantes e perturbação da função do colágeno na derme⁴⁶. Em outro estudo, foi demonstrado que o $^1\text{O}_2$ pode reagir com proteínas do cristalino do olho, resultando em modificação estrutural que pode ser importante no desenvolvimento de catarata⁴⁹. Da mesma forma, peróxidos protéicos têm sido detectados em células expostas ao $^1\text{O}_2$ gerado por fotossensibilização. Pesquisas evidenciaram que estes peróxidos têm remoção reduzida por enzimas celulares, tais como, catalase, peroxidase de raiz forte e Cu/Zn superóxido dismutase, sendo que apenas tióis e ácido ascórbico são efetivos em removê-los⁵⁰. Estes peróxidos protéicos podem reagir com outras biomoléculas, gerando um dano adicional. Por exemplo, já foi demonstrado que peróxidos protéicos foram capazes de causar a inibição de enzimas^{51,52} e induzir danos ao DNA⁵³.

Propagação do dano e conseqüências biológicas da oxidação de proteínas

Os hidroperóxidos de proteínas gerados a partir do $^1\text{O}_2$ podem sofrer decomposição térmica ou catalisada por íons metálicos, gerando radicais peroxila⁵⁴ (Equação 4)



Os hidroperóxidos de proteínas também podem sofrer redução por um elétron, gerando radicais alcóxila (reação de Fenton)⁵⁴ (Equação 5)



Deste modo, a formação de peróxidos em uma proteína a partir do $^1\text{O}_2$ pode resultar em danos subsequentes a outras proteínas. Estes danos incluem inativação enzimática, como a que foi demonstrada quando caspases, cisteíno-proteases que desempenham um papel central na apoptose, foram expostas a hidroperóxidos de triptofano e tirosina⁵⁵. Outro exemplo de inativação enzimática é o da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. Peróxidos de proteínas demonstraram reagir com o grupo tiol do sítio ativo desta enzima, inativando-a⁵¹. Por sua vez, a oxidação da lisozima pelo $^1\text{O}_2$ gerado por fotossensibilização causou a inativação parcial desta enzima⁵².

A remoção de H_2O_2 das células pela catalase é de vital importância, já que este peróxido pode dar origem a espécies mais reativas, tais como $^1\text{O}_2$ e radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$). Vários estudos mostraram que a oxidação da catalase pelo $^1\text{O}_2$ gera espécies enzimáticas com pontos isoelétricos mais ácidos⁵⁶⁻⁵⁸. Esta oxidação foi detectada inclusive em um estudo com a catalase em cultura de células humanas⁵⁹. A modificação parece ocorrer no grupo heme da enzima. A presença deste grupo heme modificado foi sugerida como indicadora da geração de $^1\text{O}_2$ *in vivo*. Contrastando com as modificações causadas ao grupo heme da catalase, verificou-se que o $^1\text{O}_2$

promove a oxidação de resíduos de metionina e tirosina do citocromo c. O citocromo c é uma hemeproteína mitocondrial fundamental no processo respiratório. Esta hemeproteína também é envolvida na cascata apoptótica, pois a liberação do citocromo c da mitocôndria para o citosol promove a ativação das caspases, desencadeando a apoptose celular. Contudo, os efeitos desta oxidação na apoptose celular ainda precisam ser detalhados⁶⁰.

Outra consequência da produção de peróxidos derivados de proteínas é a formação de ligações cruzadas e agregados protéicos, que podem resultar de reações secundárias independentes da produção contínua de $^1\text{O}_2$. Dentro deste contexto, cabe ressaltar a importância da formação de derivados oxidados do triptofano, em especial *N*-formilquinurenina e quinurenina. É bem conhecido que o acúmulo gradual de quinureninas nos tecidos humanos pode resultar em um aumento do dano por fotossensibilização, já que estes compostos são agentes fotossensibilizantes eficientes. Este ponto é particularmente significativo em órgãos humanos expostos à radiação solar⁴¹. Como exemplo, pode-se citar o cristalino do olho humano, que desempenha um papel fundamental na visão. O cristalino contém compostos de baixo peso molecular (formados principalmente de quinureninas) que atuam como filtros intra-oculares, absorvendo a luz UV na região situada entre 300 – 400 nm, e prevenindo o dano induzido à retina por esta luz. Muitos pesquisadores têm investigado a possibilidade de estes filtros modificarem covalentemente o cristalino. Em pessoas jovens, as moléculas de filtros UV existem primariamente na forma livre. Entretanto, com o passar do tempo, o nível de quinureninas ligadas covalentemente às proteínas do cristalino do olho aumenta exponencialmente⁶¹. Parker e colaboradores⁶² demonstraram que a fotoexposição de agregados quinurenina-proteína pode iniciar um dano oxidativo mediado pelo $^1\text{O}_2$ às proteínas do cristalino do olho. Esta foto-oxidação resulta em formação de H_2O_2 e outros peróxidos protéicos. Também foi evidenciada a formação de produtos de oxidação de tirosina, tais como DOPA e ditirosina, neste processo. Não é claro o mecanismo pelo qual estes produtos são formados, contudo, é possível que estas reações ocorram via decomposição dos peróxidos iniciais a espécies reativas que, posteriormente, oxidariam resíduos de tirosina.

Oxidantes em geral produzem modificações em proteínas levando à perda de função e aumentando a taxa de degradação destas proteínas oxidadas. A via do proteossomo ubiquitina-26S é o principal mecanismo pelo qual células eucarióticas marcam proteínas para degradação⁶³. Uma oxidação moderada das proteínas aumenta sua suscetibilidade à proteólise e as torna substrato para o proteossomo. Contudo, proteínas severamente oxidadas parecem ser substratos de difícil ubiquitinação, primeiro agregando-se e então formando ligações cruzadas que as tornam altamente resistentes à proteólise. A incapacidade de degradar proteínas extensivamente oxidadas pode contribuir para o acúmulo de agregados protéicos que ocorre em algumas doenças e durante o processo de envelhecimento⁶⁴.

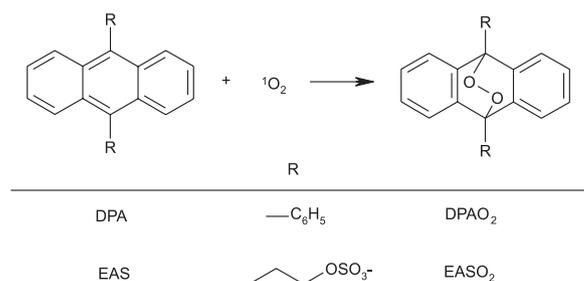
Uma importante consequência biológica da oxidação de proteínas é a oxidação posterior do DNA pelos peróxidos formados. Peróxidos de triptofano e tirosina gerados por fotossensibilização com um agente intercalante de DNA são capazes de clivá-lo em experimentos realizados com plasmídeo⁶⁵. A oxidação do DNA também já foi demonstrada com peróxidos de histonas gerados por radiação gama. Desta forma, a geração inicial de peróxidos nas proteínas nucleares, tais como as histonas, pode promover um dano subsequente ao DNA, incluindo ligações cruzadas DNA-proteína e mutações⁶⁶.

Estratégias para análise e detecção do $^1\text{O}_2$ e de moléculas por ele oxidadas

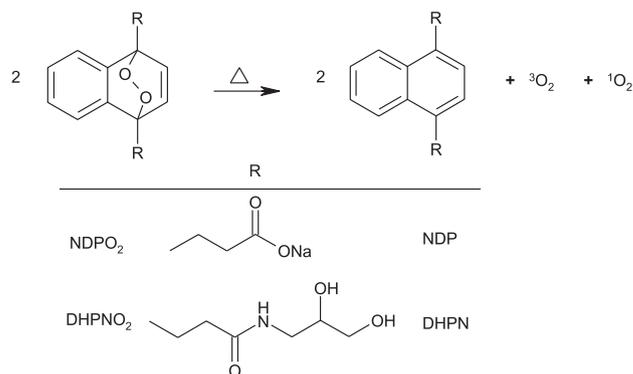
Para avaliar possíveis danos a biomoléculas, causados pelo $^1\text{O}_2$

e por moléculas por ele oxidadas, faz-se necessária à utilização de ferramentas analíticas, tais como seqüestradores químicos do $^1\text{O}_2$, termólise de endoperóxidos como fonte de $^1\text{O}_2$ e marcação isotópica de produtos. Seqüestradores químicos de $^1\text{O}_2$ são moléculas que reagem com o $^1\text{O}_2$ gerado e o produto pode então ser identificado. Por ex., pode-se utilizar a reação de $^1\text{O}_2$ com o 9,10-difenilantraceno (DPA)⁶⁶ ou com derivados de antraceno solúveis em água, como o 9,10-dietilantraceno disulfonato (EAS)^{11,67} (Esquema 5). Ambas as reações formam endoperóxidos estáveis, que podem ser detectados por HPLC ou outras técnicas. A termólise de endoperóxidos é outro exemplo importante, desenvolvido com o objetivo de se obter “fontes limpas” de $^1\text{O}_2$, compatíveis com as condições presentes em meios biológicos (meio aquoso, pH neutro, temperaturas moderadas). Merece destaque a decomposição térmica de endoperóxidos hidrossolúveis de derivados de naftaleno, a qual não gera subprodutos, não necessita de condições drásticas de trabalho e produz $^1\text{O}_2$ em uma velocidade e quantidade conhecidas⁶⁸. Exemplos destes endoperóxidos incluem o endoperóxido do 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanoato de sódio (NDPO₂) e o endoperóxido da *N,N'*-di(2,3-diidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida (DHPNO₂)^{67,69} (Esquema 6). A utilização do isótopo [¹⁸O] do oxigênio também é de particular interesse, já que desta forma é possível demonstrar como o $^1\text{O}_2$ ou seus produtos de oxidação podem reagir com alvos biológicos. Os produtos de oxidação que contêm o oxigênio marcado podem ser detectados usando-se métodos adequados, tais como HPLC acoplado à espectrometria de massas.

Recentemente, a marcação isotópica de hidroperóxidos de lipídios com [¹⁸O] foi utilizada a fim de esclarecer o mecanismo da geração de $^1\text{O}_2$ a partir destes hidroperóxidos. Neste mesmo traba-



Esquema 5. Reação do $^1\text{O}_2$ com seus captadores. 9,10-difenilantraceno (DPA) e 9,10-dietilantraceno disulfonato (EAS), gerando os respectivos endoperóxidos (DPAO₂ e EASO₂). Adaptado das refs. 11, 66 e 67



Esquema 6. Liberação do $^1\text{O}_2$ pela termólise do endoperóxido do 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanoato de sódio (NDPO₂) e do endoperóxido da *N,N'*-di(2,3-diidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanamida (DHPNO₂), gerando os respectivos derivados de naftaleno (NDP e DHPN). Adaptado das refs. 67-69

lho, utilizou-se o DPA para seqüestrar o [$^{18}\text{O}_2$] gerado. O DPA- ^{18}O detectado por HPLC acoplado ao espectrômetro de massas constituiu uma prova inequívoca da geração de $^1\text{O}_2$ a partir de hidroperóxidos de lipídios^{24,70,71}. De modo similar, o endoperóxido DHPNO₂ marcado com [^{18}O] ⁷² foi utilizado para evidenciar que o $^1\text{O}_2$, quando liberado em células, é capaz de oxidar diretamente o DNA celular. A reação foi demonstrada através da detecção de 8-oxo-7,8-diidro-2'-deoxiguanosina, um produto de oxidação do DNA, isotopicamente marcado com [^{18}O] por HPLC acoplado ao espectrômetro de massas⁷³.

Contrastando com pesquisas envolvendo lipídios e DNA, existem poucos estudos descrevendo as interações de $^1\text{O}_2$ com proteínas e as conseqüências biológicas destas interações. As interações de hidroperóxidos de proteínas previamente formados pela reação com $^1\text{O}_2$ e alvos biológicos também precisam ser esclarecidas. As estratégias de análise e detecção de produtos estáveis, tais como as acima descritas para lipídios e DNA, podem ser de grande utilidade na elucidação do destino celular de proteínas oxidadas.

O estudo do papel dos produtos de oxidação de proteínas pelo $^1\text{O}_2$ e outros oxidantes em sistemas biológicos pode levar a respostas importantes sobre as implicações destas espécies nos processos celulares, uma vez que já começam a surgir evidências da participação destas espécies na indução de dano ao DNA e nos processos de sinalização celular.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência (PRONEX/FINEP). P. D. Mascio e G. E. Ronsein são bolsistas da John Simon Guggenheim Memorial Foundation e da FAPESP, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C.; *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford, 1999.
- Khan, A.; Kasha, M.; *J. Chem. Phys.* **1963**, *39*, 2105.
- Boveris, A.; Cadenas, E.; Chance, B.; *Fed. Proc.* **1981**, *40*, 195.
- Browne, R.; Ogryzlo, E.; *P. Chem. Soc. London* **1964**, 117.
- Khan, A.; *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6516.
- Foote, C. S.; *Science* **1968**, *162*, 963.
- Foote, C. S.; *Photochem. Photobiol.* **1991**, *54*, 659.
- Straight, R. C.; Spikes, J. D. Em *Singlet O₂*; Frimer, A. A., ed.; CRC Press: Boca Raton, 1985, vol. IV, p. 91.
- Briviba, K.; Saha-Moller, C.; Adam, W.; Sies, H.; *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1996**, *38*, 647.
- Aubry, J. M. Em *Membrane Lipid Oxidation*; Vigo-Pelfrey, C., ed.; CRC Press, 1991, vol. II, p. 65.
- Di Mascio, P.; Sies, H.; *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 2909.
- Di Mascio, P.; Bechara, E.; Medeiros, M.; Briviba, K.; Sies, H.; *FEBS Lett.* **1994**, *355*, 287.
- Martinez, G. R.; Di Mascio, P.; Bonini, M. G.; Augusto, O.; Briviba, K.; Sies, H.; Maurer, P.; Rothlisberger, U.; Herold, S.; Koppenol, W. H.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 10307.
- Held, A. M.; Halko, D. J.; Hurst, J. K.; *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 5732.
- Kanofsky, J.; *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 5991.
- Kanofsky, J.; Wright, J.; Tauber, A.; *FEBS Lett.* **1985**, *187*, 299.
- Kanofsky, J.; Wright, J.; Miles-Richardson, G.; Tauber, A.; *J. Clin. Invest.* **1984**, *74*, 1489.
- Kanofsky, J.; *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 5596.
- Kanofsky, J.; *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 14171.
- Steinbeck, M.; Khan, A.; Karnovsky, M.; *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 13425.
- Kanofsky, J.; Sima, P.; *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 9039.
- Russell, G. A.; *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 3871.
- Howard, J.; Ingold, K.; *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 1057.
- Miyamoto, S.; Martinez, G.; Medeiros, M.; Di Mascio, P.; *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6172.
- Bloodworth, A.; Eggelte, H. Em ref. 8, vol. II, p. 93.
- Foote, C. S.; Denny, R. W.; *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 5162.
- Baumstark, A.. Em ref. 8, vol. II, p. 1.
- Foote, C. S.; Thomas, M.; Ching, T.-Y.; *J. Photochem.* **1976**, *5*, 172.
- Ando, W.; Takata, T.. Em ref. 8, vol. III, p. 1.
- Michaeli, A.; Feitelson, J.; *Photochem. Photobiol.* **1994**, *59*, 284.
- Wilkinson, F.; Helman, W. P.; Ross, A. B.; *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1995**, *24*, 663.
- Monroe, B.. Em ref. 8, vol. I, p. 177.
- Vever-Bizet, C.; Dellinger, M.; Brault, D.; Rougee, M.; Bensasson, R.; *Photochem. Photobiol.* **1989**, *50*, 321.
- Prat, F.; Hou, C.-C.; Foote, C. S.; *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5051.
- Davies, M.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *305*, 761.
- Matheson, I.; Etheridge, R.; Kratoch, N.; Lee, J.; *Photochem. Photobiol.* **1975**, *21*, 165.
- Davies, M.; *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3*, 17.
- Nakagawa, M.; Yoshikawa, K.; Hino, T.; *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 6496.
- Nakagawa, M.; Watanabe, H.; Kodato, S.; Okajima, H.; Hino, T.; Flippen, J. L.; Witkop, B.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1977**, *74*, 4730.
- Langlois, R.; Ali, H.; Brasseur, N.; Wagner, J.; van Lier, J.; *Photochem. Photobiol.* **1986**, *44*, 117.
- Posadaz, A.; Biasutti, A.; Casale, C.; Sanz, J.; Amat-Guerri, F.; Garcia, N.; *Photochem. Photobiol.* **2004**, *80*, 132.
- Jin, F.; Leitich, J.; von Sonntag, C.; *J. Photochem. Photobiol., A* **1995**, *92*, 147.
- Criado, S.; Soltermann, A. T.; Marioli, J. M.; Garcia, N. A.; *Photochem. Photobiol.* **1998**, *68*, 453.
- Wright, A.; Bubb, W. A.; Hawkins, C. L.; Davies, M. J.; *Photochem. Photobiol.* **2002**, *76*, 35.
- Kang, P.; Foote, C. S.; *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 9623.
- Au, V.; Madison, S.; *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *384*, 133.
- Tomita, M.; Irie, M.; Ukita, T.; *Biochemistry* **1969**, *8*, 5149.
- Sysak, P.; Foote, C.; Ching, T.-Y.; *Photochem. Photobiol.* **1977**, *26*, 19.
- Balasubramanian, D.; Du, X.; Zigler, J. S.; *Photochem. Photobiol.* **1990**, *52*, 761.
- Morgan, P. E.; Dean, R. T.; Davies, M. J.; *Free Radical Biol. Med.* **2004**, *36*, 484.
- Morgan, P. E.; Dean, R. T.; Davies, M. J.; *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 1916.
- Silva, E.; De Landea, C.; Edwards, A.; Lissi, E.; *J. Photochem. Photobiol., B* **2000**, *55*, 196.
- Luxford, C.; Morin, B.; Dean, R.; Davies, M.; *Biochem. J.* **1999**, *344*, 125.
- Hawkins, C. L.; Davies, M. J.; *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1504*, 196.
- Hampton, M.; Morgan, P.; Davies, M. J.; *FEBS Lett.* **2002**, *527*, 289.
- Lledias, F.; Rangel, P.; Hansberg, W.; *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 10630.
- Diaz, A.; Horjales, E.; Rudino-Pinera, E.; Arreola, R.; Hansberg, W.; *J. Mol. Biol.* **2004**, *342*, 971.
- Lledias, F.; Rangel, P.; Hansberg, W.; *Free Radical Biol. Med.* **1999**, *26*, 1396.
- Lledias, F.; Hansberg, W.; *Photochem. Photobiol.* **1999**, *70*, 887.
- Estevam, M. L.; Nascimento, O. R.; Baptista, M. S.; Di Mascio, P.; Prado, F. M.; Faljoni-Alario, A.; Zucchi, M. d. R.; Nantes, I. L.; *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 39214.
- Vazquez, S.; Aquilina, J. A.; Jamie, J. F.; Sheil, M. M.; Truscott, R. J. W.; *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 4867.
- Parker, N. R.; Jamie, J. F.; Davies, M. J.; Truscott, R. J. W.; *Free Radical Biol. Med.* **2004**, *37*, 1479.
- Robinson, P. A.; Ardley, H. C.; *J. Cell Sci.* **2004**, *117*, 5191.
- Grune, T.; Merker, K.; Sandig, G.; Davies, K. J. A.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *305*, 709.
- Mahon, K.; Ortiz-Meoz, R.; Prestwich, E.; Kelley, S.; *Chem. Commun.* **2003**, *15*, 1956.
- Turro, N. J.; Chow, M. F.; *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 7218.
- Pierlot, C.; Aubry, J.; Briviba, K.; Sies, H.; Di Mascio, P.; *Methods Enzymol.* **2000**, *319*, 3.
- Martinez, G. R.; Medeiros, M. H. G.; Di Mascio, P.; *Quim. Nova* **2000**, *23*, 686.
- Pierlot, C.; Hajjam, S.; Bathelemy, C.; Aubry, J.-M.; *J. Photochem. Photobiol., B* **1996**, *36*, 31.
- Miyamoto, S.; Martinez, G.; Martins, A.; Medeiros, M.; Di Mascio, P.; *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4510.
- Miyamoto, S.; Martinez, G.; Martins, A.; Medeiros, M.; Di Mascio, P.; *Biofactors* **2004**, *22*, 333.
- Martinez, G. R.; Ravanat, J.-L.; Medeiros, M. H. G.; Cadet, J.; Di Mascio, P.; *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10212.
- Ravanat, J.-L.; Di Mascio, P.; Martinez, G. R.; Medeiros, M. H. G.; Cadet, J.; *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 40601.