

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus do Litoral Paulista

Trabalho de Conclusão de Curso

Análise comparativa da afinidade de hidroperóxidos lipídicos de relevância biológica pela peroxirredoxina 2 de humanos e sua suscetibilidade à hiperoxidação através de abordagens bioquímicas e *docking* molecular

Aluna: Gabrielle do Nascimento Sividanes

Orientador: Marcos Antonio de Oliveira

Co-orientadora: Vitória Isabela Montanhero Cabrera

**São Vicente - SP
2023**

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus do Litoral Paulista

Trabalho de Conclusão de Curso

Análise comparativa da afinidade de hidroperóxidos lipídicos de relevância biológica pela peroxirredoxina 2 de humanos e sua suscetibilidade à hiperoxidação por meio de abordagens bioquímicas e *docking* molecular

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, com habilitação em Gerenciamento Costeiro, pelo Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus do Litoral Paulista

Aluna: Gabrielle Do Nascimento Sividanes

Orientador: Marcos Antônio de Oliveira

Co-orientadora: Vitória Isabela Montanhero Cabrera

**São Vicente - SP
2023**

S624a	Sividanés, Gabrielle Análise comparativa da afinidade de hidroperóxidos lipídicos de relevância biológica pela peroxirredoxina 2 de humanos e sua suscetibilidade à hiperoxidação através de abordagens bioquímicas e docking molecular / Gabrielle Sividanés. -- São Vicente, 2023 39 p. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, São Vicente Orientador: Marcos Antonio De Oliveira Coorientadora: Vitória Isabela Montanhero Cabrera 1. Biologia Molecular. 2. Bioquímica. 3. Oxidação Fisiológica. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, São Vicente. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

“Até cortar os próprios defeitos pode ser perigoso. Nunca se sabe qual é o defeito que sustenta nosso edifício inteiro.” – Clarice Lispector

“Digo: o real não está na saída nem na chegada: ele se dispõe para a gente é no meio da travessia.” – Guimarães Rosa – Grandes Sertões: Veredas

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, que me deu a base para ser quem sou. À minha mãe que sempre fez de tudo para me dar suporte nos meus estudos, se desdobrando em mil para trabalhar e que é minha inspiração de mulher batalhadora e corajosa; à minha avó que me ensinou a ler e me deu conselhos muito importantes, sempre acreditou em mim; aos meus irmãos que são os amores da minha vida e à minha madrastra, que antes de eu saber, viu tudo que o que eu queria para a minha vida e me incentivou a seguir a área que amo.

À minha segunda família da graduação, Frozen (Thiago), Olívia (Letícia), Sapucaí (Liliane) e Vitany; vocês me acompanharam durante todo esse trajeto, passamos por muitas coisas juntos, alegrias e raivas, mas eu posso dizer com propriedade que sem vocês eu não teria passado em algumas/muitas disciplinas, queria agradecer muito por tudo que vocês fizeram por mim, especialmente durante a pandemia, quando eu estava cuidando da Melissinha, e pela preocupação quando eu fiquei doente. À minha querida amiga Neid (Geovanna) que apesar da pouca convivência, muitas vezes foi meu esteio quando eu estava mal, ou me proporcionou momentos incríveis nas nossas conversas que parecem que nunca são finalizadas. À família LABIMES: principalmente à Murtinha (Vitória) que é uma ótima coorientadora, construímos uma amizade linda nesse ano, agradeço muito por tudo, por todos os conselhos e afagos, mas especialmente por ter te conhecido; Sabrina, Ary e Gabi (agregados – Thaísa e os que já saíram - Ana e Luís). Quero agradecer cada um pelo apoio; pelo aprendizado; pelos conselhos; pelas viajadas (principalmente Ary e Davi); pelas inúmeras risadas (vocês sem dúvida tornaram meu dia mais leve); pelos rolês; pelos cafés da manhã; pelas fofocas; pela palha italiana (mamãe pata); pelo ambiente tranquilo, mesmo quando estávamos cansados ou chateados, ainda sim o clima era acolhedor. Fico muito grata de ter compartilhado todos estes momentos incríveis com vocês. Agradeço também às entidades do Labimes: Carlão, Melina e Breyer por me ajudarem mesmo que indiretamente nos experimentos, cálculos e processos que eu não tinha a mínima ideia de como fazia.

Agradeço especialmente ao meu orientador, Prof. Marcão, que em muitos momentos foi praticamente um pai para mim (inclusive, se eu seguisse seu conselho e tivesse ido me vacinar logo, talvez eu não teria pegado covid daquele jeito), me dando puxões de orelha, mas sempre construtivos, brincando, conversando, também sendo extremamente sincero. Agradeço a oportunidade de trabalhar no laboratório, pelos ensinamentos, por entender todas as minhas questões de irmãe, por todo respeito, consideração e carinho com que sempre me tratou. Muitas vezes o senhor acreditou mais em mim do que eu mesma e lutou pelas minhas causas junto comigo, sou muito grata por isso!! Sem dúvidas foi um prazer inenarrável compartilhar esses anos com o senhor!

Aos meus professores do ensino médio que me deram a todo o conhecimento necessário para passar no vestibular, principalmente o Prof. João (as questões que eu mais acertei foram as de literatura) que me ensinou a ter gosto e admiração pela literatura brasileira. E ao Prof. Thiago, que me inspirou a seguir a carreira da biologia, eu sempre admirei o jeito com que o senhor dava aula, sempre com um brilho nos olhos por estar falando do que gostava, mesmo com a minha sala sendo bastante bagunceira e eu fazendo milhões de perguntas, o senhor nunca perdeu o gosto pelo que fazia.

Agradeço imensamente à professora Dra. Daniela Truzzi pela colaboração e auxílio nos experimentos de fluorescência. À prof Dra. Sayuri por ceder gentilmente os hidroperóxidos de lipídeos utilizados nos ensaios.

Por último e não menos importante, queria agradecer a Jesus que é minha inspiração e ao meu guia Paulo, que sempre anda comigo, tentando me ajudar a trilhar os melhores caminhos, e que nem sempre ouço, mas tento.

Muitas pessoas acabaram ficando de fora, tantas me ajudaram de diversas formas que nem teria como colocar todas aqui.

Agradeço também à CAPES e à FAPESP pelo apoio e financiamento das pesquisas.

A todos, o meu mais sincero agradecimento.

RESUMO

Com aumento da expectativa de vida da população humana, também ocorre o aumento de doenças associadas a idade como as neurodegenerativas, cardiovasculares, neoplasias, dentre outras, e cresce também a necessidade de novas terapias. Oxidantes e radicais livres estão relacionados a diversas doenças e uma possibilidade de tratamento é a modulação dos níveis dessas moléculas na célula, aumentando ou diminuindo o estresse oxidativo, para fins de proteção ou diminuição da viabilidade celular respectivamente. Para lidar com o estresse oxidativo a célula dispõe de enzimas antioxidantes, dentre elas as peroxirredoxinas (Prx), enzimas capazes de decompor hidroperóxidos (Hpx). As Prx possuem diversas isoformas entre os organismos, em humanos, a isoforma Prx2 aparenta ter um papel de extrema importância em razão de sua alta abundância em determinados tipos celulares (*e.g.* é a terceira enzima mais expressa em eritrócitos) e alta reatividade sobre hidroperóxidos ($k = 10^7\text{--}10^8 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Por outro lado, também já foi observada sua superexpressão em tecidos tumorais, indicando um papel protetor realizado pela Prx2 contra o estresse oxidativo em células neoplásicas, o que permite a progressão de tumores. A HsPrx2 pertence à classe das 2-Cys Prx típicas, e estruturalmente são homodímeros obrigatórios que realizam a decomposição de seus substratos (hidroperóxidos) através de uma cisteína reativa denominada cisteína peroxidásica (C_P). Após a decomposição é formado ácido sulfênico ($C_P\text{-SOH}$) que condensa com uma cisteína adicional localizada no monômero complementar, formando um dissulfeto intermolecular. Sob altas concentrações de Hpx, dois ou três substratos são decompostos rapidamente pela enzima, formando cisteína ácido sulfinico ($C_P\text{-SO}_2\text{H}$) ou sulfônico ($C_P\text{-SO}_3\text{H}$), levando à perda de atividade peroxidásica da HsPrx2. Já foram descritos como substratos desta enzima moléculas inorgânicas como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peroxinitrito (NOOH); bem como peróxidos sintéticos, como hidroperóxidos de cumeno (CHP) e *tert*-butil (*t*-BOOH), contudo ainda não foram avaliados hidroperóxidos orgânicos biológicos, como os de lipídeos, considerados de extrema relevância por participarem de vias de sinalização de processos inflamatórios, coagulação, hipertensão dentre outros. Neste contexto, uma alta afinidade por peróxidos orgânicos biológicos pode facilitar a hiperoxidação de HsPrx2 mesmo em baixas concentrações, tornando estes hidroperóxidos possíveis inibidores biológicos da enzima. Neste trabalho, inicialmente, efetuamos um levantamento da literatura de quais seriam os substratos biológicos mais importantes para HsPrx2. Foram efetuadas simulações computacionais de acoplamento (*docking*) molecular que indicaram que Hpx derivados de lipídeos de cadeia longa poderiam ser substratos com alta afinidade para HsPrx2 uma vez que os resultados revelaram, dentre outros fatores, grande proximidade de sua função peróxido ao S_γ do resíduo catalítico de Prx2 ($\sim 3 \text{ \AA}$) bem como uma baixa energia livre de Gibbs (ΔG entre -4.8 e -6.1 cal/mol). Para avaliar bioquimicamente os Hpx derivados de lipídeos como substratos de Prx2, expressamos e purificamos a enzima recombinante de humanos em conjunto com o sistema redutor de leveduras (ScTrx e ScTrxR1). Por meio do ensaio de oxidação do NADPH determinamos de forma comparativa as constantes cinéticas utilizando H_2O_2 , CHP, Hpx de ácido oleico (Ol-OOH) e linoleico (Li-OOH e Li-OOH₍₂₎) muito abundantes em células eucarióticas. O K_M foi determinado como $104 - 89 \text{ M}^{-1}$ para H_2O_2 e CHP e variou de $16 - 23 \text{ M}^{-1}$ para Hpx de lipídeos, indicando que para a saturação enzimática são necessárias menores concentrações de Hpx de lipídeos. O K_{Cat} para as moléculas lipídicas foi sensivelmente menor ($0,03 - 0,05 \text{ s}^{-1}$) em comparação com H_2O_2 e CHP ($0,3 - 0,6 \text{ s}^{-1}$), o que pode estar relacionado a um grupo de saída mais volumoso. Por meio de ensaios de fluorescência intrínseca determinamos as constantes de oxidação da HsPrx2, como 10^{8-7} para CHP e Hpx de ácido oleico. Em conjunto, nossos resultados revelam pela primeira vez que os hidroperóxidos de lipídeos podem não só ser substratos de peroxirredoxinas humanas, como também possuem maior afinidade pela enzima que H_2O_2 e CHP, amplamente estudados.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1 Estresse oxidativo e características dos hidroperóxidos orgânicos	8
1.2 Relevância biológica dos hidroperóxidos orgânicos	9
1.3 Peroxirredoxinas, substratos e características estruturais	11
1.4 Aspectos estruturais e moleculares do sítio ativo de 2-Cys Prx	13
1.5 Hiperoxidação de Prx2 e <i>switching</i> funcional	14
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 <i>Docking</i> molecular e tratamento da proteína	18
3.1.1 Análise dos resultados de <i>docking</i>	18
3.2 Hidroperóxidos utilizados para os ensaios bioquímicos	18
3.3 Expressão e purificação	19
3.3.1 Plasmídeos de expressão e genes de proteínas alvo	19
3.3.2 Meio de cultura para bactérias	19
3.3.3 Expressão de proteínas em bactérias (<i>E. coli</i>)	19
3.3.4 Purificação de Proteínas	19
3.4 Ensaios bioquímicos	20
3.4.1 Avaliação de hiperoxidação por SDS PAGE não redutor	20
3.4.2 Ensaio acoplado de oxidação de NADPH	20
3.4.3 Cinética de oxidação de Prx2 de humanos por fluorescência intrínseca do triptofano	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1 Resultados de simulações computacionais de <i>docking</i> molecular	21
4.2 Resultados bioquímicos	24
4.2.1 Expressão e purificação de Prx2, Trx1 e TrxR1	24
4.2.2 Avaliação comparativa da afinidade por diferentes hidroperóxidos	25
4.2.2.1 Estado redox/oligomérico por SDS-PAGE não redutor	25
4.2.2.2 Avaliação do potencial oxidante de diferentes hidroperóxidos e determinação de constantes cinéticas por meio do ensaio acoplado de oxidação de NADPH	27
4.2.2.3 Cinética de oxidação de Prx2 de humanos através de alterações da fluorescência intrínseca do triptofano em diferentes estados oxidativos	30
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1. INTRODUÇÃO

1.1 Estresse oxidativo e características dos hidroperóxidos orgânicos

Para a manutenção da homeostase redox da célula, é necessário o controle constante dos níveis de oxidantes celulares. Em situações de desbalanço, ocorre o estresse oxidativo, que pode ser definido como a variação transitória da concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Sies *et al.*, 2022). Esse aumento pode ser controlado, como aqueles relacionados à eventos de sinalização redox fisiológicos (eustresse); ou de modo desordenado e supra-fisiológico (diestresse), causando sinalização aberrante ou interrompida, o qual a longo prazo possui efeito patológico (Sies *et al.*, 2022). As EROs são uma família heterogênea de moléculas derivadas de oxigênio molecular capazes de oxidar todos os tipos de biomoléculas, e são geradas por diversos processos biológicos, dentre eles o metabolismo respiratório da célula, na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, que forma o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pelas superóxido dismutases (SOD) (**figura 1**) (Sies *et al.*, 2022). Em proteínas o peróxido de hidrogênio é um oxidante de resíduos de cisteína, em alguns casos também metioninas, possuindo um papel fundamental em diversas vias de sinalização redox associadas à apoptose, crescimento e diferenciação celular (Finkel, 2003; Sies *et al.*, 2022). Apesar dos trabalhos focarem principalmente no H_2O_2 , existem diversos outros hidroperóxidos gerados no ambiente celular. De fato, os Hpx são um grupo heterogêneo de moléculas formadas através da oxidação de diversas biomoléculas por processos químicos ou por ação enzimática. Sua representação é feita pela fórmula geral R-OOH (Halliwell & Gutteridge, 2015; Seifried *et al.*, 2007), onde o grupo R (radical) pode ser um elemento químico, como por exemplo peroxinitrito (NOOH) e peróxido de hidrogênio (HOOH), ou um grupo orgânico derivado de diversas moléculas biológicas como aminoácidos (AA-OOH), nucleotídeos (Nt-OOH), proteínas (P-OOH) ou lipídeos (Lp-OOH), sendo os últimos os Hpx orgânicos mais abundantes nos seres vivos (Davies *et al.*, 1995; Finkel, 2003; Halliwell & Gutteridge, 2015; Seifried *et al.*, 2007). Quando estão em concentrações elevadas no ambiente celular, os Hpx são altamente tóxicos por induzirem reações em cadeia de peroxidação (Davies, 2005; Halliwell & Gutteridge, 2015). O principal efeito tóxico dessas moléculas ocorre de modo indireto através de reações químicas como as de Fenton e Haber-Weiss com metais de transição como o Fe^{2+} , gerando espécies radiculares como o radical hidroxila ($\bullet OH$) (Davies *et al.*, 1995; Finkel, 2003; Halliwell & Gutteridge, 2015; Seifried *et al.*, 2007). O radical $\bullet OH$ é uma espécie altamente reativa, capaz de oxidar carboidratos, lipídeos, proteínas e DNA (Davies *et al.*, 1995; Davies, 2005; Halliwell & Gutteridge, 2015; Seifried *et al.*, 2007).

Com o aumento de EROs, especialmente na presença de íons de Fe^{2+} , ocorre a indução de peroxidação lipídica, através da retirada sistêmica de hidrogênios ou adição de oxigênio (Catala, 2012). Cabe ressaltar que moléculas de ácidos graxos insaturados são mais passíveis de sofrer peroxidação lipídica, por possuírem ligações mais fracas (Catala, 2012; Gurr *et al.*, 2003). Este processo produz Hpx de lipídeos, que também podem iniciar a reação de abstração de hidrogênio de outros lipídeos, através do

mecanismo de propagação, que pode causar danos irreversíveis às membranas celulares por conta da perda de fluidez, podendo até culminar no seu rompimento, como ilustrado na **figura 1** (Catala, 2012; Su *et al.*, 2019).

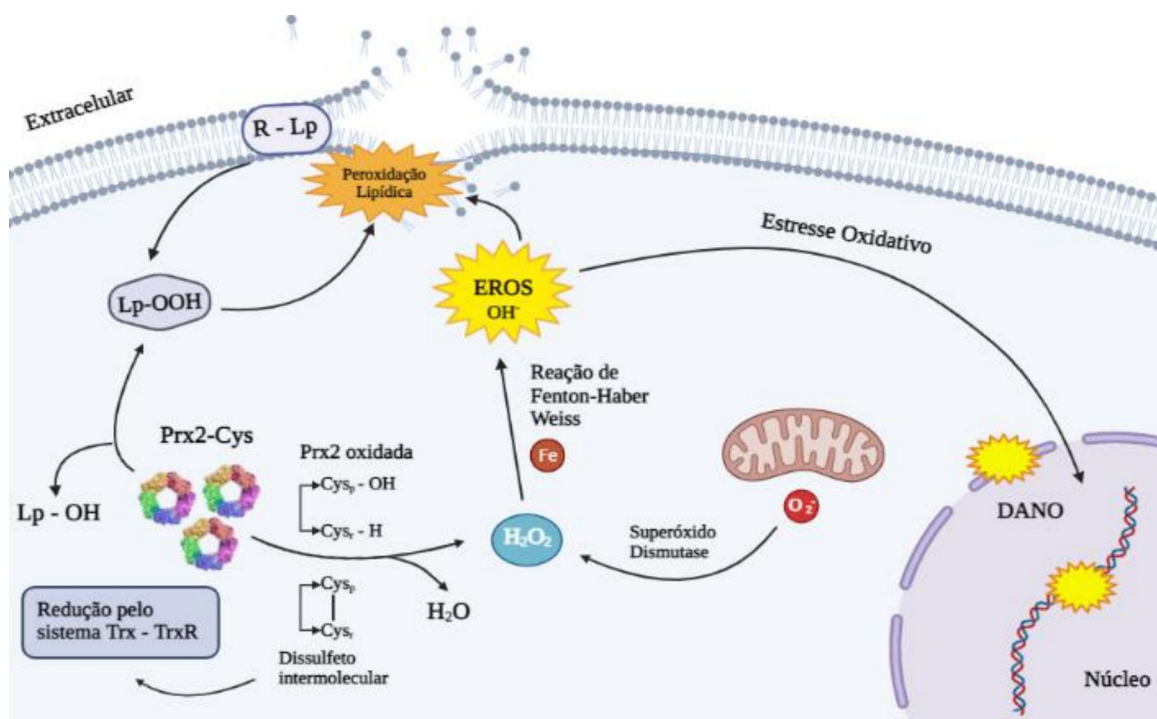


Figura 1: O diestresse oxidativo pode causar danos irreversíveis à célula, por degradar DNA, biomoléculas e membranas, eventualmente causando sua ruptura. Possui como causa a alta concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o peróxido de hidrogênio que é continuamente gerado pelo metabolismo respiratório da célula. Primeiramente ocorre a produção do radical ânion superóxido que é convertido em H₂O₂ pelas superóxido dismutases. Apesar do H₂O₂ não ser considerado um radical livre, possui alto potencial reativo, gerando espécies muito deletérias como a hidroxila (•OH), por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss. Por sua vez, as EROs reagem com a bicamada lipídica ocasionando sua peroxidação lipídica que através do mecanismo de propagação leva ao aumento exponencial deste peróxido orgânico. Para manter o controle da concentração de oxidantes, a célula possui uma gama de enzimas antioxidantes, como as Prx2, que são encontradas no citosol e decompõem H₂O₂ através do seu grupamento tiol, abstraindo um oxigênio do hidroperóxido. A figura foi elaborada utilizando o programa Biorender (<https://biorender.com>).

1.2 Relevância biológica dos hidroperóxidos orgânicos

As doenças neurodegenerativas como as de Alzheimer e Parkinson vêm se tornando mais comuns à medida que a expectativa de vida da população aumenta (WHO, 2021), com isso cresce a necessidade de estudos sobre mecanismos moleculares que atuam na evolução da patologia, visando retardar sua progressão e diminuir sua agressividade (Liu *et al.*, 2020). Neste contexto, os Hpx são altamente relevantes por participarem de vias apoptóticas e por promoverem estresse oxidativo, aumentando a lesão e danos nos neurônios (Liu *et al.*, 2020).

No caso do câncer, dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que no ano de 2020 houve 10 milhões de mortes pela doença, sendo ela a segunda maior causa de morte no ocidente (WHO, 2020). O tratamento de neoplasias é especialmente desafiador em razão da complexidade para encontrar biomoléculas alvo que não afetem as células saudáveis, visto que células tumorais são originadas pelo

acúmulo de mutações em genes que controlam apoptose, proliferação e instabilidade genômica (Clemente *et al.*, 2020; Cruz-Gregorio *et al.*, 2021; Hussain *et al.*, 2003). Nesta linha, trabalhos demonstram que o aumento das concentrações celulares de Hpx pode explicar, pelo menos em parte, características de células neoplásicas, visto que essas moléculas estão associadas a danos no DNA, o que pode gerar mutações. Há também evidências de que a concentração mais elevada de H₂O₂ celular pode induzir a proliferação, resistência à apoptose, metástase e invasão tecidual (Clemente *et al.*, 2020; Cruz-Gregorio *et al.*, 2021; Davies *et al.*, 1995; Davies, 2005; Discola *et al.*, 2005; Finkel, 2003; Halliwell & Gutteridge, 2015; Hussain *et al.*, 2003; Seifried *et al.* 2007).

Concomitantemente sabe-se que a modulação da expressão de enzimas antioxidantes pode atuar nas vias de sinalização que os Hpx participam, uma vez que sua concentração, apesar de alta, deve ser extremamente regulada, caso contrário, a célula entra em apoptose, assim sendo, células neoplásicas possuem enzimas antioxidantes como as Prx2 super expressas (Clemente *et al.*, 2020; Cruz-Gregorio *et al.*, 2021; Davies *et al.*, 1995; Davies, 2005; Finkel, 2003; Halliwell & Gutteridge, 2015; Seifried *et al.* 2007; Hussain *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2017).

Os ácidos graxos mono-insaturados (MUFA) e poli-insaturados (PUFA) de cadeia longa são de extrema importância, pois estão presentes nas membranas celulares, participando da mediação de processos fisiológicos e inflamatórios sendo precursores de eicosanóides (Carvalho *et al.*, 2019; Gurr *et al.*, 2003). A retirada destas moléculas da membrana e peroxidação destes lipídeos gera hidroperóxidos (Gurr *et al.*, 2003). Seu perfil e distribuição afeta a fluidez de membrana e sua permeabilidade a água (Carvalho *et al.*, 2019). Os MUFAs (ácido oleico – ω 9) podem ser sintetizados pelo organismo, já os PUFAs (ácido linoleico e linolênico – ω 3 e 6) não, portanto sua incorporação ocorre apenas através da alimentação, por isso são denominados “ácidos graxos essenciais” (Carvalho *et al.*, 2019; Gurr *et al.*, 2003; Nelson *et al.*, 2019). Após sucessivas reações de alongamento e dessaturação, estas moléculas originam ácido araquidônico (AA), ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA), que são eicosanóides (mediadores inflamatórios e de coagulação através da formação de leucotrienos, tromboxanos, prostaglandinas, prostaciclina e lipoxinas) **figura 2** (Carvalho *et al.*, 2019; Gurr *et al.*, 2003; Nelson *et al.*, 2019; Raff, Levitzky, 2012).

Como evidenciado na **figura 2**, a formação de Hpx e redução em um grupo hidroxila (OH) é um importante passo para gerar moléculas biologicamente ativas. Portanto o estudo da reatividade da Prx2 com essas moléculas é de extrema importância para o entendimento do funcionamento de vias ainda não totalmente compreendidas e de processos que possivelmente a Prx2 possa participar.

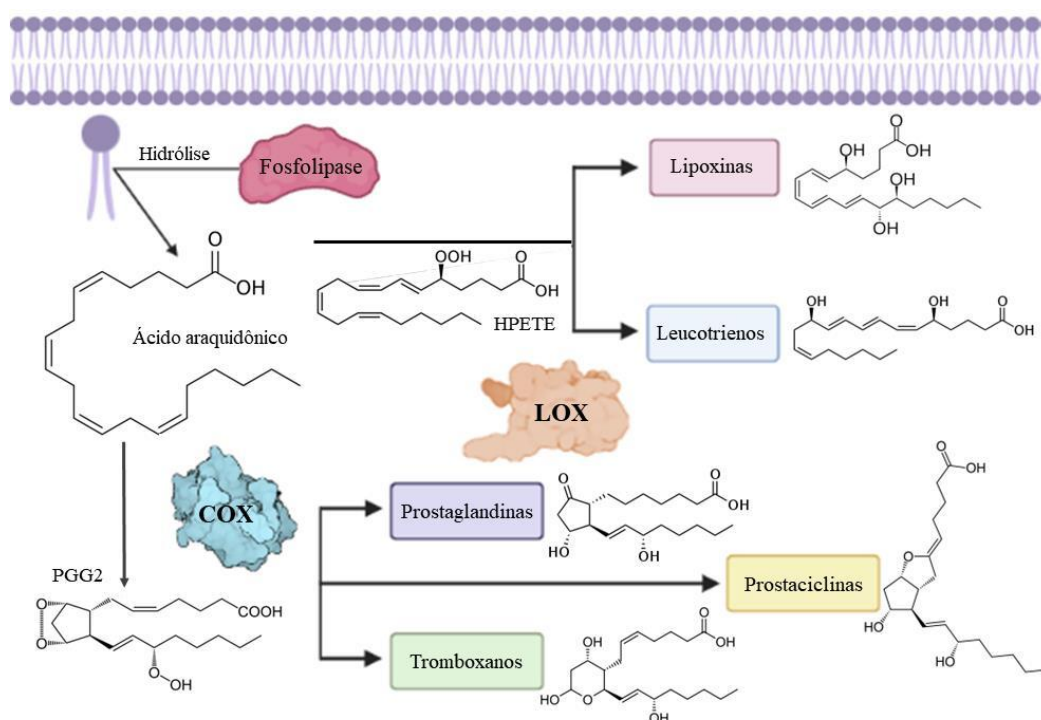


Figura 2: Ciclo do ácido araquidônico. O ácido araquidônico é retirado da membrana celular pela ação de fosfolipases através de hidrólise. Pode ser metabolizado pela via das lipoxigenases (LOX), que catalisam a formação de Hpx de ácido araquidônico (HPETE), posteriormente originando leucotrienos e lipoxinas; ou pela via das ciclooxigenases (COX) que catalisa reações da molécula com O_2 , formando Hpx e quebrando duplas ligações para dar origem à PGG2 (prostaglandina precursora) que posteriormente será reduzida pela própria COX, originando prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos. A figura foi elaborada utilizando o programa Biorender (<https://biorender.com>).

Um aspecto importante também, reside no fato de que a peroxidação lipídica é aumentada em determinados tipos de câncer como o de colón (Skrzydowska *et al.*, 2005), bem como as lipoxigenases (15-LOX e 12-LOX) possuem papéis relevantes como enzimas produtoras de moléculas de sinalização tumorigênicas, permitindo o desenvolvimento da neoplasia (Clemente *et al.*, 2020). Fármacos que promovem a inibição destas enzimas têm se mostrado promissores ao impedir a progressão tumoral (Che *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2018). De forma geral, os trabalhos acima indicam que os peróxidos de lipídeos apresentam relação importante com neoplasias. Neste contexto, o estudo de proteínas capazes de decompor Hpx, como a HsPrx2, torna-se muito relevante, visto que também pode ser alvo terapêutico.

1.3 Peroxirredoxinas, substratos e características estruturais

As peroxirredoxinas são enzimas antioxidantes que se destacam por serem altamente expressas em diversos tecidos e tipos celulares (Schroder, *et al.*, 2000), possuírem ampla distribuição celular, sendo encontradas no citosol, retículo endoplasmático, peroxissomo, núcleo, associada a membranas e mitocôndrias (Day *et al.*, 2012; Romanello *et al.*, 2003). Em humanos, e de forma geral em mamíferos, já foram descritas 6 isoformas (Prx1-Prx6). Estas enzimas não possuem grupamentos prostéticos e são

capazes de decompor os substratos utilizando um resíduo de cisteína reativo denominado de cisteína peroxidásica (C_P). Apesar de compartilharem aspectos comuns, as peroxirredoxinas são estruturalmente e funcionalmente diversas e podem ser divididas em três classes: Prx 1-Cys, enzimas diméricas que possuem apenas a cisteína peroxidásica (C_P); as Prx 2-Cys típicas, também homodímeros que possuem uma cisteína adicional (C_R) formando um dissulfeto intermolecular com o monômero complementar; e as 2-Cys atípicas, que podem ser diméricas ou monoméricas, e formam um dissulfeto intramolecular (Poole & Nelson, 2016). A isoforma Prx2 em humanos (HsPrx2), pertencente à classe das 2-Cys típicas, é a mais abundante em diversos tipos celulares, de fato em eritrócitos chega a ser a terceira proteína mais abundante (Bryk & Wiśniewski, 2017; Day *et al.*, 2012; Poole & Nelson, 2016; Romanello *et al.*, 2003; Schroder, *et al.*, 2000). Outro aspecto importante desta proteína é a sua diversidade de substratos, enquanto outras peroxidases como a catalase (Cat) decompõe apenas H_2O_2 , as Prxs têm a capacidade de decompor hidroperóxidos como o peroxinitrito, peróxido de monocarbonato e de peróxidos derivados de constituintes celulares orgânicos ou mesmo peróxidos orgânicos sintéticos (Day *et al.*, 2012; Kang *et al.*, 2005; Monteiro *et al.*, 2007; Romanello *et al.*, 2003; Truzzi *et al.*, 2019). Comparando a eficiência/especificidade enzimática sobre substratos de enzimas antioxidantes, observa-se que enquanto a catalase (Cat) só é capaz de decompor H_2O_2 com constantes de $10^6 M^{-1}s^{-1}$, as Prxs possuem constantes entre $10^{7-8} M^{-1}s^{-1}$ (**figura 3**) (Hall *et al.*, 2009; Romanello *et al.*, 2003). Por sua vez, as Gpx possuem abundância notadamente menor quando comparada com as Prx (Griffiths *et al.*, 2014).

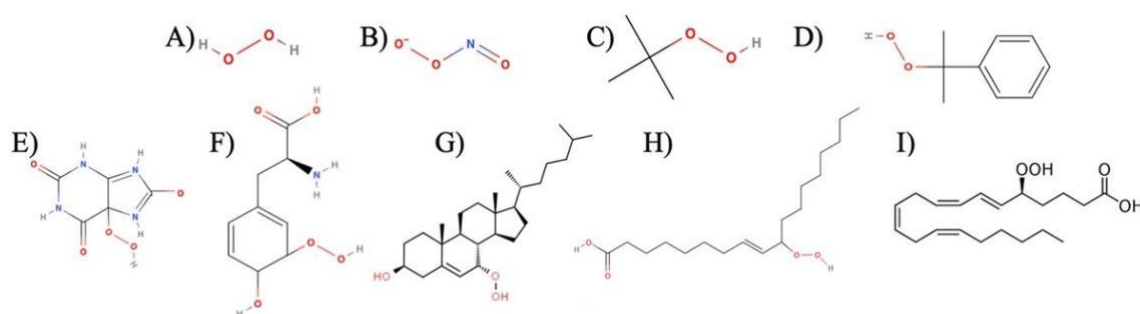


Figura 3: Estrutura de alguns substratos já identificados para as Prx. **A)** Peróxido de hidrogênio; **B)** peroxinitrito; **C)** hidroperóxido de *tert*-butil (*t*-BOOH); **D)** hidroperóxido de cumeno (CHP); **E)** hidroperóxido de urato; **F)** hidroperóxido de tirosina; **G)** hidroperóxido de colesterol; **H)** hidroperóxido de ácido oleico e **I)** hidroperóxido de ácido araquidônico. As representações gráficas foram geradas com o auxílio do programa Molview (<https://molview.org/>).

Para hidroperóxidos orgânicos, em especial os mais hidrofóbicos como hidroperóxidos de lipídeos, as informações existentes são muito escassas em razão da dificuldade de obtenção e utilização em ensaios bioquímicos, por conta da sua alta hidrofobicidade. Os estudos, portanto, se concentram em peróxidos orgânicos sintéticos como os hidroperóxidos de *tert*-butil (*t*-BOOH) e cumeno (CHP) (**figura 3C e 3D**) (Carvalho *et al.*, 2017). Contudo, resultados para Prx2 utilizando substratos volumosos como análogos de base (**figura 3E**) e derivados de aminoácidos (**figura 3F**) demonstram que esta enzima é capaz de decompô-los eficientemente (Carvalho *et al.*, 2017; Carvalho *et al.*, 2017; Peskin *et al.*, 2010; Tairum *et al.*, 2016). No caso de hidroperóxidos de lipídeos de importância biológica (**figura 3G-3I**) já foi

evidenciado que algumas Prxs de microrganismos são capazes de decompor estes substratos com alta eficiência (Oliveira *et al.*, 2021), entretanto estes resultados são indisponíveis para isoformas de mamíferos.

1.4 Aspectos estruturais e moleculares do sítio ativo de Prx 2 -Cys típicas

A HsPrx2, tal como todas as enzimas do tipo das Prx 2-Cys típicas, tem como unidade funcional um homodímero obrigatório que utiliza para decompor seus substratos, um resíduo de cisteína altamente reativo, C_P^{51} (a numeração dos resíduos se refere a isoforma HsPrx2), associada à C_R^{172} do monômero complementar, forma um dissulfeto intermolecular ($C_P-S-S-C_R$). Sua alta reatividade advém de outras interações com dois resíduos, uma Thr^{48} e Arg^{127} , os quais são capazes de desprotonar a C_P , formando um tiolato (C_P-S^-) (Monteiro *et al.*, 2017; Peskin *et al.*, 2010; Romanello *et al.*, 2018). O conjunto destes três aminoácidos (Thr^{48} , Arg^{127} , C_P^{51}) é denominado tríade catalítica (**figura 4B-D**) (Hall *et al.*, 2009; Wood *et al.*, 2003). Apesar de serem homodímeros obrigatórios, as Prx 2-Cys típicas, como a HsPrx2 são ativas como peroxidases em sua forma decamérica, formada pela associação de 5 homodímeros. Curiosamente, os resíduos envolvidos na catálise estão localizados na interface entre os dímeros que se dissociam quando a enzima decompõe hidroperóxidos (Hall *et al.*, 2009; Wood *et al.*, 2003). Essa característica faz com que o microambiente do sítio ativo seja formado por resíduos do dímero obrigatório bem como resíduos do dímero adjacente que ajudam a estabilizar os ligantes ou substratos (**figura 4D**) (Hall *et al.*, 2009, Wood *et al.*, 2003). Após a decomposição dos Hpx, o decâmero de HsPrx2 se dissocia em dímeros (**figura 4C**) os quais são reduzidos pelo sistema Trx-TrxR (Oliveira *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2010) para retornar à sua atividade catalítica, voltando ao estado decamérico (Hall *et al.*, 2009, Wood *et al.*, 2003).

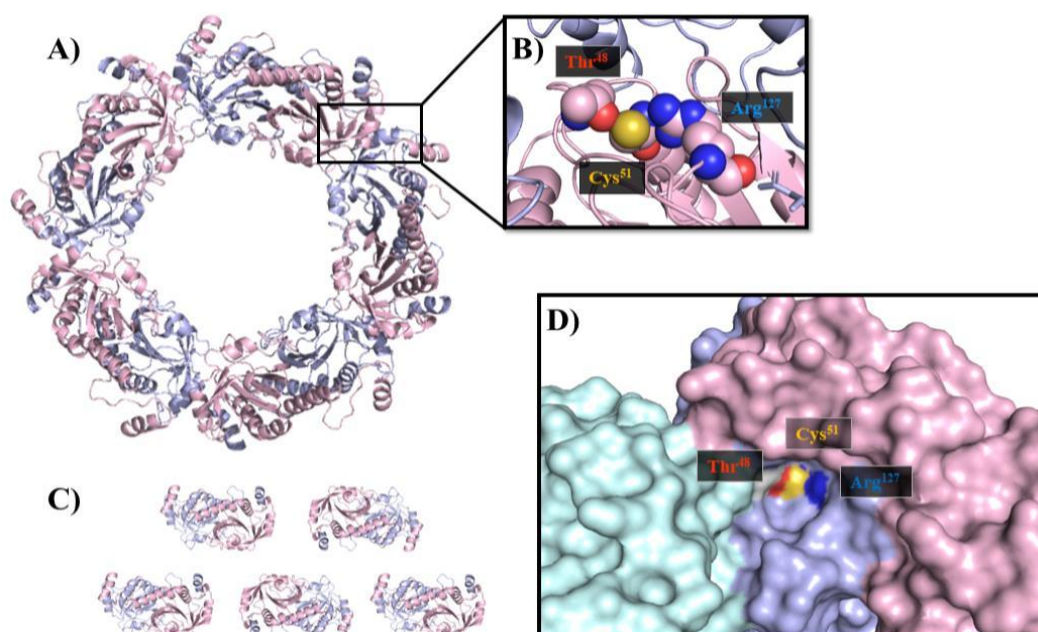


Figura 4: Características moleculares de HsPrx2. **A)** Estrutura decamérica (reduzida - capaz de decompor Hpx) de Prx 2 humana, em *cartoon* (PDB: 1QMV). Os monômeros estão representados em cores diferentes. **B)** Detalhe do sítio ativo mostrando a disposição dos resíduos da tríade catalítica no sítio ativo: Thr^{48} , C_P^{51} , Arg^{127} , representados em esferas e coloridos da seguinte forma: C = cor igual à unidade monomérica, N= azul, O =

vermelho e S = amarelo. **C)** Modelo de HsPrx2 em sua forma oxidada, formando dímeros, que estão representados em cores diferentes (púrpura claro e rosa). **D)** Prx2 representada em surface, onde o microambiente do sítio ativo forma uma cavidade, sendo composto por resíduos do homodímero funcional obrigatório e do dímero adjacente. O homodímero contendo C_P e C_R estão representados por cores distintas (púrpura claro e rosa), o monômero do dímero adjacente (azul claro). Os resíduos do sítio ativo estão coloridos da seguinte forma: Thr⁴⁸ = vermelho, C_P⁵¹ = amarelo e Arg¹²⁷ = azul. As representações gráficas foram criadas utilizando o PyMol (www.pymol.com).

1.5 Hiperoxidação de Prx2 e *switching* funcional

Em caso de altas concentrações de H₂O₂, em alternativa ao dissulfeto intermolecular entre C_P e C_R, pode ocorrer a hiperoxidação, quando dois Hpx são decompostos rapidamente pela enzima, resultando na formação de cisteína ácido sulfinico (C_P-SO₂H). No caso de HsPrx2, e de 2-Cys típicas de eucariotos de forma geral, este intermediário pode ser reduzido pela sulfirredoxina (Srx) que fará a conversão de ácido sulfinico em ácido sulfênico em constantes de 10⁴M⁻¹s⁻¹ (**figura 5**) (Lowther, Haynes, 2011; Woo *et al.*, 2003). Também é possível a formação de cisteína ácido sulfônico (C_P-SO₃H), quando a enzima decompõe três Hpx, sendo um estado considerado irreversível pois ainda não são conhecidas enzimas capazes de reverter esta espécie, portanto a Prx inativa é degradada (Findlay *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2013).

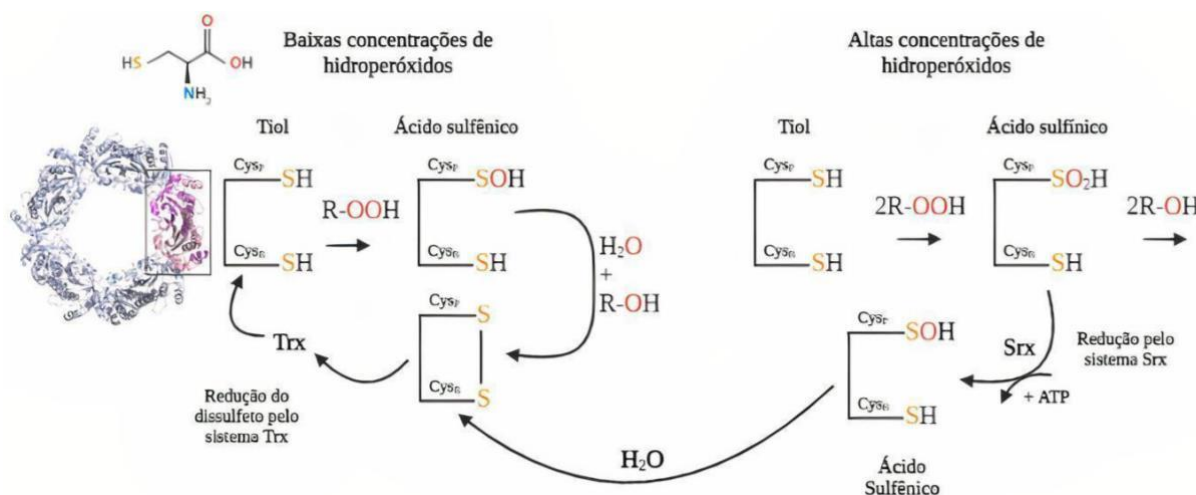


Figura 5: Aspectos moleculares da oxidação e hiperoxidação das 2-Cys Prx típicas. Em baixas concentrações de hidroperóxidos, ocorre oxidação do tiol de C_P em cisteína ácido sulfênico (C_P-SOH) a qual condensa com C_R resultando na formação de um dissulfeto intermolecular entre as duas subunidades do homodímero com consequente liberação de água e do grupo de saída do hidroperóxido (R-OOH). O dissulfeto então é reduzido pelo sistema Trx, que retorna as cisteínas a tiol. Em altas concentrações de hidroperóxidos ocorre a hiperoxidação de C_P, onde há a incorporação de dois oxigênios no grupamento tiol da C_P (C_P-SO₂H), neste caso a redução ocorre pelo sistema Srx, que é lento e dependente de ATP, retornando a cisteína a ácido sulfênico o qual forma um dissulfeto com C_R o qual pode ser reduzido pelo sistema Trx. A figura foi elaborada utilizando o programa Biorender (<https://biorender.com>).

Estudos recentes mostram que Hpx orgânicos sintéticos como t-BOOH e CHP hiperoxidam a HsPrx2 em taxas consideravelmente maiores que peróxidos hidrofílicos como NOO⁻ e H₂O₂, estes dados sugerem que hidroperóxidos orgânicos no geral têm maior capacidade de hiperoxidar a HsPrx2 que peróxidos inorgânicos (Ishida *et al.*, 2019). Apesar de estudos que investigam atividade/inativação de HsPrx2 só terem sido efetuados com Hpx orgânicos sintéticos e inorgânicos, a hiperoxidação por substratos orgânicos biológicos é de grande importância em aspectos como a sinalização celular. De fato, o sistema redutor Trx envolvido na redução das Prx também responde pela ativação redox de

muitos substratos envolvidos com o reparo de DNA (ribonucleotídeo redutase), reparo de proteínas (metionina sulfóxido redutase), kinases e fatores de transcrição envolvidos na sinalização celular (Conway *et al.*, 2015; Day *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013). Neste contexto, uma vez que HsPrx2 é muito abundante na célula, sua hiperoxidação disponibiliza o sistema Trx para ativação redox de outras moléculas que permitem a sobrevivência da célula ou levam à apoptose (Conway *et al.*, 2015; Day *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013; Netto *et al.*, 2016).

Outra questão relevante é que quando a HsPrx2 está hiperoxidada, ocorre o *switching* funcional de peroxidase para chaperona molecular. Neste contexto a enzima sofre intensa oligomerização assumindo a forma de cilindros ou esferas (**figura 6**) (revisado em Oliveira *et al.*, 2021). Uma vez que esta função reconhecidamente está envolvida com o enovelamento de proteínas, acredita-se que este *switching* proteja proteínas de danos quanto a célula se encontra em estresse oxidativo. Adicionalmente, acredita-se que a modulação controlada da mudança de atividade de peroxidase para chaperona pode ser importante em terapias de doenças neurodegenerativas como Alzheimer e doença de Creutzfeldt-Jakob onde pode ocorrer o enovelamento incorreto de proteínas e peptídeos, levando ao acúmulo de grandes agregados e formação de placas proteicas, prejudicando o funcionamento dos neurônios (Conway *et al.*, 2015; Detienne *et al.*, 2018; MacDiarmid *et al.*, 2013; Trotter *et al.*, 2008).

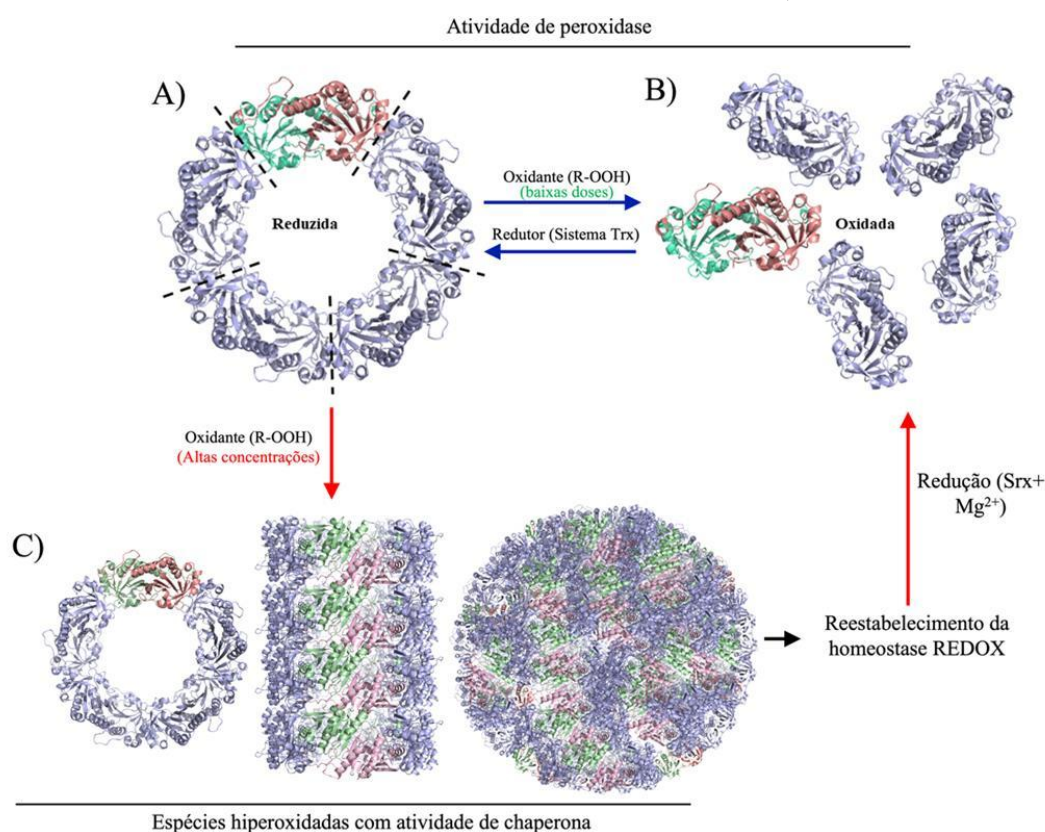


Figura 6: Aspectos funcionais e estruturais de enzimas Prx 2-Cys típicas. **A)** Quando reduzidas as Prx 2-Cys típicas encontram-se como decâmeros e apta a reduzir os substratos. **B)** A decomposição de hidropéroxidos resulta na formação de dissulfetos, o que leva a dissociação dos decâmeros em dímeros. **C)** Sob elevadas concentrações intracelulares de hidropéroxidos ocorre a hiperoxidação de C_P em cisteína ácido sulfinico (C_P-SO₂H), com concomitante perda da atividade peroxidásica e com ganho da atividade de chaperona. Quando hiperoxidada, as Prx 2-Cys típicas podem formar complexos de alto peso molecular através de intensa oligomerização. O

restabelecimento da homeostase redox permite a redução de $C_p\text{-SO}_2\text{H}$ pela enzima sulfirredoxina. As representações gráficas foram criadas utilizando o PyMol (www.pymol.com).

Recentemente nosso grupo de pesquisa demonstrou que 2-Cys Prx típicas eucarióticas são muito mais suscetíveis à hiperoxidação por hidroperóxidos orgânicos sintéticos (Tairum *et al.*, 2021). Curiosamente alguns trabalhos presentes na literatura revelam que Hpx de lipídeos como o ácido linoleico, oleico e araquidônico possuem grande afinidade por tiol em proteínas de microrganismos (Longo *et al.*, 2020; Reyes *et al.*, 2011) e são capazes de hiperoxidar estas proteínas mesmo em baixas doses (Oliveira *et al.*, 2004; Alegria *et al.*, 2017). No entanto, até o presente momento nenhum trabalho atentou para determinar a afinidade de Prx humanas por hidroperóxidos orgânicos. Neste contexto, o conhecimento de substratos biológicos das 2-Cys Prx típicas pode levar a identificação de peróxidos de lipídeos que podem desencadear a hiperoxidação de isoformas humanas com fins terapêuticos. De fato, já é bem conhecido que certos fármacos são capazes de promover a peroxidação lipídica, e neste contexto em determinadas situações eles poderiam ser utilizados para inativar a atividade peroxidásica e ativar a atividade de chaperona molecular (Gram & Fouts, 1996; Wendel & Feuerstein, 1991).

Cabe ressaltar que esta área de estudo carece mesmo de simulações computacionais de ligação de substratos ao sítio ativo. De fato, trabalhos de análises de *docking* molecular para a estrutura cristalográfica da HsPrx2, as simulações foram efetuadas utilizando a enzima em sua forma monomérica (Forli *et al.*, 2016) ou dimérica (Hou *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2019), este fato traz questionamentos visto que em seu estado ativo a HsPrx2 se encontra em estado decamérico e sítio ativo da proteína se localiza na interface de dímeros (**figura 4**), ou seja, é também formado por resíduos de aminoácidos do dímero adjacente que são importantes para a estabilização de um ligante.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos avaliar comparativamente a afinidade de hidroperóxidos orgânicos de relevância biológica pela Prx2 de humanos por meio de simulações computacionais (*docking* molecular) e diferentes abordagens bioquímicas que avaliem tanto a atividade da enzima quanto sua oligomerização.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 *Docking* molecular e tratamento da proteína

A estrutura cristalográfica da HsPrx2 e as coordenadas dos compostos foram obtidas no banco de dados PDB (código PDB: 1QMV) e no PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), respectivamente. Para estruturas de Hpx não disponíveis foram determinadas utilizando a ferramenta MolView (<https://molview.org/>). A estrutura da HsPrx2 obtida no PDB foi tratada removendo as moléculas de água bem como adicionando apenas hidrogênios polares com o auxílio do programa AutoDockTools-1.5.6 (Trott & Olson, 2010). O ácido sulfínico (SO₂H) encontrado na cisteína peroxidásica foi substituído por tiol (SH) utilizando o Pymol. A caixa utilizada para a ancoragem (*docking*) foi de 30 × 30 × 30 Å e teve como origem a cisteína peroxidásica de cada monômero utilizando as coordenadas do eixo x, y e z, sendo obtidos 20 resultados por monômero porque estes variam em sua estrutura.

3.1.1 Análise dos resultados de *docking*

As análises de interações entre aminoácidos e ligantes foram feitas utilizando a ferramenta LIGPLOT⁺ 4.5.3. A viabilidade dos resultados foi avaliada no programa Chimera 1.14, (Martinez *et al.*, 2019; Pettersen *et al.*, 2004) baseados na energia livre de Gibbs (ΔG) e a distância do grupamento peróxido do ligante ao S_γ da cisteína peroxidásica (C_P), sendo considerados *hits* distâncias entre 2 a 8 Å. Para a seleção do *best hit*, os melhores resultados foram selecionados baseado em ligantes no sítio ativo com ligante co-cristalizado na Prx 2-Cys típica de levedura (Tsa1 ligada à DTT; código de pdb = 3SBC).

3.2 Hidroperóxidos utilizados para os ensaios bioquímicos

A partir dos resultados de *docking*, foram selecionadas as moléculas com maior afinidade, que foram os hidroperóxidos de lipídeos monoinsaturados e poli-insaturados. Os hidroperóxidos de lipídeos foram gentilmente sintetizados e cedidos pelo grupo de pesquisa da Dra. Sayuri Myamoto (IQ, USP-SP).

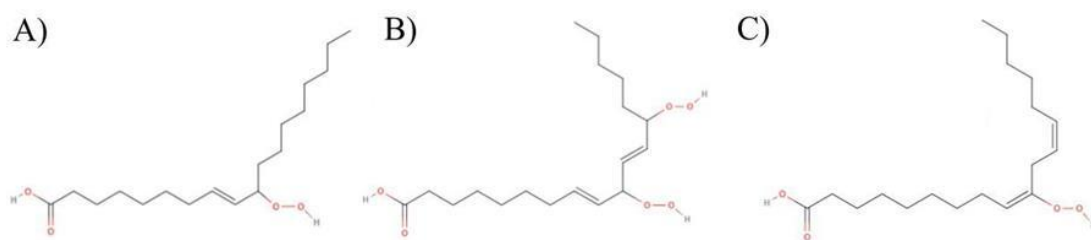


Figura 7: Hidroperóxidos de lipídeos selecionados para os ensaios bioquímicos. **A)** Hidroperóxido de ácido oleico - Ol-OOH; **B)** hidroperóxido de ácido linoleico - Li-OOH₍₂₎; **C)** hidroperóxido de ácido linoleico - Li-OOH. As representações gráficas foram geradas com o auxílio do programa Molview (<https://molview.org/>).

3.3 Expressão e purificação

3.3.1 Plasmídeos de expressão e genes de proteínas alvo

Os plasmídeos utilizados para a expressão foram: pET28b para Prx 2 de *H. sapiens*, pET17b para Trx1 de *S. cerevisiae* e pPROEX para TrxR1 de *S. cerevisiae*.

3.3.2 Meio de cultura para bactérias

Meios de cultura: Luria-Bertani (LB): (1% triptona; 0,5% extrato de levedura (YE); 0,5% NaCl); meio de cultura *Super Optimal Broth* (SOC): (2% triptona; 0,5% YE; 0,058% NaCl; 0,018% KCl; [glicose] final de 20mM; pH7; ampicilina 100 µg/ml).

3.3.3 Expressão de proteínas em bactérias (*E. coli*)

Para inserção do plasmídeo (1µl), foram utilizadas linhagens de *E. coli* BL21 (DE3) eletrocompetentes que foram submetidas à transformação por eletroporação a 2500 V e plaqueadas em meio de cultura contendo ágar (2%) e o antibiótico ampicilina/canamicina 50µg/ml (dependendo do plasmídeo). Após o crescimento das bactérias, uma colônia isolada foi retirada para crescimento em meio líquido LB. A expressão do gene de interesse foi induzida mediante a adição de 150 µl IPTG (1 M; [final] = 200 µM de IPTG).

3.3.4 Purificação de Proteínas

Foi realizada sonicação para o rompimento das células em 3 ciclos de (10s, seguidos de 60 de descanso) a 30% de amplitude, num banho de gelo para neutralizar o calor produzido pelas bolhas de cavitação geradas pelo equipamento. Como tampão foi utilizado (Tris 50 mM, NaCl 500 mM, pH 7.4); PMSF como inibidor de protease (50 mM); Triton (10%) como surfactante não iônico para permeabilização das membranas celulares e consequente facilitação do rompimento das células; e estreptomicina (10%) para a retirada dos ácidos nucleicos. A amostra foi centrifugada para a exclusão de restos celulares, o sobrenadante foi coletado para os passos subsequentes. A purificação foi realizada por IMAC, utilizando colunas Hi-Trap (Cytiva Life Sciences) - cobalto, em gradiente de imidazol, uma vez que todas as proteínas recombinantes deste estudo possuem caudas de histidina (adicionadas nos plasmídeos de expressão). Alíquotas das diferentes concentrações de imidazol foram coletadas e submetidas a SDS-PAGE (12%) e amostras que apresentaram proteínas puras foram coletadas, centrifugadas em concentrador Amicon Ultra Filter (Millipore) a 4°C, 4000 rpm por aproximadamente 30 min e dessalinizadas em colunas PD-10 (Cytiva Life Sciences) em tampão (200 mM de NaCl e 50 mM de Tris, pH 7.4). A quantificação foi feita através de espectrofotometria a 280 nm, utilizando o coeficiente de extinção molar de cada proteína obtido com a ferramenta ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) (HsPrx2 = 21555 M⁻¹ cm⁻¹; ScTrx1= 10095 M⁻¹ cm⁻¹; ScTrxR1 =24660 M⁻¹ cm⁻¹).

3.4 Ensaios bioquímicos

3.4.1 Avaliação de hiperoxidação por SDS PAGE não redutor

A avaliação da suscetibilidade de HsPrx2 à hiperoxidação foi realizada através de alíquotas de proteína previamente reduzidas com 5 mM de ditioneitol (DTT) por uma hora. Após a dessalinização (retirada de excesso do DTT) as alíquotas de 10 μ M de HsPrx2 foram tratadas com diferentes Hpx e incubadas durante 30s, a reação foi interrompida utilizando *stop buffer* (Tris-HCl pH 6.8, SDS 2%, NEM 50 mM, glicerol 100%, azul de bromofenol). Todos os géis foram corridos no mesmo dia do ensaio.

3.4.2 Ensaio acoplado de oxidação de NADPH

Para os ensaios de oxidação de NADPH com HsPrx2, foi utilizado sistema redutor heterólogo de *Saccharomyces cerevisiae* (Trx1 e TrxR1) (Truzzi *et al.*, 2019). Foram adicionados 5 μ M de HsPrx2 nos *mixes* contendo 10 μ M de ScTrx1, 0.2 μ M de ScTrxR1, 150 μ M de NADPH, em tampão 50 mM HEPES/pH = 7.4, 1 mM de DTPA e 100 μ M de azida sódica. As reações foram iniciadas pela adição de concentrações crescentes de CHP, H₂O₂ ou Hpx de lipídeos (1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 250, 500 μ M) e monitoradas a 340 nm em espectrofotômetro Cary 60 UV-Vis (Agilent), a 37°C, por 6 minutos. Como controle negativo, foram utilizadas reações sem a HsPrx2. Para os cálculos cinéticos e representações gráficas utilizou-se o programa GraphPad Prism 4.

3.4.3 Cinética de oxidação de Prx2 de humanos por fluorescência intrínseca do triptofano

Alíquotas de HsPrx2 foram previamente reduzidas utilizando 5 mM de DTT, a 37°C, por aproximadamente 1 hora. A retirada do DTT foi feita utilizando coluna de dessalinização PD-10 (Cytiva Life Sciences) e foi bombeado argônio às amostras para expulsar o O₂. 1 μ M de HsPrx2 reduzida foi misturado com concentrações crescentes de Hpx de Oleico e CHP em um instrumento de fluxo interrompido (espectrofluorímetro Applied Photophysics SX 17MV acoplado a *stopped flow*). A reação de mudança da fluorescência intrínseca da proteína foi monitorada a (λ_{ex} = 280 nm, emission filter >330 nm), a 25 °C em tampão (50 mM de NaCl e 50 mM de Tris, pH 7.4). A determinação do K_{obs} (1/t₁) foi feita no programa Origin 2023, a partir das hipérboles geradas pelo gráfico de fluorescência, utilizando uma função exponencial simples (ExpDec1 – para cálculos de constantes de primeira ordem). O cálculo das constantes foi realizado pela professora Dra. Daniela Truzzi. Também foram utilizadas concentrações subestequiométricas de oxidante, para que melhor fosse identificado os pontos de queda da curva de atividade enzimática que correspondem à formação do ácido sulfênico.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resultados de simulações computacionais de *docking* molecular

Inicialmente foi realizada uma revisão bibliográfica na busca de peróxidos orgânicos que poderiam ser potenciais substratos de HsPrx2. Foram encontrados hidroperóxidos de tirosina, hidroperóxido de urato, hidroperóxido de colesterol, hidroperóxido de ácido linolênico, hidroperóxido de ácido linoleico, hidroperóxido de ácido oleico, e hidroperóxido de ácido araquidônico como os mais relevantes biologicamente em razão de sua geração e abundância em sistemas biológicos (Brinkmann *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2017; Ishida *et al.*, 2017; Lovatt *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2012).

É importante ressaltar que as moléculas selecionadas apresentam diferentes características, como tamanho, peroxidação em posições distintas, presença de uma segunda função peróxido, número de diferentes insaturações, e diferenças na flexibilidade, dentre outras, o que acreditamos que deve levar a diferenças de afinidade pela HsPrx2, que em última instância podem refletir em uma maior ou menor sensibilidade à hiperoxidação de HsPrx2 para cada um deles. Estas características são importantes não somente para se ter um aprofundamento das características da HsPrx2, visto que esse conhecimento pode auxiliar na triagem de inibidores que se assemelhem ao substrato com maior afinidade. Também se torna possível a busca por novas terapias que modulem a concentração de oxidantes celulares, atuando em vias de sinalização específicas (Sies *et al.*, 2022).

As moléculas de hidroperóxidos orgânicos foram ancoradas utilizando o tetrâmero da proteína, pois em trabalhos anteriores já foi identificado que resíduos do dímero adjacente das 2-Cys Prx típicas auxiliam na estabilização do ligante no sítio ativo (dos Santos *et al.*, 2022). Para realizar uma triagem das melhores moléculas para testes bioquímicos (**Tabela 1**), foram consideradas as distâncias do S γ da C $_P$ ao grupamento hidroperóxido dos ligantes (distâncias ótimas entre 2-4 Å, médias de 4-5 Å e insatisfatórias 6-8 Å), bem como em qual classe se concentrou o maior número de *hits* (foram selecionados os *hits* com distância de 2-8 Å), também foi considerado a energia livre de Gibbs (ΔG) que mede a espontaneidade de uma reação (quanto mais negativo o valor, maior estabilidade do complexo proteína-ligante).

Vale ressaltar que apesar do 8-colesterol ter o ΔG mais negativo de todas os ligantes testados na *best pose*, apresentou apenas 1 *hit* na distância 3-4 Å, podendo indicar que a enzima possui alta afinidade por moléculas hidrofóbicas, contudo estas estruturas volumosas e cíclicas possuem menos liberdade de conformações (Nelson, Cox, 2019), dificultando sua entrada na cavidade do sítio ativo. Todos os Hpx que foram considerados como os melhores obtiveram a maior parte dos *hits* nas distâncias entre 3-4 Å. Estes resultados nos parecem bastante relevantes, pois indicam que moléculas mais flexíveis como os peróxidos de lipídeos de cadeia longa podem ser melhores substratos quando comparadas com moléculas que apresentam estruturas cíclicas, que conferem maior rigidez. Neste sentido é possível observar que o pior resultado considerado foi justamente o hidroperóxido de colesterol, seguidos pelos peróxidos derivados de base como o peróxido de urato e o peróxido de tirosina (**tabela 1**).

Apesar do baixo número de hits, boa parte dos resultados do ácido araquidônico apresentaram baixa distância da cisteína peroxidásica, baixo ΔG e interação com todos os resíduos da tríade catalítica. O alinhamento com a estrutura cristalizada com DTT da Tsa1 também mostrou resultado próximo ao real.

Tabela 1: Classificação dos resultados obtidos por *docking* como melhores resultados (verde), medianos (amarelo) ou insatisfatórios (vermelho), baseados no número de moléculas ancoradas na região do sítio ativo parâmetros de ΔG , distância e orientação entre os grupos reativos dos Hpx e o S_Y de C_P de HsPrx2.

Hidroperóxidos	Distância (S_Y -OOH)				Total Hits	Best Pose	Energia livre de Gibbs (ΔG)
	3-4 (Å)	4-5 (Å)	5-6 (Å)	6-8 (Å)			
8-colesterol	1	4	21	5	31/200	3,961	-6,5
10-ácido oleico	67	12	13	3	101/200	2,993	-4,8
10-linoleico	58	6	1	4	69/200	3,03	-5,3
10-13-linoleico	70	2	1	2	75/200	3,311	-4,9
5-araquidônico	6	4	1	0	11/200	3,352	-5,6
15-araquidônico	25	5	6	2	38/200	3,061	-6,1
13-linolênico	24	6	6	5	41/200	3,348	-4,9
Urato	19	8	4	17	48/200	3,635	-5,4
Tirosina	19	2	2	7	29/200	3,242	-4,9

Outro aspecto que merece atenção foi o elevado número de resultados positivos obtidos para o peróxido derivado de ácido linoleico contendo duas peroxidações. Como é possível observar nas **figuras 8 e 9**, o hidroperóxido de ácido linoleico com duas peroxidações ($Li-OOH_{(2)}$) se organiza de forma peculiar na maioria dos resultados, com as duas peroxidações voltadas para a cisteína peroxidásica, na tabela 1 é possível constatar que 75 de 200 resultados apresentaram esta conformação. Tais dados abrem a possibilidade desta molécula ser mais oxidante que os outros monoperóxidos ($Ln-OOH$, $Li-OOH$, $Ol-OOH$), podendo apresentar maior afinidade pela enzima por possuir dois grupamentos OOH , neste contexto também é possível que ocorra hiperoxidação da HsPrx2 mais facilmente, já que não necessitaria da entrada de uma segunda molécula de Hpx no sítio ativo para formar ácido sulfínico. Caso esta hipótese seja coerente, é possível que os peróxidos de lipídeos contendo diversas insaturações, os quais estão largamente presentes nas células inclusive em membranas biológicas, possam representar inibidores biológicos das Prx 2-Cys típicas.

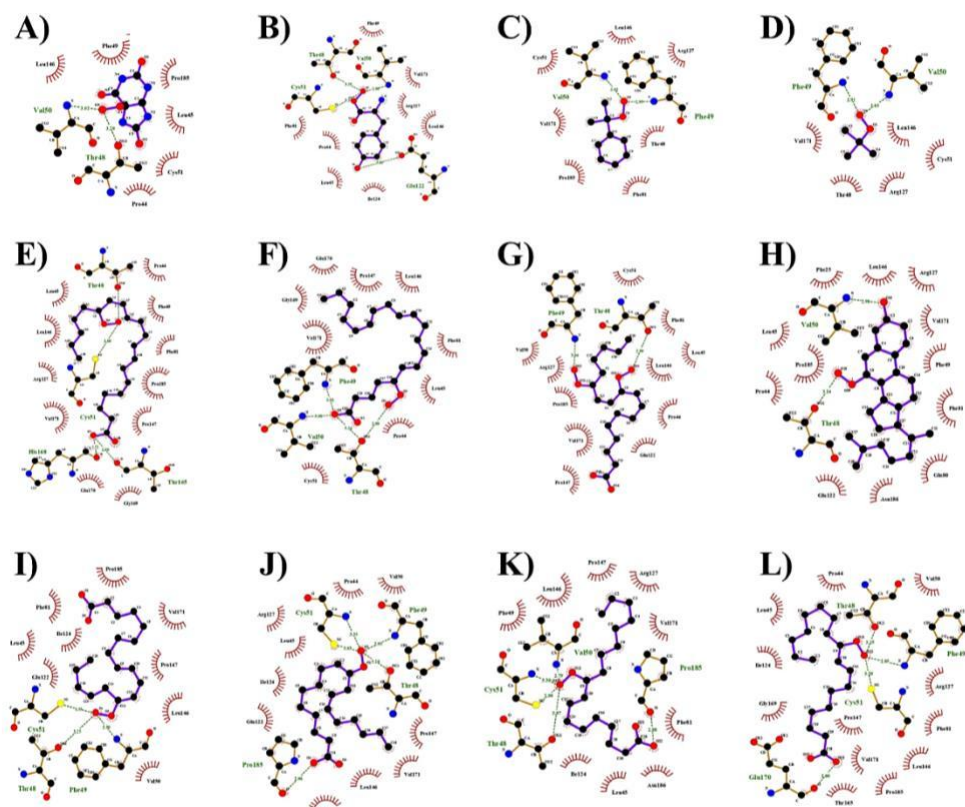


Figura 8: Interações moleculares envolvidas na estabilização dos ligantes. As imagens geradas pelo programa mostram as interações dos resíduos de aminoácidos com o ligante de caráter hidrofóbico como semicírculos vermelhos, já as que apresentaram ponte de hidrogênio, o aminoácido aparece junto a uma linha pontilhada verde com a distância entre os átomos. **A)** Hidroperóxido de urato; **B)** hidroperóxido de tirosina; **C)** hidroperóxido de cumeno; **D)** hidroperóxido de *tert*-butil; **E)** hidroperóxido de ácido araquidônico (peroxidação no carbono 15); **F)** hidroperóxido de ácido araquidônico (peroxidação no carbono 5); **G)** hidroperóxido de ácido linoleico (duas peroxidações nos carbonos 10 e 13); **H)** hidroperóxido de colesterol (peroxidação no carbono 8); **I)** hidroperóxido de ácido linolênico (peroxidação no carbono 13); **J)** hidroperóxido de ácido linoleico (peroxidação no carbono 10) **K)** e hidroperóxido de ácido oleico (peroxidação no carbono 10). As análises foram efetuadas utilizando o programa LIGPLOT⁺.

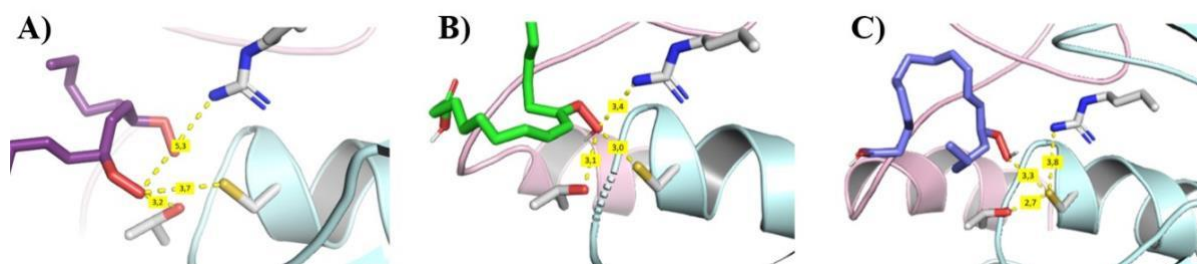


Figura 9: Representação das interações moleculares dos grupos reativos de hidroperóxidos de lipídeos e de grupos polares da tríade catalítica de HsPrx2. A representação 3D em *sticks* e *cartoon* da proteína foi criada utilizando a ferramenta PyMol, mostrando as distâncias entre o grupo reativo do hidroperóxido e da cadeia lateral de resíduos de aminoácidos da tríade catalítica envolvidos na reatividade ou direcionamento do Hpx a C_P representados por *sticks* e coloridos da seguinte forma: (C), amarelo (S), vermelho (O) e azul N. Para os peróxidos os átomos de O estão em vermelho e os de C em **A)** Li-OOH₂ = púrpura; **B)** Li-OOH = verde e **C)** Ol-OOH = azul.

Tabela 2: Comparação entre os resíduos de aminoácidos com interações com os ligantes (de natureza hidrofóbica ou pontes de hidrogênio) detectados com a ferramenta LIGPLOT⁺. Nesta tabela é possível observar de maneira geral quais resíduos foram comuns aos ligantes.

Cumeno	Tert-But	Urato	Tirosina	15-Arac	5-Arac	8-Col	10-Oleico	10-13-Li	10-Li	Ln
-	-	'Pro ⁴⁴	'Pro ⁴⁴	'Pro ⁴⁴	'Pro ⁴⁴	'Pro ⁴⁴	-	'Pro ⁴⁴	'Pro ⁴⁴	-
-	-	'Leu ⁴⁵	'Leu ⁴⁵	'Leu ⁴⁵	'Leu ⁴⁵	'Leu ⁴⁵	'Leu ⁴⁵	'Leu ⁴⁵	'Leu ⁴⁵	'Leu ⁴⁵
'Thr ⁴⁸	'Thr ⁴⁸	'Thr ⁴⁸	'Thr ⁴⁸	'Thr ⁴⁸	'Thr ⁴⁸	'Thr ⁴⁸	'Thr ⁴⁸	'Thr ⁴⁸	'Thr ⁴⁸	'Thr ⁴⁸
'Phe ⁴⁹	'Phe ⁴⁹	'Phe ⁴⁹	-	'Phe ⁴⁹	'Phe ⁴⁹	'Phe ⁴⁹	'Phe ⁴⁹	'Phe ⁴⁹	'Phe ⁴⁹	'Phe ⁴⁹
'Val ⁵⁰	'Val ⁵⁰	'Val ⁵⁰	'Val ⁵⁰	-	'Val ⁵⁰	'Val ⁵⁰	'Val ⁵⁰	'Val ⁵⁰	'Val ⁵⁰	'Val ⁵⁰
'Cys ⁵¹	'Cys ⁵¹	'Cys ⁵¹	'Cys ⁵¹	'Cys ⁵¹	'Cys ⁵¹	-	'Cys ⁵¹	'Cys ⁵¹	'Cys ⁵¹	'Cys ⁵¹
-	-	-	-	-	-	'Glu ¹²²	-	-	-	'Glu ¹²²
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	'Ile ¹²⁴
'Arg ¹²⁷	'Arg ¹²⁷	-	'Arg ¹²⁷	'Arg ¹²⁷	'Arg ¹²⁷	'Arg ¹²⁷	'Arg ¹²⁷	'Arg ¹²⁷	'Arg ¹²⁷	'Arg ¹²⁷
'Leu ¹⁴⁶	'Leu ¹⁴⁶	'Leu ¹⁴⁶	'Leu ¹⁴⁶	'Leu ¹⁴⁶	'Leu ¹⁴⁶	'Leu ¹⁴⁶	'Leu ¹⁴⁶	'Leu ¹⁴⁶	'Leu ¹⁴⁶	'Leu ¹⁴⁶
-	-	-	-	'Pro ¹⁴⁷	'Pro ¹⁴⁷	-	'Pro ¹⁴⁷	'Pro ¹⁴⁷	'Pro ¹⁴⁷	'Pro ¹⁴⁷
-	-	-	-	-	-	'Asn ¹⁸⁶	'Asn ¹⁸⁶	-	-	-
-	-	-	-	'Gly ¹⁶⁹	'Gly ¹⁶⁹	-	-	-	-	-
-	-	-	-	'Glu ¹⁷⁰	'Glu ¹⁷⁰	-	-	-	-	-
'Val ¹⁷¹	'Val ¹⁷¹	-	'Val ¹⁷¹	'Val ¹⁷¹	'Val ¹⁷¹	'Val ¹⁷¹	'Val ¹⁷¹	'Val ¹⁷¹	'Val ¹⁷¹	'Val ¹⁷¹
'Pro ¹⁸⁵	-	'Pro ¹⁸⁵	-	'Pro ¹⁸⁵	'Pro ¹⁸⁵	'Pro ¹⁸⁵	'Pro ¹⁸⁵	'Pro ¹⁸⁵	'Pro ¹⁸⁵	-
-	-	-	-	-	-	*Gln ⁸⁰	-	-	-	-
*Phe ⁸¹	-	-	*Phe ⁸¹	*Phe ⁸¹	*Phe ⁸¹	*Phe ⁸¹	*Phe ⁸¹	*Phe ⁸¹	*Phe ⁸¹	*Phe ⁸¹

O símbolo apostrofo (') representa resíduos do monômero da tríade catalítica, os apóstrofos duplos (") resíduos do monômero complementar e o asterisco (*) resíduos do dímero adjacente.

4.2 Resultados bioquímicos

4.2.1 Expressão e purificação de Prx2, Trx1 e TrxR1

Como descrito nos materiais e métodos, a purificação de HsPrx2 e TrxR1 foi realizada por IMAC, a cauda de His possui afinidade por metais (cobalto, carregado na matriz da coluna de purificação) retendo a HsPrx2 ou a TrxR1. Em seguida, é feito um gradiente de imidazol (5-500 mM) que compete com as caudas pela ligação com o cobalto, e as proteínas se dissociam da resina da coluna. A purificação da Trx1 de levedura ocorre por fervura, uma vez que esta proteína é termo resistente e em sua construção não é inserida cauda de His na região N-terminal da enzima.

Após as purificações a eficiência do processo e a pureza das amostras foi avaliada por meio de SDS-PAGE redutor (12%). Na figura 10 é apresentado um gel representativo das purificações. Em média as purificações produziram aproximadamente 5 mg, 22,46 mg e 20,73 mg por litro de cultura celular para HsPrx2, ScTrx1 e ScTrxR1, respectivamente.

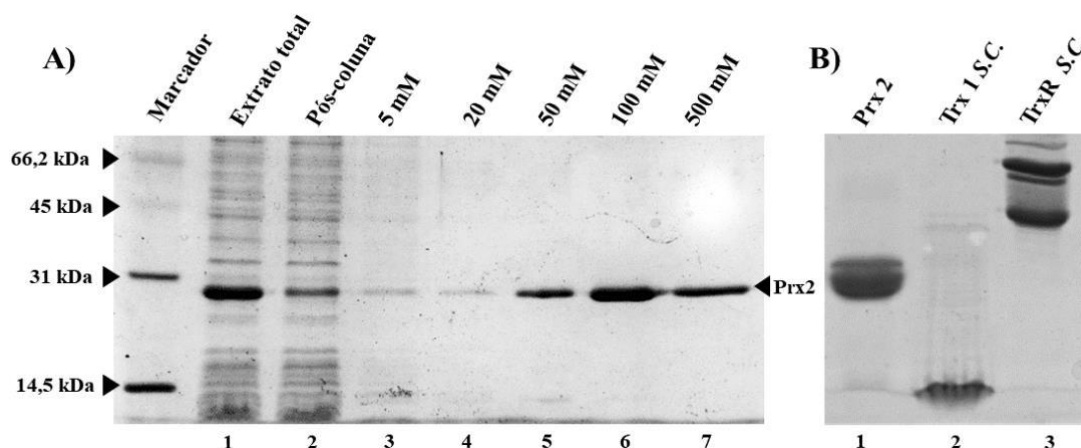


Figura 10: Avaliação da expressão e purificação de HsPrx2, Trx1 e TrxR1. **A)** Resultado de purificação em SDS-PAGE redutor (12%) das enzimas HsPrx2 recombinante contendo His-tag purificadas por IMAC utilizando a coluna HiTrap TALON crude (Cytiva). Na primeira *lane* foi aplicado o marcador de peso molecular Sigma Marker (Sigma-Aldrich), amostra não-purificada (1), amostra pós-coluna (2), e subsequentemente as diferentes concentrações de imidazol: 5mM (3), 20mM (4), 50mM (5), 100mM (6) e 500mM (7). **B)** Resultado da concentração de HsPrx2, Trx1 e TrxR, com aproximadamente 95% de pureza. Foi utilizado como corante *comassie blue*.

4.2.2 Avaliação comparativa da afinidade por diferentes hidroperóxidos

4.2.2.1 Estado redox/oligomérico por SDS-PAGE não redutor

A hiperoxidação foi avaliada através por meio de diferenças oligoméricas que podem ser detectadas por SDS-PAGE não redutor. Apesar de ser decâmero quando reduzida, as interações envolvidas na manutenção dos homodímeros constituintes do decâmero são efetuadas por interações fracas (van der Waals, hidrofóbicas e salinas) as quais são desfeitas em SDS-PAGE em razão da desnaturação da enzima pelo detergente e a migração ocorre como monômero. O tratamento com hidroperóxidos em dose crescente resulta na formação de dímeros unidos por pontes dissulfetos intermoleculares, uma interação covalente que não é rompida pelo SDS. Já na formação de ácido sulfinico ocorre a migração em monômeros, visto que a C_P é incapaz de formar ligações de dissulfeto. Na **figura 10** é apresentado diagrama do estado oligomérico em SDS-PAGE não redutor em razão da oxidação da enzima.

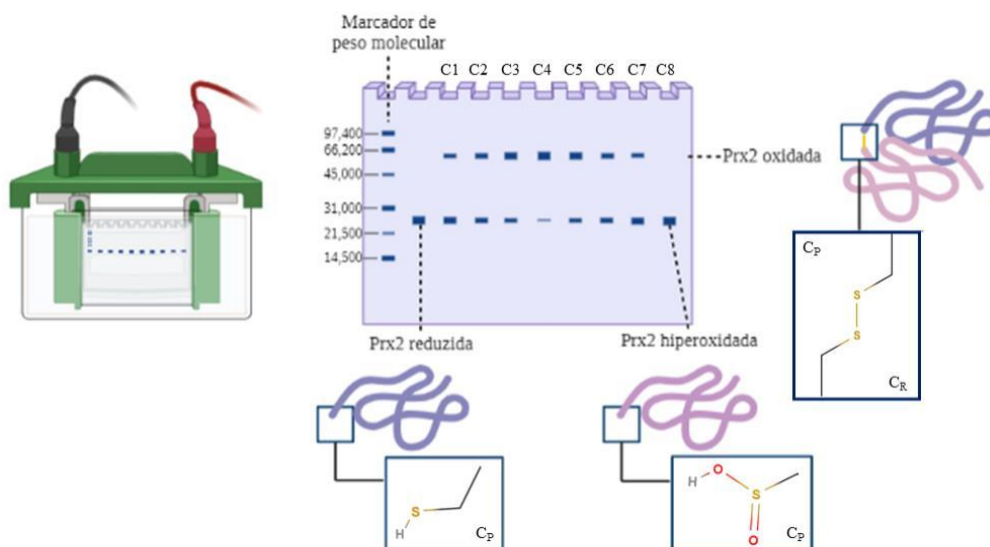


Figura 11: Resultado de avaliação de hiperoxidação por SDS-PAGE não redutor. A ilustração representa o estado oligomérico da população de enzimas em razão da oxidação do resíduo de cisteína catalítica (C_P -SH – reduzida,

C_P-S-S-C_R – oxidada em dissulfeto intermolecular e CP-SO₂/O₃H – hiperoxidada). Na figura é simulado a formação de espécies hiperoxidadas em razão do tratamento com concentrações crescentes de Hpx (C1-C8). A figura foi elaborada utilizando o programa Biorender (<https://biorender.com>).

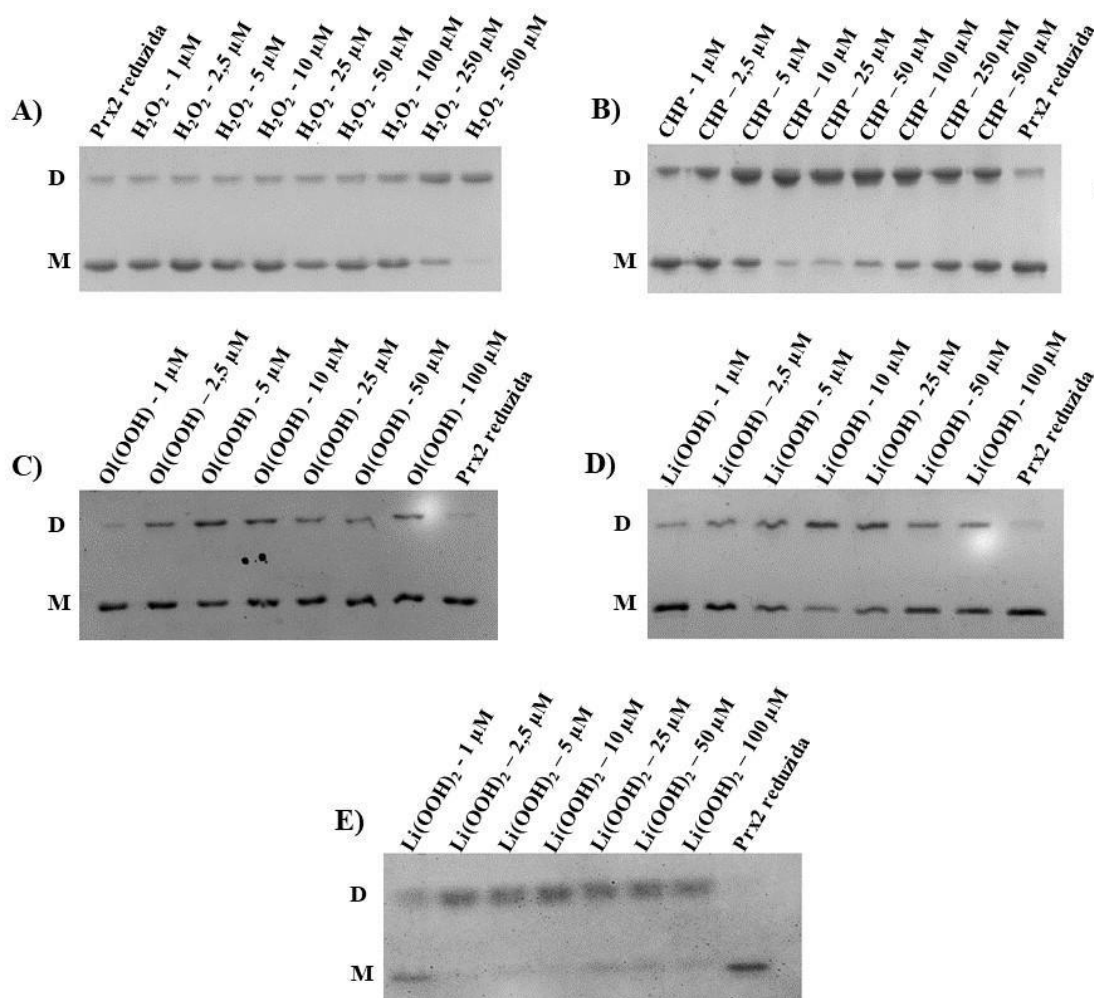


Figura 12: Resultados de ensaios de avaliação de oxidação/hiperoxidação comparativa de HsPrx2 por hidroperóxidos em por SDS-PAGE não redutor (12%). Aliquotas de 10 μM de HsPrx2 (em tampão Tris 50mM, NaCl 200mM) previamente reduzidas com 5mM de DTT, foram incubadas com concentrações crescentes de diferentes hidroperóxidos (H₂O₂, CHP, Ol-OOH, Li-OOH e Li-OOH₂) por 30s. A reação foi interrompida utilizando *stop buffer* (Tris-HCl pH 6.8, SDS 2%, NEM 50 mM, glicerol 100%, azul de bromofenol). **A)** H₂O₂; **B)** Hpx de cumeno; **C)** Hpx de ácido oleico; **D)** Hpx de ácido linoleico; **E)** Hpx de ácido linoleico (2). Foi utilizado como controle da eficiência da redução a enzima depois de reduzida e dessalinizada em coluna PD-10 (Cytiva) sem peróxido (*lane* identificada como Prx2 reduzida). Foi utilizado como corante *comassie blue*.

Neste contexto, amostras de HsPrx2 previamente reduzidas com DTT e o excesso removido por cromatografia de filtração em gel foram tradas com doses crescentes (1-100 μM) para os peróxidos de hidrogênio, CHP, Ol-OOH, Li-OOH e Li-OOH₂. Para H₂O₂ e CHP também foram utilizadas concentrações de até 500 μM (**figura 12**).

Como é possível observar nos resultados (**figura 12**) mesmo em concentrações bastante altas de peróxido de hidrogênio não há indícios de hiperoxidação, uma vez que a relação monômero para dímero foi crescente nas doses testadas. De forma contrastante é possível perceber a relação para CHP, ocorre uma diminuição de espécies monoméricas com 10 μM que volta a aumentar a partir de 50 μM, o que

indica a formação de espécies hiperoxidadas (**figura 12B**). Quando se avalia os resultados dos peróxidos derivados de lipídeos de cadeia longa Ol-OOH e Li-OOH, há um contraste em comparação com os para H_2O_2 e CHP. Para Ol-OOH o grau máximo de espécies diméricas detectas ocorre entre 5- 10 μM e concentrações superiores levam a diminuição de espécies diméricas (**figura 12C**). Para Li-OOH se observa situação semelhante nas concentrações de 5- 10 μM , no entanto concentrações superiores leva o aparecimento progressivo de espécies monoméricas sugerindo a formação de espécies hiperoxidadas (**figura 12D**). No caso do peróxido de ácido linoleico (Li-OOH₍₂₎) contendo duas peroxidações os resultados obtidos apresentaram baixa qualidade, uma vez que as bandas apresentaram aspecto difuso e não foi possível fazer inferências com relação ao aumento ou diminuição das espécies monoméricas. Contudo foi possível observar dímeros em todas as concentrações testadas, indicando que o peróxido reage com a enzima (**figura 12E**). A baixa quantidade e concentração deste hidroperóxido impediu a realização de ensaios adicionais.

De forma geral os resultados indicam fortemente que os peróxidos de lipídeos são capazes de oxidar e hiperoxidar HsPrx2 de forma mais eficiente que o H_2O_2 ou o CHP, o que indica uma maior afinidade para os peróxidos de lipídeo. Ainda, é possível que a capacidade oxidante de Li-OOH seja maior que a do Ol-OOH, uma vez que espécies monoméricas aumentam de acordo com a concentração de hidroperóxido (**figura 12C e 12D**). Neste contexto, pelos resultados a afinidade/capacidade de oxidação é distinta para cada peróxido seguindo a ordem Li-OOH > Ol-OOH > CHP > H_2O_2 , o que indica de forma geral que peróxidos orgânicos, em especial os derivados de lipídeos, são melhores substratos para HsPrx2.

4.2.2.2 Avaliação do potencial oxidante de diferentes hidroperóxidos e determinação de constantes cinéticas por meio do ensaio acoplado de oxidação de NADPH

No ensaio de NADPH foi utilizado o sistema Trx1-TrxR1 de leveduras para reduzir a HsPrx2. Apesar do sistema heterólogo possuir limitações devido ao atraso no acoplamento da HsPrx2 à Trx1, gerando uma menor precisão para o cálculo das constantes cinéticas, análises comparativas entre os oxidantes podem ser efetuadas (Truzzi *et al.*, 2019).

Para avaliar se realmente o tratamento pode levar a espécies hiperoxidadas e consequentemente a perda de atividade, previamente ao ensaio de oxidação do NADPH amostras de HsPrx2 foram incubadas com 100 μM dos diferentes peróxidos (H_2O_2 , CHP, Ol-OOH, Li-OOH; exceto Li-OOH₍₂₎ cuja concentração foi de 50 μM). Em seguida as amostras foram adicionadas as reações contendo peróxido de hidrogênio e o consumo de NADPH foi acompanhado por cinco minutos (**figura 13**). Os resultados indicam que o tratamento prévio com H_2O_2 foi o que menos influenciou na atividade peroxidásica uma vez que o consumo de NADPH foi extremamente acentuado. Por sua vez o tratamento com CHP levou a um sensível decréscimo da atividade peroxidásica quando comparado com o H_2O_2 . No caso dos peróxidos derivados de lipídeos de cadeia longa os resultados revelam que o consumo foi bastante afetado (**figura**

13), novamente sugerindo que estes peróxidos tem uma maior poder oxidante quando comparado H_2O_2 e CHP, pois a diminuição/perda da atividade peroxidásica indica que o tratamento levou a formação de um maior número de espécies hiperoxidadas na população de enzimas tratadas com os peróxidos de lipídeos.

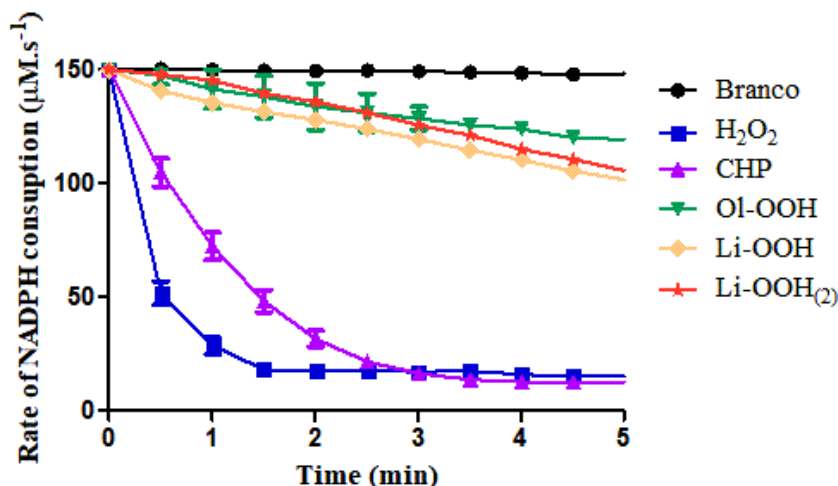


Figura 13: Ensaio de consumo de NADPH de amostras de HsPrx2 previamente tratadas com altas doses de diferentes Hpx. Para o ensaio de oxidação de NADPH foi utilizado 5 μM de HsPrx2, 10 μM de Trx1 e 0,2 μM de TrxR1 em tampão 50 mM HEPES/pH = 7,4, 1 mM de DTPA e 100 μM de azida sódica. O ensaio foi realizado incubando a enzima com 100 μM dos respectivos oxidantes evidenciados na legenda (exceto Li-OOH₍₂₎, cuja concentração foi de 50 μM) por 6 minutos, após esse período foi adicionado 100 μM de H_2O_2 e o consumo de NADPH foi monitorado espectrofotometricamente. A representação gráfica foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 4.

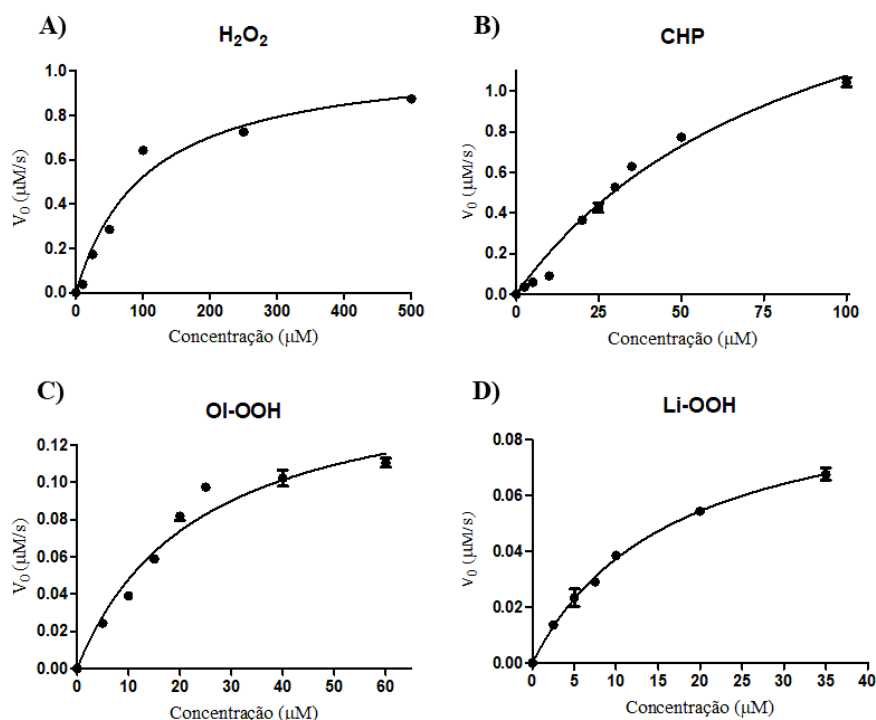


Figura 14: Gráficos de V_0 utilizados para o cálculo das constantes cinéticas utilizando baixas concentrações de hidroperóxidos. As condições experimentais foram as mesmas apresentadas na figura 14. **A)** Peróxido de hidrogênio, **B)** hidroperóxido de cumeno, **C)** hidroperóxido de ácido oleico, **D)** hidroperóxido de ácido linoleico. A representação gráfica e cálculos cinéticos foram realizados no programa GraphPad Prism 4.

Uma vez que os resultados indicam que nas condições testadas ocorre hiperoxidação foram efetuados ensaios utilizando baixas quantidades (2,5 a 35 μM – Li-OOH; 2,5 a 60 μM – Ol-OOH; 2,5 a 100 μM – CHP) de peróxidos orgânicos para a determinação de constantes cinéticas (K_M , K_{cat} e K_{cat}/K_M) (**Tabela 3 e figura 14**). Para todos os peróxidos o R^2 foi superior a 95%. Nas condições testadas o K_M variou de 16,81 M^{-1} a 23,58 M^{-1} em Hpx de lipídeos, significativamente inferior aos determinados para H_2O_2 (104,8 M^{-1}) e CHP (89,98 M^{-1}). Estes parâmetros revelam que são necessárias mais moléculas de H_2O_2 e CHP para saturar o sítio ativo da enzima quando comparado ao Li-OO e Ol-OOH (K_M). Este resultado ajuda a explicar por que os ácidos graxos aparentemente possuem maior capacidade de hiperoxidar a enzima.

Tabela 3: Parâmetros cinéticos dos hidroperóxidos determinados a partir do ensaio de NADPH.

Hidroperóxido	K_M (M^{-1})	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_M ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$V_{M\acute{a}x}$ ($\mu\text{M}/\text{s}$)	R^2 (%)
H_2O_2	104,8	0,3568	$3,4 \times 10^3$	1,070	97,4
CHP	89,98	0,6807	$7,56 \times 10^3$	2,042	98,1
Ol-OOH	23,58	0,05364	$2,27 \times 10^3$	0,1609	96,7
Li-OOH	16,81	0,03335	$1,98 \times 10^3$	0,1000	99,4

Um fator importante que pode ser observado e discutido a partir da **tabela 3** é a diferença entre Li-OOH e Ol-OOH. É provável que a quantidade de insaturações, carbonos e posição do grupamento hidroperóxido interfira na afinidade da molécula pela enzima. Deste modo, o Ol-OOH sendo um Hpx lipídico monoinsaturado possui mais liberdade de conformações, já o Li-OOH por ser poli-insaturado não. Estes dados estão em conformidade com os resultados obtidos nas simulações computacionais, visto que o Ol-OOH obteve mais *hits* que Li-OOH, como também uma distância menor da C_P .

Em seguida foram efetuados ensaios de NADPH com concentrações crescentes de hidroperóxidos (**figura 15**). Nossos resultados revelam que houve baixa perda de atividade de HsPrx2 mesmo com quantidades altas de H_2O_2 , como 750 μM e 1 mM (**figura 15 A**). Por outro lado, para concentrações de 250 μM CHP já é detectada uma inibição significativa na atividade peroxidásica de HsPrx2 (**figura 15 B**). No que tange o hidroperóxido de Li-OOH o consumo de NADPH foi bastante reduzido em relação ao H_2O_2 ou CHP (ver absorbância entre os diferentes ensaios na **figura 15**), novamente indicando que parcela significativa da população de HsPrx2 é hiperoxidada e perde atividade mesmo em concentrações de 50 μM de hidroperóxidos de lipídeos. Já o Hpx de Ol-OOH apresentou indícios de hiperoxidação a partir da concentração de 70 μM . Neste contexto, é importante salientar que neste tipo de ensaio observamos condições mais próximas às encontradas na célula, uma vez que um eventual dissulfeto formado na HsPrx2 é reduzido pelo sistema Trx, e portanto, cada ciclo de oxidação-redução possibilita a hiperoxidação da Prx (Jang *et al.*, 2004).

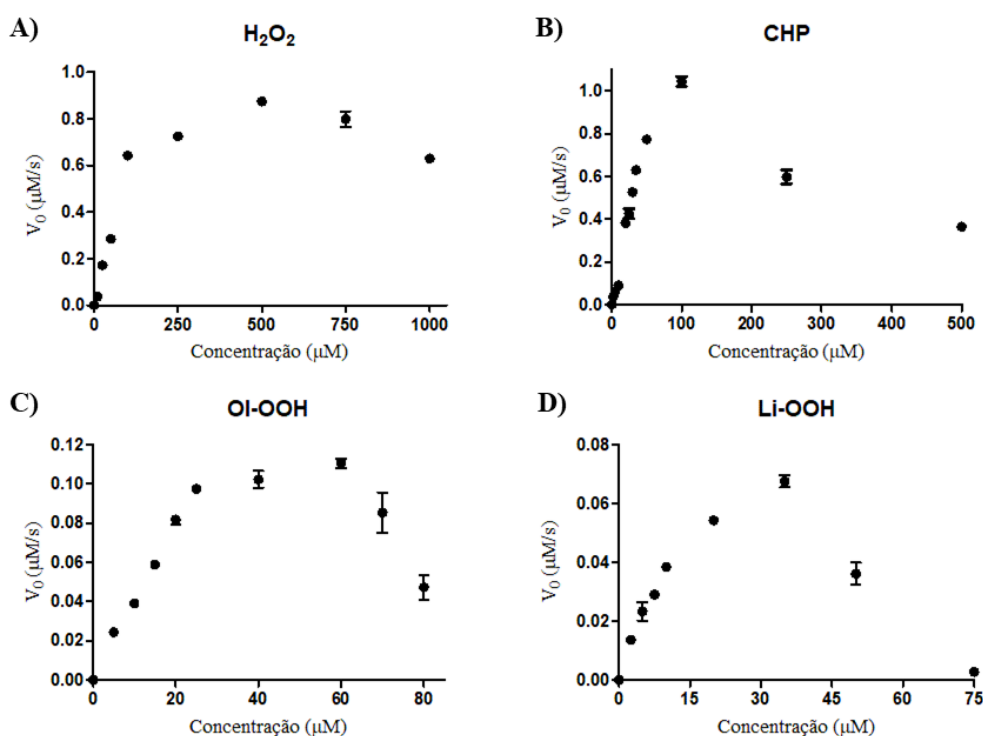


Figura 15. Inativação comparativa de HsPrx2 com concentrações crescentes de hidroperóxidos. O ensaio de NADPH (150 μM de NADPH, 5 μM de HsPrx2, 10 μM de Trx1 e 0,2 μM de TrxR1 em tampão 50 mM HEPES/pH = 7.4, 1 mM de DTPA e 100 μM de azida sódica) foi monitorado a 340 nm. No gráfico é apresentado a relação de V_0 por concentração de substrato oxidante. **A)** H_2O_2 , **B)** CHP, **C)** OI-OOH, **D)** e LI-OOH. A perda de atividade para hidroperóxidos de lipídeos foi detectada em concentrações menores que 100 μM . A representação gráfica foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 4.

4.2.2.3 Cinética de oxidação de Prx2 de humanos através de alterações da fluorescência intrínseca do triptofano em diferentes estados oxidativos

Considerando as limitações do ensaio de NADPH, uma vez que é utilizado o sistema heterólogo de levedura e que a utilização de baixas concentrações de hidroperóxidos para a obtenção de constantes leva a uma variação diminuta na absorbância, utilizamos a metodologia baseada na alteração de fluorescência intrínseca do triptofano que existe entre os diferentes estados de oxidação da enzima (Tairum *et al.*, 2016). Neste ensaio, a medição é realizada através da mudança no perfil de fluorescência dos triptofanos gerada pela formação de ácido sulfênico, ou seja, no ataque ao substrato realizado pela enzima, portanto não há o atraso gerado pelo acoplamento do sistema ScTrx1-ScTrxR1. Deste modo, foram testados os Hpx de cumeno e de oleico, visto que já foi determinado a constante para H_2O_2 como $\sim 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Carvalho *et al.*, 2017). Os experimentos foram realizados no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP) em colaboração com o grupo de pesquisa da Dra. Daniela Truzzi (IQ, USP-SP).

O perfil de fluorescência da HsPrx2 quando exposta ao oxidante produz duas hipérboles, inicialmente é possível identificar uma primeira fase de queda da intensidade da fluorescência (oxidação - formação de ácido sulfênico) e posteriormente uma segunda fase de aumento da intensidade da fluorescência que, segundo determinados autores, representa a hiperoxidação de C_P quando há aumento expressivo na

velocidade da segunda hipérbole (**figura 16A**), visto que a reação da formação de dissulfeto tende a ser constante (Parsonage *et al.*, 2015; Carvalho *et al.*, 2017). Deste modo foram obtidos dados para as duas fases, que foram analisados separadamente, como constantes de primeira ordem ou pseudo primeira ordem, respectivamente.

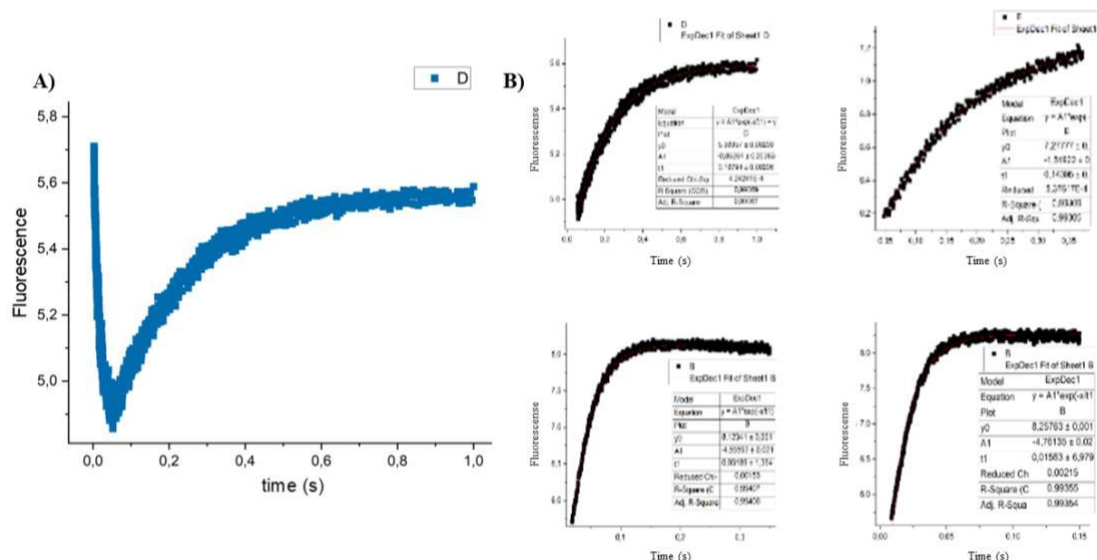


Figura 16: Alterações do perfil de fluorescência de HsPrx2 em razão do estado de oxidação. **A)** Perfil completo de fluorescência da HsPrx2 (1 µM) na concentração de 0,5 µM de Hpx de ácido oleico. **B)** Dados da fase de hiperoxidação com 1 µM de HsPrx2 com concentrações crescentes de ácido oleico, da esquerda para a direita 0,5 µM, 1 µM, 5 µM e 10 µM. Destaque para o aumento da velocidade conforme o aumento da concentração. A representação gráfica e cálculos cinéticos foram realizados com o auxílio do programa Origin 2023.

Os dados adquiridos no IQ-USP são preliminares, porém estão coerentes, e indicam claramente hiperoxidação na segunda fase, visto que com o aumento da concentração a reação fica cada vez mais rápida. O ângulo do gráfico se aproxima mais 90° e o tempo de reação diminui, como evidenciado na **figura 16**.

As constantes obtidas para a segunda fase (hiperoxidação/dissulfeto) foram de $5,75 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para Hpx de ácido oleico e de $7,75 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para Hpx de cumeno, mostrando que o Hpx de oleico é mais de $100 \times$ eficiente em hiperoxidar a enzima. A constante de hiperoxidação de H_2O_2 para HsPrx2 já foi determinada como $1,2 \times 10^4$, ou seja, na mesma ordem de grandeza que a constante obtida com CHP, contudo Peskin *et al*, 2013 demonstraram que este fenômeno ocorre com um excesso de 150 µM (mesmo resultado obtido no ensaio de NADPH **figura 14**), comparativamente maior que CHP, onde a enzima apresenta perda de atividade com um excesso de aproximadamente 50 µM. A sensibilidade à hiperoxidação apresentada pela HsPrx2 demonstra que muito provavelmente este fator é essencial para a sinalização redox por ela promovida, principalmente considerando sua localização na célula. Outras 2-Cys Prx de humanos, como HsPrx3 que está situada exclusivamente na mitocôndria, apresenta praticamente a mesma taxa de hiperoxidação com H_2O_2 , $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, contudo a constante foi obtida com excesso de 2 mM de oxidante, mostrando que enzimas semelhantes podem ter diferenças significativas em seu funcionamento, participando assim de vias de sinalização diferentes (Peskin *et al*, 2013).

Já as constantes de oxidação foram de $1,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para Hpx de cumeno e de $0,82 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para Hpx de oleico, o que é muito interessante, visto que o Hpx de oleico é um ácido graxo de cadeia longa, possuindo 18 carbonos, e mesmo assim a HsPrx2 é capaz de decompô-lo com praticamente a mesma eficiência de moléculas muito menores como H_2O_2 ou CHP.

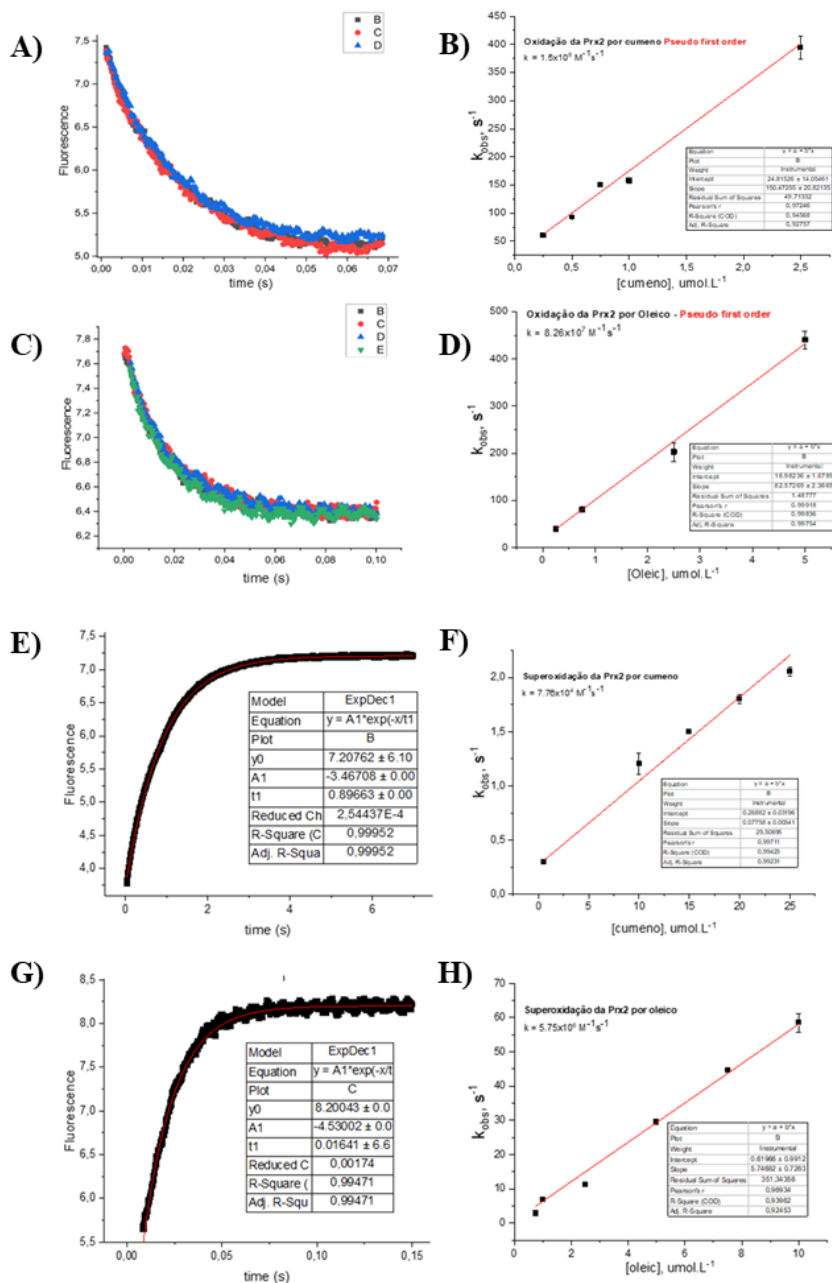


Figura 15. Perfis de alteração de fluorescência de HsPrx2 utilizados para o cálculo das constantes de oxidação e hiperoxidação. **A)** Decaimento da fluorescência para oxidação por CHP. **B)** Plotagem dos K_{obs} para diferentes concentrações (0,25, 0,5, 0,75, 1, 2,5 μM) de CHP da fase de oxidação (decaimento da fluorescência). **C)** Decaimento da fluorescência para oxidação por Ol-OOH. **D)** Plotagem K_{obs} para diferentes concentrações de Ol-OOH (0,25, 0,75, 2,5, 5 μM). **E)** Aumento da fluorescência para hiperoxidação por CHP. **F)** Plotagem dos K_{obs} para o aumento de fluorescência detectado em diferentes concentrações de CHP (0,5, 10, 15, 20, 25). **G)** Aumento da fluorescência para hiperoxidação por Ol-OOH. **H)** Plotagem dos K_{obs} para o aumento de fluorescência detectado em diferentes concentrações de Ol-OOH (0,75, 1, 2,5, 5, 7,5, 10 μM). Todos os experimentos foram feitos em triplicada. A representação gráfica e cálculos cinéticos foram realizados no programa Origin 2023.

Comparando com os dados de Carvalho *et al.*, 2017, as constantes de segunda ordem para Hpx de urato foram de $2,3 \times 10^6$, considerada baixa para uma enzima capaz de decompor substratos a $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, como o peróxido de hidrogênio. Bem como constantes de 4×10^4 para hidroperóxidos derivados de aminoácidos, proteínas e peptídeos, como hidroperóxido de N-acetil leucina (Peskin *et al.*, 2010). Estes dados podem sugerir que apesar de decompor hidroperóxidos orgânicos biológicos, a HsPrx2 não possui alta afinidade por todos. De fato, os resultados de *docking* obtidos neste trabalho mostraram que Hpx mais volumosos como os de urato, tirosina e colesterol não apresentaram bons hits. Indicando assim, que a enzima pode ter preferência por substratos com uma longa cadeia hidrofóbica.

De forma geral estes dados nos parecem muito importantes pois as diferenças nas taxas de oxidação e hiperoxidação entre os oxidantes testados são muito altas indicando fortemente que peróxidos de lipídeos sejam substratos biológicos de HsPrx2. As baixas concentrações testadas para a obtenção tanto do perfil de oxidação quanto de hiperoxidação também reforça que moléculas lipídicas com uma longa cadeia carbônica são muito mais eficientes na hiperoxidação de HsPrx2.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os dados obtidos neste trabalho nos revelam fortes indícios de que peróxidos derivados de lipídeos de cadeia longa são substratos biológicos para HsPrx2. De fato, os resultados de simulações de ancoragem molecular indicaram alta afinidade por Hpx de lipídeos, e os dados são concordantes com os ensaios bioquímicos que revelaram que a HsPrx2 é capaz de decompor eficientemente os hidroperóxidos de lipídeos. Também foi possível observar que estes substrato promovem a sua hiperoxidação em concentrações significativamente menores comparado com o substrato orgânico sintético ou o H_2O_2 . Neste contexto, apesar de iniciais, estes resultados nos parecem bastante relevantes, uma vez que estes hidroperóxidos de lipídeos são abundantes na célula em razão da grande quantidade existente de lipídeos mono e poli-insaturados nas membranas (Halliwell & Gutteridge, 2015). A capacidade destas moléculas de causar a inativação da atividade peroxidásica de Prx nos parece importante visto que em determinadas neoplasias Prx2 é superexpressa sendo considerada um fator de persistência de células tumorais. Neste contexto, o conhecimento de substratos biológicos oxidantes pode gerar reflexos não somente na ciência básica, mas também na aplicada, uma vez que existem fármacos que promovem a peroxidação lipídica (Alegria *et al.*, 2017; Reyes *et al.*, 2011). No caso de doenças neurodegenerativas onde ocorre a agregação proteica, a hiperoxidação também é interessante pois promove o *switching* funcional de peroxidase em chaperona molecular (Forshaw *et al.*, 2021; Jang *et al.*, 2004, Moon *et al.*, 2005), o que a princípio poderia auxiliar no tratamento destas doenças (Conway & Lee, 2015; Detienne *et al.*, 2018; MacDiarmid *et al.*, 2013 Trotter *et al.*, 2008). Outra questão relevante é a possível participação da HsPrx2 em vias de sinalização promovidas pelas moléculas lipídicas, visto que a Prx2 já foi relacionada a processos inflamatórios e ativação/recrutamento do sistema imunológico (Liu *et al.*, 2020; Shichita *et al.*, 2012; Tanaka *et al.*, 2020), contudo constantemente estes processos são associados à sinalização redox por H_2O_2 . O resultado deste estudo pode abrir uma nova perspectiva para a investigação da participação da HsPrx2 em outras vias regulatórias, inclusive por sua sensibilidade à hiperoxidação. Por fim cabe ressaltar que parte do trabalho foi desenvolvido sob a pandemia ou efeitos pós-pandêmicos da COVID-19, e neste sentido acreditamos que os resultados obtidos são altamente significativos, não só pela qualidade dos mesmos, mas também pelo momento em que foi desenvolvido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEGRIA, T. G.; MEIRELES, D. A.; CUSSIOL, J. R.; HUGO, M.; TRUJILLO M. *et al.* Ohr plays a central role in bacterial responses against fatty acid hydroperoxides and peroxynitrite. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 10;114(2):E132-E141, 2017.
- ANG, S. W.; RHEE, S. G.; CHANG, T. S.; JEONG, W.; CHOI, M. H. 2-Cys peroxiredoxin function in intracellular signal transduction: therapeutic implications. **Trends Mol Med.** 11(12):571-8, 2005.
- BRYK, A. H.; WIŚNIEWSKI JR. Quantitative Analysis of Human Red Blood Cell Proteome. **J Proteome Res.** 4;16(8):2752-2761, 2017.
- BRINKMANN, C.; BLOSSFELD, J.; PESCH, M.; KRONE B. *et al.* Lipid-peroxidation and peroxiredoxin-overoxidation in the erythrocytes of non-insulin-dependent type 2 diabetic men during acute exercise. **Eur J Appl Physiol.** 112(6):2277-87, 2012.
- CALDER, P.C. Fatty acids and inflammation: the cutting edge between food and pharma. **Eur J Pharmacol.** 668 1:S50-8, 2011.
- CARVALHO, H.; RECCO-PIMENTEL; SHIRLEI MARIA. A célula 4a ed. **Editora Manole**, 2019.
- CARVALHO, L. A.; TRUZZI, D. R.; FALLANI, T. S.; ALVES, S. V.; TOLEDO, J. C. *et al.* Urate hydroperoxide oxidizes human peroxiredoxin 1 and peroxiredoxin 2. **J Biol Chem.** 26;292(21):8705-8715, 2017.
- CATALA, A. Lipid Peroxidation. **IntechOpen**, London, 2012.
- CHE, X. H.; CHEN, C. L.; YE, X. L.; WENG, G. B.; GUO, X. Z.; YU, W. Y.; TAO, J.; CHEN, Y. C.; CHEN X. Dual inhibition of COX-2/5-LOX blocks colon cancer proliferation, migration and invasion in vitro. **Oncol. Rep.** 2016, 35, 1680–1688.
- CLEMENTE, S. M.; MARTÍNEZ-COSTA, O. H.; MONSALVE, M.; SAMHAN-ARIAS, A. K. Targeting Lipid Peroxidation for Cancer Treatment. **Molecules.** 5;25(21):5144, 2020.
- CONWAY, M. E.; LEE C. "The redox switch that regulates molecular chaperones" **Biomolecular Concepts**, vol. 6, no. 4, pp. 269-284, 2015.
- CRUZ-GREGORIO, A.; ARANDA-RIVERA, A. K.; ORTEGA-LOZANO, A. J.; PEDRAZA-CHAVERRI, J.; MENDOZA-HOFFMANN, F. Lipid metabolism and oxidative stress in HPV-related cancers. **Free Radic Biol Med.** 20;172:226-236, 2021.
- DAVIES, M. J. The oxidative environment and protein damage. **Biochim Biophys Acta.** 17;1703(2):93-109, 2005.
- DAVIES, M. J.; FU, S.; DEAN, R.T. Protein hydroperoxides can give rise to reactive free radicals. **Biochem J.** 15;305:643-9, 1995.
- DAY, A. M.; BROWN, J. D.; TAYLOR, S. R.; RAND, J. D.; MORGAN, B. A.; VEAL, E. A. Inactivation of a peroxiredoxin by hydrogen peroxide is critical for thioredoxin-mediated repair of oxidized proteins and cell survival. **Mol Cell.** 10;45(3):398-408, 2012.
- DETENNE, G.; DE HAES, W.; MERGAN, L.; EDWARDS, S. L.; TEMMERMAN, L.; VAN BAELE, S. Beyond ROS clearance: Peroxiredoxins in stress signaling and aging. **Ageing Res Rev.** 44:33-48, 2018.
- DISCOLA KF, OLIVEIRA MA, SILVA GM, BARCENA JA, PORRAS P, PADILLA A, NETTO LE, GUIMARÃES BG. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of glutaredoxin 2 from *Saccharomyces cerevisiae* in different oxidation states. **Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.** A61:445-7, 2005.

DOS SANTOS, M. C.; TAIRUM, C. A.; CABRERA, V. I. M.; GUIMARÃES, CA 2005 UZ A. C.; RIBEIRO L. F., *et al.* Adenanthin Is an Efficient Inhibitor of Peroxiredoxins from Pathogens, Inhibits Bacterial Growth, and Potentiates Antibiotic Activities. **Chem Res Toxicol.** 2022.

FINDLAY, V. J.; TAPIERO, H.; TOWNSEND, D. M.. Sulfiredoxin: a potential therapeutic agent?. **Biomed Pharmacother.** 59(7):374-379, 2005.

FINKEL, T. Oxidant signals and oxidative stress. **Curr Opin Cell Biol.** 15(2):247-54, 2003.

FORLI, S.; HUEY, R.; PIQUE, M. E.; SANNER, M. F.; GOODSSELL, D. S.; OLSON A. J. Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. **Nat Protoc.** 11(5):905-19, 2016.

FORSHAW, T. E.; REISZ, J. A.; NELSON, K. J.; GUMPENA, R.; LAWSON, J. R., *et al.* Specificity of Human Sulfiredoxin for Reductant and Peroxiredoxin Oligomeric State. **Antioxidants (Basel).** 2021 Jun 11;10(6):946, 2021.. doi: 10.3390/antiox10060946. PMID: 34208049; PMCID: PMC8230665.

GRIFFITHS, H. R.; DIAS, I. H.; WILLETTS, R. S.; DEVITT, A. Redox regulation of protein damage in plasma. **Redox Biol.** 20;2:430-5, 2014.

GURR, M.; HARWOOD, J. L.; FRAYN, K. M. Lipid Biochemistry: an introduction. 5th ed. **Backwell Science,** 2003.

HALL, A.; KARPLUS, P. A.; POOLE, L. B. Typical 2-Cys peroxiredoxins--structures, mechanisms and functions. **FEBS J.** 276(9):2469-77, 2009.

HALLIWELL; GUTTERIDGE. Free Radicals in Biology and Medicine 5th ed. **Oxford University Press,** 2015.

HOU, J. K.; HUANG, Y.; HE, W.; YAN, Z. W. *et al.* Adenanthin targets peroxiredoxin I/II to kill hepatocellular carcinoma cells. **Cell Death Dis.** 4;5(9):e1400, 2014.

HUSSAIN, S.; HOFSETH, L.; HARRIS, C. Radical causes of cancer. **Nat Rev Cancer** 3, 276–285, 2003.

ISHIDA, Y. I.; AKI, M.; FUJIWARA S.; NAGAHAMA, M.; OGASAWARA, Y. Peroxidatic cysteine residue of peroxiredoxin 2 separated from human red blood cells treated by tert-butyl hydroperoxide is hyperoxidized into sulfinic and sulfonic acids. **Hum Cell.** 30(4):279-289, 2017.

ISHIDA, Y. I.; ICHINOWATARI, Y.; NISHIMOTO, S.; KOIKE, S.; ISHII, K.; OGASAWARA, Y. Differential oxidation processes of peroxiredoxin 2 dependent on the reaction with several peroxides in human red blood cells. **Biochem Biophys Res Commun.** 22;518(4):685-690, 2019.

JANG, H. H.; LEE, K. O.; CHI, Y. H.; JUNG, B. G.; PARK, S. K. *et al.* Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. **Cell.** 28;117(5):625-35, 2004.

KANG, D. H.; LEE, D. J.; LEE, S. *et al.* Interaction of tankyrase and peroxiredoxin II is indispensable for the survival of colorectal cancer cells. **Nat Commun.** 8, 40, 2017.

LEE, S.; KIM, S. M.; LEE, R. T. Thioredoxin and thioredoxin target proteins: from molecular mechanisms to functional significance. **Antioxid Redox Signal.** 1;18(10):1165-207, 2013.

LEE, T. H.; JIN, J. O.; YU, K. J.; KIM, H. S.; LEE, P. C. Inhibition of peroxiredoxin 2 suppresses Wnt/ β -catenin signaling in gastric cancer. **Biochem Biophys Res Commun.** 30;512(2):250-255, 2019.

LIU, J.; SU, G.; GAO, J.; TIAN, Y.; LIU, X.; ZHANG, Z. Effects of Peroxiredoxin 2 in Neurological Disorders: A Review of its Molecular Mechanisms. **Neurochem Res.** 45(4):720-730, 2020.

LONGO, L. V. G.; BREYER, C. A.; NOVAES, G. M.; GEGEMBAUER, G. *et al.* The Human Pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* Has a Unique 1-Cys Peroxiredoxin That Localizes Both Intracellularly and at the Cell Surface. **Front Cell Infect Microbiol.** 4;10:394, 2020.

LOVATT, M.; ADNAN, K.; KOCABA, V.; DIRISAMER, M.; PEH, G. S. L.; MEHTA J. S. Peroxiredoxin-1 regulates lipid peroxidation in corneal endothelial cells. **Redox Biol.** 30:101417, 2020.

LOWTHER, W. T.; HAYNES, A. C. Reduction of cysteine sulfinic acid in eukaryotic, typical 2-Cys peroxiredoxins by sulfiredoxin. **Antioxid Redox Signal.** 1;15(1):99-109, 2011.

LU, X.; HUANG, L.; ZHANG, W.; NING, X. Tepoxalin a dual 5-LOX-COX inhibitor and erlotinib an EGFR inhibitor halts progression of gastric cancer in tumor xenograft mice. **Am. J. Transl. Res.** 10, 3847–3856, 2018.

MACDIARMID, C. W.; TAGGART, J.; KERDSOMBOON, K.; KUBISIAK, M. *et al.* Peroxiredoxin chaperone activity is critical for protein homeostasis in zinc-deficient yeast. **J Biol Chem.** 25;288(43):31313-27, 2013.

MARTINEZ, X.; KRONE, M.; ALHARBI, N.; ROSE, A. S. *et al.* Molecular Graphics: Bridging Structural Biologists and Computer Scientists. **Structure.** 5;27(11):1617-1623, 2019.

MOON, J. C.; HAH, Y. S.; KIM, W. Y.; JUNG, B. G.; JANG, H. H. *et al.* Oxidative stress-dependent structural and functional switching of a human 2-Cys peroxiredoxin isotype II that enhances HeLa cell resistance to H₂O₂-induced cell death. **J Biol Chem.** 5;280(31):28775-84, 2005.

MONTEIRO, G.; HORTA, B. B.; PIMENTA, D. C.; AUGUSTO, O.; NETTO, L. E. Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 20;104(12):4886-91, 2007.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. **Grupo A**, 2019.

OLIVEIRA, M.A.; DISCOLA, K.F.; ALVES, S.V.; MEDRANO, F.J.; GUIMARÃES, B.G.; NETTO, L.E. Insights into the specificity of thioredoxin reductase-thioredoxin interactions. A structural and functional investigation of the yeast thioredoxin system. **Biochemistry.** 49(15):3317-26. 2010.

OLIVEIRA, M.A.; DISCOLA, K.F.; ALVES, S.V.; MEDRANO, F.J.; NETTO, L.E.; GUIMARÃES, B.G. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of NADPH-dependent thioredoxin reductase I from *Saccharomyces cerevisiae*. **Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.** 61(Pt 4):387-90. 2005.

OLIVEIRA, M. A.; TAIRUM, C. A.; NETTO, L. E. S.; DE OLIVEIRA, A. L. P. *et al.* Relevance of peroxiredoxins in pathogenic microorganisms. **Appl Microbiol Biotechnol.** 105(14-15):5701-5717, 2021.

OLIVEIRA, M.A.; NETTO, L.E.; MEDRANO, F.J.; BARBOSA, J.A.; ALVES, S.V.; CUSSIOL, J.R.; GUIMARÃES, B.G. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of an oxidized state of Ohr from *Xylella fastidiosa*. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.** 60:337-9, 2004.

PARSONAGE, D.; NELSON, K. J.; FERRER-SUETA, G.; ALLEY S. *et al.* Dissecting peroxiredoxin catalysis: separating binding, peroxidation, and resolution for a bacterial AhpC. **Biochemistry.** 24;54(7):1567-75, 2015.

PESKIN, A. V.; COX, A. G.; NAGY, P.; MORGAN, P. E. *et al.* Removal of amino acid, peptide and protein hydroperoxides by reaction with peroxiredoxins 2 and 3. **Biochem J.** 1;432(2):313-21, 2010.

PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S. *et al.* UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. **J Comput Chem.** 25(13):1605-12, 2004.

- POOLE, L. B.; NELSON K. J. Distribution and Features of the Six Classes of Peroxiredoxins. **Mol Cells**. 39(1):53-9, 2016.
- POWIS, G.; KIRKPATRICK, D. L. Thioredoxin signaling as a target for cancer therapy. **Curr Opin Pharmacol**. 7(4):392-7, 2007.
- RAFF, H.; LEVITZKY, M. G. Fisiologia médica: uma abordagem integrada. (Lange). Grupo A, 2009.
- REYES, A. M.; HUGO, M.; TROSTCHANSKY, A.; CAPECE, L. *et al.* Oxidizing substrate specificity of Mycobacterium tuberculosis alkyl hydroperoxide reductase E: kinetics and mechanisms of oxidation and overoxidation. **Free Radic Biol Med**. 15;51(2):464-73, 2011.
- ROMANELLO, K. S.; TEIXEIRA, K. K. L.; SILVA, J. P.; NAGAMATSU, S. T. *et al.* Global analysis of erythroid cells redox status reveals the involvement of Prdx1 and Prdx2 in the severity of beta thalassemia. **PLoS One**. 6;13(12):0208316, 2018.
- SCHRÖDER, E.; LITTLECHILD, J. A.; LEBEDEV, A. A.; ERRINGTON, N.; VAGIN, A. A.; ISUPOV, M. N. Crystal structure of decameric 2-Cys peroxiredoxin from human erythrocytes at 1.7 Å resolution. **Structure**. 15;8(6):605-15, 2000.
- SEIFRIED, H. E.; ANDERSON, D. E.; FISHER, E. I.; MILNER, J. A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. **J Nutr Biochem**. 18(9):567-79, 2007.
- SIES, H.; BELOUSOV, V. V.; CHANDEL, N. S.; DAVIES, M. J.; JONES, D. P.; MANN, G. E.; MURPHY, M.P.; YAMAMOTO, M.; WINTERBOURN, C. Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 23(7):499-515, 2022.
- SHICHITA, T.; HASEGAWA, E.; KIMURA, A.; MORITA, R.; SAKAGUCHI, R.; TAKADA, I.; SEKIYA T. *et al.* Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. **Nat Med**. 18(6):911-7, 2012.
- SKRZYDLEWSKA, E.; SULKOWSKI, S.; KODA, M.; ZALEWSKI, B.; KANCZUGA-KODA, L.; SULKOWSKA, M. Lipid peroxidation and antioxidant status in colorectal cancer. **World J Gastroenterol**. 21;11(3):403-6, 2005.
- SU, L. J.; ZHANG, J. H.; GOMEZ, H.; MURUGAN, R.; HONG, X.; XU, D.; JIANG, F.; PENG, Z. Y. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. **Oxid Med Cell Longev**. 13;2019:5080843, 2019.
- TAIRUM, C. A.; DE OLIVEIRA, M. A.; HORTA, B. B.; ZARA F. J.; NETTO L. E. Disulfide biochemistry in 2-cys peroxiredoxin: requirement of Glu50 and Arg146 for the reduction of yeast Tsa1 by thioredoxin. **J Mol Biol**. 23;424(1-2):28-41, 2012.
- TAIRUM, C. A.; SANTOS, M. C.; BREYER, C. A.; DE OLIVEIRA, A. L. P.; CABRERA, V. I. M. *et al.* Effects of Serine or Threonine in the Active Site of Typical 2-Cys Prx on Hyperoxidation Susceptibility and on Chaperone Activity. **Antioxidants (Basel)**. 25;10(7):1032, 2021.
- TANAKA, L. Y.; OLIVEIRA, P. V.; LAURINDO F. R. Peri/Epicellular Thiol Oxidoreductases as Mediators of Extracellular Redox Signaling. **Antioxid Redox Signal**. 1;33(4):280-307, 2020.
- TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **J Comput Chem**. 31(2):455-61, 2010.
- TROTTER, E. W.; RAND, J. D.; VICKERSTAFF, J.; GRANT, C. M. The yeast Tsa1 peroxiredoxin is a ribosome-associated antioxidant. **Biochem J**. 15;412(1):73-80, 2008.

TRUZZI, D. R.; COELHO, F. R.; PAVIANI, V.; ALVES, S. V.; NETTO, L. E. S.; AUGUSTO, O. The bicarbonate/carbon dioxide pair increases hydrogen peroxide-mediated hyperoxidation of human peroxiredoxin 1. **J Biol Chem.** 20;294(38):14055-14067, 2019.

WENDEL, A.; FEUERSTEIN, S. Drug-induced lipid peroxidation in mice--I. Modulation by monooxygenase activity, glutathione and selenium status. **Biochem Pharmacol.** 15;30(18):2513-20, 1981.

WOO, H. A.; CHAE, H. Z.; HWANG, S. C.; YANG, K. S.; KANG, S. W.; KIM, K.; RHEE, S. G. Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation. **Science.** 25;300(5619):653-6, 2003.

WOOD, Z. A.; SCHRÖDER, E.; ROBIN HARRIS, J.; POOLE, L. B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. **Trends Biochem Sci.** Jan;28(1):32-40, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **International Agency for Research on Cancer**, 2020.

ZHAO, F.; WANG, Q. The protective effect of peroxiredoxin II on oxidative stress induced apoptosis in pancreatic β -cells. **Cell Biosci.** 18;2(1):22, 2012.

ZHU, H.; WANG, B.; KONG, L. Parvifoline AA Promotes Susceptibility of Hepatocarcinoma to Natural Killer Cell-Mediated Cytolysis by Targeting Peroxiredoxin. **Cell Chem Biol.** 15;26(8):1122-1132.e6, 2019.

PARECER FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Discente: GABRIELLE DO NASCIMENTO SIVIDANES

Título: "Análise comparativa da afinidade de hidroperóxidos lipídicos de relevância biológica pela peroxirredoxina 2 de humanos e sua suscetibilidade à hiperoxidação através de abordagens bioquímicas e docking molecular"

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio de Oliveira

Curso/Habilitação: Bacharelado em Ciências Biológicas/Gerenciamento Costeiro

COMISSÃO EXAMINADORA	CONCEITO
Prof. Dr. Marcos Antonio de Oliveira	APROVADO
Dr. Carlos Abrunhosa Tairum Jr	APROVADO

PARECER:

O TRABALHO DESCRITO FOI MUITO BEM ELABORADO E OS RESULTADOS MUITO EXPRESSIVOS. A APRESENTAÇÃO FOI MUITO CLARA E A DISCENTE APRESENTOU DE FORMA SEGURA DEMONSTRANDO CONHECIMENTO DO TRABALHO.

CONCEITO FINAL:

A Comissão Examinadora abaixo assinada conclui que a discente **Gabrielle do Nascimento Sividanes** obteve o seguinte conceito:



APROVADO



REPROVADO

São Vicente, 20 de janeiro de 2023.



Prof. Dr. Marcos Antonio de Oliveira



Dr. Carlos Abrunhosa Tairum Jr