



Universidade Estadual Paulista
Júlio de Mesquita Filho
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara



Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

MAICON SEGALLA PETRÔNIO

**OXIDAÇÃO DE LISOZIMA POR HALOAMINAS:
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E EFEITOS BIOLÓGICOS**

Araraquara - SP

2014

MAICON SEGALLA PETRÔNIO

**OXIDAÇÃO DE LISOZIMA POR HALOAMINAS:
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E EFEITOS BIOLÓGICOS**

Tese de Doutorado Direto no Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP - campus de Araraquara como parte dos requisitos para o Título de doutor em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes

Araraquara - SP

2014

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Petrônio, Maicon Segalla
P497o Oxidação de lisozima por haloaminas: caracterização química e efeitos biológicos / Maicon Segalla Petrônio. – Araraquara, 2014
105 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia
Orientador: Valdecir Farias Ximenes

1. Taurina mono-bromamina. 2. Lisozima. 3. HOBr. 3. Tryptofano. I. Ximenes, Valdecir Farias, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Bioquímica do Departamento de Química na Faculdade de Ciências da UNESP de Bauru.

Fomento: Bolsa CNPq – Doutorado Direto.

“O assunto mais importante do mundo pode ser simplificado até ao ponto em que todos possam apreciá-lo e compreendê-lo. Isso é – ou deveria ser – a mais elevada forma de arte”.

Charles Chaplin

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais e meu irmão, à minha namorada e às minhas avós Veneranda e Benedicta, que sempre sonharam em ter um neto “doutor”.

Obrigado por confiarem em mim, por sempre me estimularem a ir mais longe, por todo carinho, amor, respeito, força e compreensão.

Meu amor por vocês é incondicional!

Obrigado por tudo!!!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente.

Aos meus pais e irmão, que são a base da minha vida.

À minha família que esteve ao meu lado em todos os momentos.

Ao meu orientador, prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes, pela oportunidade oferecida, pela orientação, por contribuir com o meu avanço pessoal e profissional e por me ensinar o real significado do verbo orientar.

A todos os companheiros de laboratório: Luana, Carol, Fernanda, Malu, Giovana, e Bruna, muito obrigado, pelo apoio, compreensão, pela convivência, por aguentarem o meu estresse diário, pelas risadas que não foram poucas e pela ajuda.

À Ana, uma amiga, colega de laboratório e minha namorada: obrigado pela ajuda, compreensão, dedicação, pelo ótimo convívio e por todo carinho. Você foi essencial nessa longa jornada.

Aos meus amigos, Anselmo, José Atílio, Benê, Luis Octávio, Thaís, Lucas, Gabriel, Luis Gustavo, Desire, Keila, Daphne, Rodrigo, Camila, Paulo, Aline, Mateus Eiras, Vitor Xariga e Luis Antônio, muito obrigado por todo apoio, carinho, respeito e pelas muitas conversas de boteco. Vocês são especiais.

Aos professores, Luiz Marcos, Luis Vitor, Dulce Siqueira, Luis Octávio, Ian Castro, Wagner Vilegas, Cássia Regina, José Rodrigo, Rodrigo Kitagawa, Cibeles Bonacorsi, Alberto Alécio, Vanderlan Bolzani, Karina Neves, Andréia Moreno, Andrea Natri, Egberto Munhoz, Rita Ribeiro, Fernanda Lopes, José Pascoal, Fernando Fertoni, Christiane Pienna, Iracilda Zeponne, Aristeu Rosa, Neusa Carmona e Sandro Valentini, obrigado por toda atenção e ensinamentos.

Em especial ao prof. Dr. Wilton Rogério Lustri, por todos os ensinamentos e por ter despertado em mim a paixão pela Farmácia-Bioquímica.

À seção de pós-graduação, muito obrigado por me ajudar em todos os processos dessa tese. Em especial a Sônia Ornelas, Laura e Claudia pelo apoio no início dessa jornada.

Aos funcionários da UNESP de Araraquara e Bauru que de alguma forma contribuíram com este trabalho.

RESUMO

As proteínas são macromoléculas complexas de alto peso molecular e que desempenham inúmeras funções nas células. Estas funções podem ser comprometidas caso ocorram modificações nas suas estruturas. Fatores físicos e químicos podem provocar estas alterações, inclusive processos oxidativos mediados por espécies reativas de oxigênio. Entre essas modificações destaca-se a formação de proteínas amiloidais que estão relacionadas a diversas doenças como Parkinson e Alzheimer. O ácido hipocloroso (HOCl) e o ácido hipobromoso (HOBr) são oxidantes gerados pela ativação de leucócitos e há abundantes relatos de seus efeitos deletérios sobre proteínas. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo estudar as alterações estruturais e funcionais na proteína lisozima provocadas por sua oxidação através dos ácidos hipo-halosos, HOCl, HOBr e por suas haloaminas, taurina cloramina (Tau-NHCl), taurina bromamina (Tau-NHBr) e taurina dibromamina (Tau-NBr₂). A oxidação de lisozima pela adição de Tau-NHBr ou Tau-NBr₂ (excesso molar de quatro vezes) causou depleção completa da sua fluorescência intrínseca, entretanto, os ácidos HOCl e HOBr causaram a redução de apenas 40% e 50% respectivamente. Em contraste com o seu precursor, Tau-NHCl, foi incapaz de oxidar a lisozima. As haloaminas foram cerca de duas vezes mais eficazes como inibidores da atividade enzimática do que os seus precursores HOCl e HOBr. Por outro lado, os ácidos foram mais eficazes na promoção da agregação de lisozima, efeito este, evidenciado pelo aumento da turbidez, espalhamento de luz e anisotropia de fluorescência da proteína. Os agregados apresentaram propriedades espectroscópicas que sugeriram a formação de estruturas amiloidais, como foi observado pelo ensaio de Tioflavina T. Em contraste com os ácidos hipo-halosos, as haloaminas foram inibidores parciais da formação de proteínas amiloides. Em conclusão, estes resultados sugerem que HOBr, assim como suas haloaminas Tau-NHBr e Tau-NBr₂, são seletivas no que diz respeito a oxidação de resíduos de triptofano em proteínas. Esta particularidade afeta diretamente a atividade enzimática da lisozima. Por outro lado, HOCl e HOBr foram mais eficazes na indução da agregação da proteína. Em conjunto, estes resultados sugerem potenciais efeitos deletérios desses oxidantes endógenos e que podem estar associados a doenças de cunho inflamatório e degenerativo.

ABSTRACT

Proteins are complex macromolecules of high molecular weight and performing numerous functions in cells. These functions may be compromised if there are any modifications in their structures. Physical and chemical factors may cause these changes, including oxidative processes mediated by reactive oxygen species. Among these changes was the formation of amyloid proteins that are related to various diseases such as Parkinson's and Alzheimer's. The hypochlorous acid (HOCl) and hypobromous acid (HOBr) are oxidants generated by the activation of leukocytes and there are abundant reports of their deleterious effects on proteins. In this context this work aimed to study the structural and functional changes in the protein lysozyme caused by their oxidation through hypohalous acids, HOCl, HOBr, and haloamines taurine Chloramine (Tau-NHCl), taurine monobromamine (Tau-NHBr) and taurine dibromamine (Tau-NBr₂). The oxidation of lysozyme by addition of Tau-NHBr or Tau-NBr₂ (molar excess of four times) caused complete depletion of its intrinsic fluorescence, however, the acids HOCl and HOBr caused a reduction of only 40% and 50% respectively. In contrast to its precursor, Tau-NHCl was unable to oxidise the lysozyme. The haloamines were about twice as effective inhibitors of enzyme activity than their precursors HOCl and HOBr. On the other hand, the acids were more effective in promoting aggregation of lysozyme, this effect, evidenced by increased turbidity, light scattering and fluorescence anisotropy of the protein. The aggregates presented spectroscopic properties that suggested the formation of amyloid structures, as noted by thioflavin t test. In contrast with hypohalous acids, the haloamines were partial formation of protein inhibitors became. In conclusion, these results suggest that HOBr, like their haloamines Tau-NHBr and Tau-NBr₂, are selective with regard to oxidation of tryptophan residues in proteins. This particularity directly affects enzyme activity of lysozyme. On the other hand, HOCl and HOBr were more effective in inducing protein aggregation. Together, these findings suggest potential deleterious effects of endogenous oxidants and that can be associated with inflammatory and degenerative diseases.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$\Delta A/min$	Variação de absorbância por Tempo
ANS	Sal de Magnésio de 8-anilino-1-naftalenossulfonato
ATCC4698	Células Liofilizadas de <i>Micrococcus lysodeikticus</i>
CUP1	Cobre Metalotioneína
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta eficiência
Dioia	Dioxindolalanina
DNPH	2,4-dinitrofenil-hidrazina
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
DUOX	Dual Oxidase
EPO	Peroxidase Eosinofílica
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FMK	Formilquinurenina
HSF1	Heat Shock Factor 1
JAK	Janus Kinase
Kyn	Kinurenina
MAPKs	Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos
MPO	Mieloperoxidase
NFK	N-formilquinurenina
NADP	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzido
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzido
NOX	NADPH oxidase
Oia	Oxindolalanina
PIC	1,2,3,3a,8,8a-hexahidro-3a-hidroxi-pirrólo[2,3-b]-indol-2-ácido carboxílico
p/v	Peso/Volume
PBS	Phosphate Buffer Saline (Salina tamponada com fosfato)
RAC	Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SOD	Superóxido Dismutase
STAT	Transdução de Sinal e Ativador de Transcrição
STI	Inibidor de Tripsina Soja

Trp	Triptofano
Tau-NHCl	Taurina Cloramina
Tau-NBr₂	Taurina Di-Bromamina
Tau-NHBr	Taurina mono-Bromamina
TCA	Ácido Tricloroácetico
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
v/v	Volume/Volume
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do aminoácido taurina.....	26
Figura 2: Formação das Haloaminas <i>in vivo</i>	29
Figura 3: Estrutura 3D da lisozima.....	29
Figura 4: Esquema representativo do <i>folding</i> proteico através do funil energético proposto por Jahn e Radford.....	33
Figura 5: Ensaio de quimiluminescência da oxidação do triptofano: (a, b) ácido hipobromoso (HOBr) versus o ácido hipocloroso (HOCl) ^{**} ($p < 0,01$) de acordo com o teste t. A reação consistiu em 0,5 mM triptofano e 0,5 mM de oxidante em PBS, pH 7,4, a 25 ° C. (c) Efeito da concentração de HOBr na emissão de luz. A concentração de triptofano foi 0,5 mM. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes.....	47
Figura 6: Perfil cinético da oxidação do triptofano. Ácido hipobromoso (HOBr) versus ácido hipocloroso (HOCl). (a) O consumo do triptofano foi monitorado através da fluorescência intrínseca (λ_{ex} 295 nm / λ_{em} 360 nm). (b) Formação de produtos de oxidação (λ_{ex} 340 nm / λ_{em} 440 nm). A mistura de reação consistiu de 0,5 mM triptofano e 0,5 mM de oxidantes em PBS, pH 7,4, a 25°C.....	48
Figura 7: Cromatogramas e espectros UV-Vis dos produtos de oxidação do triptofano: ácido hipocloroso (HOCl) versus ácido hipobromoso (HOBr). A mistura de reação foi injetada no CLAE após 5 minutos do início da reação. As misturas de reação consistiram em 0,5 mM de triptofano e 0,5 mM de oxidante em PBS pH 7,4, a 25°C.....	49
Figura 8: Estrutura dos derivados indólicos.....	50

Figura 9: Oxidação das biomoléculas indólicas com ácido hipobromoso. (a) emissão de luz. (b) cromatografia líquida de alta eficiência após a oxidação do *N*-acetiltryptofano: (i) *N*-acetiltryptofano, (ii) oxidação do produto de *N*-acetiltryptofano. A reação consistiu em 0,5 mM de derivados de indólicos e 0,5 mM de ácido hipobromoso em PBS, pH 7,4, a 25°C.....51

Figura 10: Efeito do aminoácido adicional na emissão de luz a partir da oxidação do tryptofano. (a) Efeitos da taurina e alanina na emissão de luz. (b) Oxidação do tryptofano por HOBr na presença de taurina e alanina respectivamente. ***($p < 0,001$) quando comparados com Trp + taurina usando ANOVA. (c) Oxidação do tryptofano por HOCl na presença de taurina e alanina respectivamente. As misturas de reação consistiram em 0,5 mM de tryptofano na ausência ou presença de 0,5 mM de alanina ou taurina e 0,5 mM dos oxidantes *($p < 0,05$) quando comparado com Trp usando ANOVA. A reação foi desencadeada por adição dos oxidantes através do injetor automático do luminômetro. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes.....52

Figura 11: Quimiluminescência da oxidação do tryptofano: haloaminas x HOBr. a) espectro ultravioleta-visível de Tau-NHBr (i), (b) Tau-NHBr + Tau-NBr₂, (ii) (c) Tau-NBr₂ (iii) (d, e) quimiluminescência da oxidação do tryptofano. A reação foi desencadeada por adição dos oxidantes. **($p < 0,01$) quando comparado com (i), ***($p < 0,001$) e quando comparados com todos os outros grupos usando ANOVA. As misturas reacionais consistiram em: 0,5 mM de tryptofano e 0,5 mM dos oxidantes. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes.....53

Figura 12: Quimiluminescência da oxidação da albumina bovina. A mistura reacional consistiu em 50 μ M de albumina e 2 mM dos oxidantes. A reação foi desencadeada pela adição de oxidante através do injetor do luminômetro.....54

Figura 13: Proposta do mecanismo de oxidação.....55

Figura 14: Depleção da banda de emissão do tryptofano a) Depleção da fluorescência intrínseca da lisozima pelos ácidos hipo-halososo e haloaminas b) Oxidação relativa de lisozima pelos ácidos-halosos e haloaminas. ***($p < 0,001$) quando comparados com o

Controle ou conforme indicado. **c)** Cinética de oxidação da lisozima e depleção da fluorescência intrínseca. As reações consistiram em 5 μ M de lisozima e 20 μ M de oxidantes em tampão de fosfato 10 mM, pH 7,0 em 25°C. Os espectros foram realizados em cinética de 5 minutos após a adição dos oxidantes (λ_{ex} 295 nm / λ_{em} 344 nm). Os resultados são apresentados como a média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes.....57

Figura 15: Inibição da atividade enzimática de lisozima provocado pela oxidação com os ácidos hipohalosos e haloaminas: **a)** cinética de hidrólise das ligações glicosídicas na ausência e na presença de oxidantes **b)** perda relativa de atividade enzimática. * ($p < 0,05$) quando comparado com Lys + HOCl, **($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$) quando comparado com Lys ou conforme indicado usando ANOVA. As misturas reacionais consistiram em 5 μ M de lisozima e 20 μ M de oxidantes em tampão de fosfato 10 mM, pH 7,4 a 25°C. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes.....58

Figura 16: Produção de grupos carbonílicos na oxidação da lisozima. As reações consistiram em 50 μ M de lisozima e 200 μ M de oxidantes em tampão fosfato 10 mM, pH 7,0 a 25°C. Os grupos carbonílicos foram mensurados como derivados de hidrazona em DNPH e expressos em nmol/mg de proteína. *($P < 0.05$), **($P < 0.01$) e ***($P < 0.001$) quando comparados com Lys ou conforme indicado usando ANOVA. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes.....59

Figura 17: Depleção da banda intrínseca no UV-vis de lisozima e espalhamento de luz. **a)** oxidação de lisozima por Tau-NHBr **b)** oxidação de lisozima por HOBr **c)** espalhamento de luz da lisozima após a oxidação. As misturas reacionais consistiram em 5 μ M lisozima e 20 μ M oxidantes em tampão fosfato 10 mM, pH 7,0 a 25°C. Os espectros foram realizados em intervalos de 1 min.....60

Figura 18: Aumento da fluorescência do ANS na lisozima provocada pela oxidação: **a)** medidas em tampão glicina pH 7,0 **b)** medidas em tampão glicina pH 9,2. **c)** efeitos da sonda ANS em pH 9,2 na oxidação da lisozima ***($p < 0,001$) quando comparados com Lys ou conforme indicado usando ANOVA. As misturas reacionais consistiram em 5 μ M de lisozima,

20 μM e 90 μM de ANS em tampão fosfato 10 mM pH 7,0. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes.....62

Figura 19: Aumento da anisotropia lisozima-ANS provocado pela oxidação $^{***}(P<0.001)$ quando comparados com todos os grupos usando ANOVA. As misturas reacionais consistiram de 5 μM de lisozima, 20 μM de oxidantes e 90 μM ANS em pH 9,2. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes.....63

Figura 20: Espectros de emissão de fluorescência de Tioflavina T: **a)** efeito do SDS sobre a lisozima em pH 9,2. **b)** efeito do SDS sobre a lisozima oxidada com os ácidos HOCl e HOBr e as haloaminas Tau-NHBr e Tau-NHBr₂ em pH 9,2. **c)** efeito na fluorescência de Tioflavina T na lisozima quando oxidada em pH 9,2. $^{***}(P<0.001)$ quando comparado os outros grupos usando ANOVA. As reações foram feitas com 50 μM de lisozima para 200 μM de oxidantes em tampão fosfato 10 mM pH 7,0, incubados por 30 minutos em temperatura ambiente sob leve agitação.....64

Figura 21: Efeito de SDS sobre o espectro de emissão de fluorescência de Tioflavina T **a)** Oxidação de lisozima por HOCl e Tau-NHBr na formação de fibras amiloides. **b)** Adição de SDS após a oxidação. A lisozima foi oxidada em pH 7,0 e diluiu-se 10 vezes em tampão de glicina a pH 9,2 com 300 μM de SDS.....65

SUMÁRIO

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Espécies reativas de oxigênio: geração, neutralização e doenças.....	19
1.2 Oxidação de proteínas por oxidantes endógenos e exógenos.....	23
1.3 Oxidação de proteínas por HOCl e HOBr.....	24
1.4 Aminoácido taurina.....	26
1.5 Formação das haloaminas Tau-NHCl e Tau-NHBr.....	28
1.6 Lisozima.....	29
1.7 Formação de proteínas amilóides.....	31
1.8 Formação de agregados proteicos mediados por oxidação.....	34
2. OBJETIVOS.....	36
2.1 Objetivos específicos.....	37
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1 Reagentes e soluções.....	39
3.2 Preparação e análise de taurina cloramina (Tau-NHCl), taurina mono-bromamina (Tau-NHBr) e di-bromamina (Tau-NBr ₂).....	39
3.3 Estudos de quimiluminescência do triptofano.....	40
3.4 Estudos de quimiluminescência de derivados indólicos.....	40
3.5 Estudos de quimiluminescência dos aminoácidos taurina e alanina.....	40
3.6 Estudos de quimiluminescência da oxidação do triptofano pelas haloaminas.....	40
3.7 Estudos de Fluorescência da oxidação do triptofano.....	41
3.8 Estudos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	41
3.9 Estudos de Fluorescência intrínseca.....	41
3.10 Estudos de Fluorescência extrínseca.....	41
3.11 Estudos de Espalhamento de luz.....	42
3.12 Estudos de Anisotropia.....	42
3.13 Ensaio de agregação.....	43
3.14 Determinação da concentração relativa de grupos carbonílicos nas proteínas.....	43
3.15 Determinação da Atividade Enzimática da lisozima.....	44
3.16 Análise estatística.....	44
4. RESULTADOS.....	45

4.1 Estudos da oxidação do triptofano.....	46
4.1.1 Avaliação da quimiluminescência produzida durante a oxidação de triptofano.....	46
4.1.2 Estudos de fluorescência da oxidação do triptofano.....	47
4.1.3 Análises da oxidação de triptofano por cromatografia líquida de alta eficiência.....	48
4.1.4 Estudos da oxidação de outros compostos.....	50
4.1.5 Avaliação do efeito da adição de taurina e alanina na oxidação do triptofano.....	51
4.1.6 Avaliação da quimiluminescência na oxidação de triptofano pelas haloaminas.....	52
4.1.7 Avaliação da quimiluminescência na oxidação de resíduos de triptofano na proteína albumina bovina.....	54
4.1.8 Proposta de mecanismo de oxidação do triptofano.....	54
4.2 Estudos de oxidação da lisozima.....	56
4.2.1 Avaliação da fluorescência na oxidação de lisozima.....	56
4.2.2 Estudos de inibição da atividade enzimática da lisozima.....	57
4.2.3 Avaliação da concentração relativa de grupos carbonílicos.....	58
4.2.4 Avaliação de alterações estruturais por espalhamento de luz e fluorescência ANS.....	59
4.2.5 Avaliação da anisotropia de fluorescência da lisozima oxidada.....	62
4.2.6 Verificação da formação de fibras amiloidais: Tioflavina T.....	63
5. DISCUSSÃO.....	66
5.1 Estudos de oxidação do triptofano.....	67
5.2 Estudo de oxidação da lisozima.....	69
6. CONCLUSÃO.....	74
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

Capítulo 2

Artigo 1: Light emission from tryptophan oxidation by hypobromous acid.....92

Artigo 2: Effects of oxidation of lysozyme by hypohalous acids and haloamines on enzymatic activity and aggregation.....99

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO

1.1 Espécies reativas de oxigênio: geração, neutralização e doenças

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais são potencialmente deletérias aos organismos vivos, é um processo normal. Normal no sentido de ser inevitável e é por esta razão que os organismos dispõem de mecanismos de defesas capazes de neutralizar os seus efeitos e promover o equilíbrio redox celular (BARREIROS e DAVID, 2006). No entanto, esse equilíbrio pode ser quebrado pelo excesso de EROs produzidas ou diminuição das defesas antioxidantes, o que caracteriza o estresse oxidativo (FRIDOVICH, 1997, SCANDALIOS, 2002). Este processo deletério pode levar a danos em estruturas celulares e em seus constituintes, incluindo lipídeos de membranas, proteínas e DNA (DROGE, 2002). Entre as patologias em que há evidências concretas do envolvimento de EROs incluem-se: artrite reumatoide, câncer, aterosclerose, doenças autoimunes, doença de Parkinson, Alzheimer, entre outras (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990, HALLIWELL, 1992; NOHL, 1993). Peroxidação lipídica, danos em DNA e proteínas também são características do processo de envelhecimento (HARMAN, 1956).

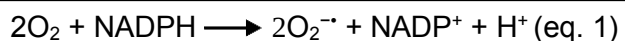
Entre os mecanismos de geração endógena de oxidantes destaca-se o vazamento mitocondrial de radical ânion superóxido $O_2^{\cdot-}$. De fato, de 2 a 5% do oxigênio consumido na cadeia respiratória é transformado em ($O_2^{\cdot-}$) (TURRENS e BOVERIS, 1980). Na cadeia de transporte de elétrons, os locais para os quais há evidências de formação de $O_2^{\cdot-}$ são: NADH desidrogenase (BOVERIS e CHANCE, 1973), coenzima Q (TURRENS e BOVERIS, 1980) e desidrogenases matriciais (STARKOV e FISKUM, 2002). A geração de $O_2^{\cdot-}$ através de NADPH desidrogenase tem grande importância fisiopatológica, tendo sido correlacionada com doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson (SINGER e RAMSAY, 1990). O vazamento mitocondrial de $O_2^{\cdot-}$ está relacionado com a síndrome do olho seco e degeneração macular (ONOUCHI et al., 2012). A destruição da barreira hemato-retiniana ocorre no início da retinopatia diabética conduzindo ao derrame vascular e edema na retina. Esse efeito ocorre devido à elevação dos níveis do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) causado pelo excesso de $O_2^{\cdot-}$ (EL-REMESSY et al., 2013). Pacientes com diabetes tipo 2 possuem níveis elevados de açúcar no sangue propiciando o aumento de produção de $O_2^{\cdot-}$ via vazamento mitocondrial (TURRENS, 2003).

Ao contrário do vazamento mitocondrial, que pode ser considerado um “efeito colateral” do processo de produção de energia pela cadeia de transporte de elétrons, a produção de $O_2^{\cdot-}$ é um processo fisiológico que ocorre em diferentes células quando relacionado ao complexo NADPH oxidase. Por exemplo, em fagócitos, durante o processo inflamatório para combater bactérias, fungos e vírus (BARREIROS et al., 2006). As células

endoteliais e células do músculo liso, também são capazes de produzir $O_2^{\cdot-}$, mas elas os fazem em concentrações menores (FRIDOVICH, 2001).

Além da função microbicida, existem evidências do papel do $O_2^{\cdot-}$ e de seu produto o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), como moléculas de sinalização celular. Na bactéria *Escherichia coli* o $O_2^{\cdot-}$ atua em fatores de transcrição de proteínas (WEISS, 1991). Em outros organismos o $O_2^{\cdot-}$ pode participar na modulação e sinalização de Ca^{2+} intracelular e fosforilação de proteínas. Além disso, pode funcionar como regulador de diversos processos biológicos, incluindo a expressão gênica, o crescimento e diferenciação celular, quimiotaxia e apoptose (MANZANO et al., 2000). O H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$ são potentes indutores de vias de sinalização em condições oxidativas, entre elas estão as vias de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e transdutores de sinais e ativadores de transcrição Janus quinase (JAK/STAT). O $O_2^{\cdot-}$ e o H_2O_2 podem levar à morte celular através de vias de sinalização das MAPKs e JAK/STAT (MOSLEHI e YAZDANPARAST, 2013). Em *Saccharomyces cerevisiae* a HSF1 (*Heat shock Factor 1*) sofre fosforilação que ativa a transcrição de CUP1 (cobre metalotioneína) para a proteção celular em resposta a formação de $O_2^{\cdot-}$ (HONG et al., 2013).

O complexo multienzimático NADPH oxidases (NOX) constitui um grupo de enzimas transmembranas que catalisam a transferência de elétrons através da membrana celular (BABIOR, 1999, BEDARD e KRAUSE, 2007) (Equação 1).



As NOX são compostas por seis subunidades: duas proteínas transmembrana ($p22^{phox}$ e $gp91^{phox}/NOX2$; essa última codificada pelo gene *CYBB*) que formam o flavocitocromo b558 e são formadoras do sítio catalítico da enzima (JOHNSON et al., 2002). As outras subunidades constituem-se de três proteínas citosólicas ($p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $p40^{phox}$ – *phox* de “*phagocyte oxidase*”) e uma GTPase (Rac1 ou Rac2) (EL-BENNA et al., 2005, GROEMPING e RITTINGER, 2005).

A expressão de NOX tem sido observada em diversos tecidos/células e seis homólogos da $gp91^{phox}/NOX2$ foram encontrados em células não fagocíticas e denominados NOX1, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 e DUOX2. As proteínas DUOX possuem dois domínios: um na extremidade C-terminal semelhante a NOX2 e o outro na extremidade N-terminal referente ao domínio homólogo à peroxidase (LAMBETH, 2004). Entre os tecidos e células que expressam NOX incluem-se cólon, endotélio, útero, placenta, músculo liso, próstata, osteoclastos (NOX1), células mielóides e linfóides, tecido vascular e células fagocíticas (NOX2), células fetais e tecido auricular (NOX3), rins, tecido fetal, endotélio,

fibroblastos, queratinócitos, células renais, vasculares, osteoblastos e placenta (NOX4), tecido linfóide, testículos, próstata, ovários, pâncreas, placenta (NOX5), tireóide, epitélio respiratório, epitélio lingual, cerebelo, testículos (DUOX1) e tireóide, glândulas retais e salivarias, epitélio gastrointestinal, epitélio respiratório, útero, vesícula biliar (DUOX2) (QUINN et al., 2006, BEDARD e KRAUSE, 2007).

O $O_2^{\cdot-}$ é considerado uma EROs primária, pois é a partir de sua dismutação que é produzido o H_2O_2 via ação catalítica da enzima superóxido dismutase (SOD) (eq.2). A SOD tem como função proteger as células da ação danosa do $O_2^{\cdot-}$ (ZELCO et al., 2002). A enzima SOD possui diferentes isoformas, sendo elas: CuZn-SOD (SOD1), que é um homodímero presente nos espaços intracelulares do citoplasma. A Mn-SOD (SOD2) que contém um peptídeo líder que tem como alvos enzimas que contém manganês. Esta enzima encontrada exclusivamente na mitocôndria é essencial para os organismos aeróbios. A enzima EC-SOD (SOD3) é um homotetrâmero contendo um peptídeo que a direciona para os espaços extracelulares. Esta enzima foi detectada no plasma, na linfa, nos fluídos cérebros espinhais e astrócitos (ZELCO et al., 2002, MIAO et al., 2009).

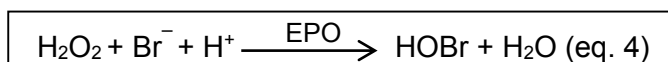
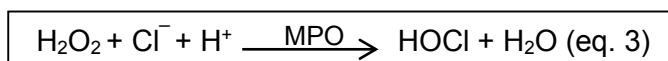


O H_2O_2 possui uma característica fundamental que o distingue do $O_2^{\cdot-}$. Trata-se de sua maior estabilidade e lipofilicidade, uma vez que é uma molécula não radicalar e sem carga elétrica. Isso a torna capaz de difundir pela célula alcançando sítios distantes do local onde é formada. Existem claras evidências do papel do H_2O_2 na sinalização celular, como exemplo: transdução de sinal, fatores de crescimento, sinalização de citocinas, neurotransmissores, fosfatases e canais de íons (STONE e YANG, 2006).

Destacamos aqui as enzimas mieloperoxidase (MPO) e peroxidase de eosinófilos (EPO), as quais estão presentes em células fagocíticas, e respectivamente em neutrófilos e eosinófilos (AGOSTI et al., 1987, PODREZ et al., 2000). A enzima mieloperoxidase (MPO) pode compor até 5% do peso seco dos neutrófilos (KLEBANOF, 2005). As enzimas EPO e MPO agem como catalizadores na reação de formação de HOCl e HOBr utilizando o peróxido de hidrogênio como substrato (equação 3 e 4). Se por um lado a produção de HOCl e HOBr é fundamental para o mecanismo de defesa imune inata, por outro lado são incontáveis as evidências descritas na literatura científica as quais demonstram claramente que os mesmos estão envolvidos nos processos oxidativos que permeiam os danos tissulares em processos inflamatórios crônicos e degenerativos (PRUTZ, 1999, PATINSON

e DAVIES, 2001). Um ponto fundamental neste contexto é o fato de que a MPO é a única enzima no organismo humano capaz de produzir o HOCl, e esse por sua vez, é capaz de levar à cloração de resíduos de tirosina em proteínas (MOHIUDDIN et al., 2006). Assim, encontrar 3-clorotirosina em material biológico é uma prova inequívoca da importância da MPO na gênese e/ou progressão de doenças de cunho inflamatório e/ou degenerativo (ROMAN et al., 2007). A importância da enzima mieloperoxidase foi comprovada, pois demonstrou-se que o nível sérico de MPO pode ser um biomarcador preditivo de acidentes cardiovasculares, inclusive quando o nível de troponina sérica está dentro do valor normal (BALDUS et al., 2003). Estes achados reforçam a importância dessa enzima na gênese de processos inflamatórios crônicos. Talvez um dos melhores exemplos disso seja o envolvimento desse oxidante na aterogênese. A MPO é uma enzima chave neste processo, onde através da geração de ácido hipocloroso pode iniciar processos oxidativos como a geração da 3-clorotirosina, que tem sido referida como uma “impressão digital” do envolvimento da MPO em processos patológicos assim como foi citado acima (BALDUS et al., 2003). A enzima MPO tem sido descrita como um biomarcador precoce de inflamação associada aos riscos de doenças cardiovasculares em crianças obesas na pré-puberdade (OLZA et al., 2012). Na medicina veterinária, a MPO tem sido reportada como um importante biomarcador de doenças gastrointestinais, doenças pulmonares e doenças ortopédicas. Recentemente tem sido citada como um importante biomarcador de infecção articular no líquido sinovial de equinos (WAUTERS et al., 2013). A enzima EPO tem papel importante na progressão de doenças inflamatórias. Os níveis elevados de EPO e resíduos de 3-Bromotirosina foram detectados na expectoração de pacientes com asma (PATINSON e DAVIES, 2004).

Produção dos agentes microbicidas ácido hipocloroso (eq. 3) e ácido hipobromoso (eq. 4).



O oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) é uma forma eletronicamente excitada de oxigênio molecular e tem como principal característica o seu poder oxidante. A geração de $^1\text{O}_2$ tem sido evidenciada no meio biológico através de reações que envolvem enzimas, tais como: lactoperoxidase (KANOFISKY et al., 1983), cloroperoxidase (KANOFISKY et al., 1984), mieloperoxidase (KANOFISKY et al., 1985) e eosinófilos humanos (KANOFISKY et al., 1988). O seu papel como oxidante endógeno foi evidenciado por Balasubramanian e colaboradores

em 1990, quando foi demonstrado que o $^1\text{O}_2$ pode reagir com proteínas do cristalino do olho, resultando em modificação estrutural que pode ser importante no desenvolvimento de catarata. Recentemente $^1\text{O}_2$ tem sido associado como modulador da resposta apoptótica em células tumorais malignas. A interação entre HOCl e H_2O_2 resulta na formação de oxigênio singlete que inativa a enzima superóxido dismutase (SOD) sobre a superfície das células tumorais, e conseqüentemente aumenta a apoptose mediada pelo HOCl através do aumento da concentração de ânion superóxido (BAUER, 2013).

1.2 Oxidação de proteínas por oxidantes endógenos e exógenos

As EROs são moléculas instáveis e extremamente reativas sendo capazes de modificar outras moléculas com as quais interagem. Entre as biomoléculas susceptíveis as EROs incluem-se proteínas, carboidratos, lipídeos e ácido nucleicos (SILVA e GONÇALVES, 2010).

As proteínas podem sofrer modificações através de diversos agentes oxidantes, tais como fumaça de cigarro (EISERICH et al., 1995), EROs (DEAN et al., 1997), cátions metálicos (Fe^{2+} , Cu^+) (BERLETT e STADTMAN, 1997), radiação ultravioleta (BALASUBRAMANIAN e ZIGLER, 1990), ozônio (O_3) (CROSS et al., 1992). Agentes químicos (CCl_4 e acetaminofeno) (TIRMENSTEIN e NELSON, 1990, HARTLEY et al., 1997), xenobióticos (paraquat) (KORBASHI et al., 1986), H_2O_2 (GARRISON et al., 1962), HOCl e HOBr (HEINECKE et al., 1994). Irradiação na presença de oxigênio (DAVIES, 1987), produtos de peroxidação lipídica (HABERLAND et al., 1988), enzimas oxidoredutases (FUCCI et al., 1983) e fármacos (VASCONCELOS et al., 2007).

As EROs ou metabólitos secundários gerados através do estresse oxidativo causam modificações covalentes nas estruturas das proteínas (ULRICH e CERAMI, 2001). Essas modificações incluem a oxidação das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos em proteínas, fragmentações, modificações na conformação e modificações na hidrofobicidade através da exposição de aminoácidos hidrofóbicos. Todas essas mudanças podem acarretar na perda da estrutura ou inativação enzimática das proteínas (HAWKINS e DAVIES, 2001).

As modificações nas estruturas proteicas podem resultar na formação de produtos carbonílicos, que são usados como indicadores de estresse oxidativo e de doenças derivadas do metabolismo proteico (DONNE et al., 2003). Os produtos carbonílicos são formados quando ocorre fragmentação das cadeias laterais e oxidação dos aminoácidos treonina, prolina, arginina e lisina (BERLETT e STADTMAN, 1997). Desta forma, abstrai-se o $\text{H}^\bullet$ do carbono α (alfa) formando um radical em uma ligação peptídica (VASCONCELOS

et al., 2007). Os produtos carbonílicos, uma vez formados podem ser neutralizados pelas proteases. As proteínas podem conter sítios de ligações com metais que são especialmente susceptíveis a reações reversíveis de oxidação e redução. Através das ligações metais-proteínas surgem uma sequência de sinais que podem ser reconhecidos por proteases celulares específicas que degradam as proteínas carboniladas (VASCONCELOS et al., 2007).

Durante o processo de peroxidação lipídica são formados os produtos citotóxicos 4-hidroxinonenal, malondialdeído e 2-propenal que interagem através de reações secundárias com resíduos de cisteína, histidina e lisina formando os compostos carbonilados (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

As reações de açúcares redutores ou os seus produtos de oxidação (glicoxidação) com resíduos de lisina em proteínas podem gerar cetoaminas e cetoaldeídos; esse processo pode ser chamado de glicação (DONNE et al., 2003).

Os dois aminoácidos que talvez sejam os mais propensos à oxidação são cisteína (RADI et al., 1991) e metionina (VOGT, 1995) os quais contêm átomos de enxofre susceptíveis à oxidação. No caso da cisteína, a oxidação conduz à formação de dissulfetos ou ácidos cistéicos (SHACTER, 2000). As proteínas com resíduos de metionina podem sofrer modificações reversíveis à sulfóxidos ou sulfonas (VASCONCELOS et al., 2007).

Os resíduos de triptofano são facilmente oxidados à formilquinurenina, quinurenina, hidroxiquinurenina e o ácido quinolínico (SHACTER, 2000). A fenilalanina quando oxidada induz à formação de tirosina e de outros derivados. A oxidação da tirosina pode levar a formação de di-tirosina, clorotirosina, e di-hidrofenilalanina (GIESEG, 1993). A histidina quando oxidada gera 2-oxo-histidina (STADTMAN e LEVINE, 2003).

O peroxinitrito gerado a partir da interação do óxido nítrico e do anion superóxido, provoca nitrosilação em resíduos de tirosina, e a oxidação de outros resíduos de aminoácidos tais como: cisteína, triptofano, metionina e fenilalanina (ISCHIROPOULOS e AL-MEHDI, 1995). No entanto, é um fraco indutor de produtos carbonílicos (TIEN et al., 1999).

1.3 Oxidação de proteínas por HOCl e HOBr

O HOCl e o HOBr são fundamentais para o mecanismo de defesa imune inata. No entanto, existem evidências na literatura científica que demonstram claramente que os mesmos estão envolvidos nos processos oxidativos que permeiam os danos tissulares em

processos inflamatórios crônicos e degenerativos (PRUTZ et al., 1999, PATINSON e DAVIES, 2001).

O HOBr é um forte oxidante e reage rapidamente com biomoléculas tais como proteínas (THOMAS et al., 1995, PATINSON e DAVIES, 2004), lipídeos (CARR et al., 1996), colesterol (VISSERS et al., 1998) e DNA (HENDERSON et al., 2001a). A reação de HOBr com as ligações não saturadas dos ácidos graxos resulta na formação de bromo-hidrinas que são extremamente citotóxicas (CARR et al., 1996, VISSERS et al., 2001). Os ácidos nucleicos e nucleosídeos também são alvos do HOBr, visto que reações com a base nitrogenada uracila e com o análogo de nucleosídeo 2'-desoxicitidina, geram os compostos citotóxicos e mutagênicos 5-bromouracila e 5-bromo-2'-desoxicitidina, respectivamente (HENDERSON et al., 2001a,b). Esses compostos podem exercer efeito citotóxico e mutagênico em sítios de inflamação onde existe grande concentração de eosinófilos (HENDERSON et al., 2001a). As proteínas são susceptíveis aos ataques do HOBr devido à alta reatividade deste oxidante. Quando compara-se as constantes de velocidade de reação de HOBr e HOCl com aminoácidos, observar-se que HOBr reage de 30-100 vezes mais rápido com os resíduos de aminoácidos em proteínas quando comparado com HOCl. Reações de halogenação no aminoácido tirosina são 5000 vezes mais rápidas, para os aminoácidos cisteína e metionina a reação é mais lenta (PATINSON e DAVIES, 2004).

O HOBr pode reagir com o grupo amino das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos lisina e histidina em proteínas para formar os intermediários bromamina e di-bromamina (WEISS et al., 1986). A decomposição destes intermediários pode induzir a fragmentação das proteínas, através da formação de espécies reativas, tais como aldeídos e nitrilas, (FRIEDMAN e MOGULIS, 1939, NIEDER e HAGER, 1985, HAWKINS e DAVIES, 2005a). Resíduos de tirosina em proteínas são conhecidos como alvos preferidos do HOBr, resultando na formação de 3-bromotirosina e 3,5-di-bromo-tirosina (BUCHBERGER, 1988). Estes produtos têm sido empregados como biomarcadores em pacientes com asma devido aos níveis elevados (WU et al., 2000).

O aminoácido não essencial taurina também pode ser oxidado pelo HOBr formando a haloamina taurina bromamina (Tau-NHBr) (XIMENES et al., 2011). Essa haloamina mostrou ser potente oxidante de resíduos de triptofano em albumina bovina (XIMENES et al., 2011).

O HOCl é um potente agente oxidante gerado por fagócitos durante a resposta imune contra invasores do organismo (KLEBANOFF, 1999). No entanto, a produção excessiva de HOCl pode acarretar na oxidação de biomoléculas. A reação do HOCl com o DNA é

conhecida por resultar na formação de cloraminas (HAYATSU et al., 1971, HAWKINS e DAVIES, 2001). Essas espécies podem conduzir à dissociação da fita dupla do DNA devido à ruptura das ligações de hidrogênio (PRUTZ, 1998). A oxidação de nucleosídeos por cloraminas pode resultar na formação de produtos estáveis tais como: 5-clorocitosina, 5-clorouracila, 8-cloroadenina e 8-cloroguanosina (WHITEMAN et al., 1997, HENDERSON et al., 1999, MASUDA et al., 2001). A interação do HOCl com as duplas ligações dos ácidos graxos insaturados e o colesterol pode resultar na formação de cloro-hidrinas. Esses produtos possuem efeitos citotóxicos para as células, além de desestabilizar as estruturas de membrana (WINTERBOURN et al., 1992).

Em proteínas, HOCl pode oxidar aminoácidos que contêm enxofre, tais como, cisteína e metionina, mas também pode reagir com amino grupos da cadeia lateral de aminoácidos tais como lisina, histidina, triptofano e tirosina (WINTERBOURN, 1985). A reação do HOCl com cisteína produz dissulfetos, ácido cisteíco e sulfonamidas, (WINTERBOURN; BRENNAN, 1997). O sulfóxido de metionina é o produto da reação entre a metionina e o HOCl (PULLAR et al., 2001, SHAO et al., 2005). Esse produto tem sido proposto como o causador da disfunção e agregação proteica (CHAPMAN et al., 2003). O HOCl também pode clorinar resíduos de tirosina resultando na formação de 3-clorotirosina, que têm sido utilizada como biomarcador de processos oxidativos em pacientes com aterosclerose (HEINECKE et al., 1994). O aminoácido hidrofóbico triptofano também é suscetível a oxidações por HOCl. Quando esse aminoácido é oxidado gera quinurenina e *N*-formilquinurenina (ASPEE e LISSI, 2002).

1.4 Aminoácido taurina

A taurina (ácido 2-aminoetanosulfônico) é um análogo de aminoácido sulfurado e possui características próprias diferenciando-se dos demais aminoácidos. É mais ácido que os demais aminoácidos por conter em sua estrutura o grupo sulfônico (SO₃H) em substituição ao grupo carboxila (COOH) e por possuir um grupo amino na posição β (figura 1) (HUXTABLE et al., 1992).

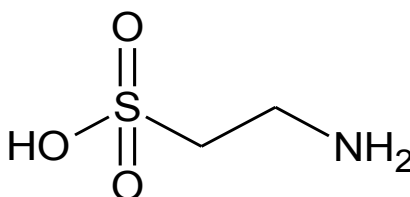


Figura 1: Estrutura do aminoácido taurina.

Fonte: ACD/ChemSketch

Foi descoberta e isolada pelos pesquisadores austríacos Friedrich Tiedemanne; Leopold Gmelin, 1827 ao ser encontrada na bile de boi em altas concentrações. Seu nome originou-se do latim da espécie *Bos taurus* (OLIVEIRA, 2008). A taurina, encontrada livremente no líquido intracelular, é um dos aminoácidos livres mais abundantes no cérebro, músculo esquelético e coração, sendo de fundamental importância no desenvolvimento do sistema nervoso central, na modulação do cálcio durante as contrações musculares e na estabilização celular (SHULLER-LEVIS e PARK, 2003). A concentração de taurina pode variar de tecido para tecido. Segundo Green e pesquisadores, os níveis no coração são de 25-30 mM, no pulmão de 11-17 mM e no músculo esquelético 15-20 mM por miligrama tecido (DAWSON et al., 2002). No reino vegetal a taurina foi encontrada em pequenas concentrações em nozes e feijões 29-100 nM (PASANTES-MORALES e FLORES, 1991). Essencial para a nutrição humana, descobriu-se na década de 70 que bebês prematuros alimentados através de nutrição parenteral não conseguiam manter níveis plasmáticos e urinários normais de taurina, ao contrário de bebês alimentados com leite materno. O estudo com leite materno revelou grandes quantidades de taurina, sendo o segundo aminoácido mais abundante, atrás apenas do aminoácido não essencial glutamato (AGOSTINI et al., 2000, OLIVEIRA, 2008). A deficiência de taurina está associada a diversos processos patológicos. Incluindo cardiomiopatia, degeneração da retina e retardo no crescimento que ocorre na fase de desenvolvimento (OLIVEIRA, 2008). A taurina é indispensável para manter a integridade da retina do olho. Na retina, a taurina é encontrada até 400 vezes maior do que no sangue. Descobriu-se, em meados da década de 70, que em gatos uma deficiência crônica de taurina induz a uma degeneração progressiva da retina levando à cegueira total. A correção da dieta permite parar a evolução, mas as lesões não são reversíveis (ANDERSON, 1979). Em condições normais, a sua necessidade diária pode ser alcançada por meio de uma dieta equilibrada, porém em situações de desequilíbrio do sistema enzimático e/ou em condições de estresse metabólico, suas necessidades fisiológicas estão aumentadas e, portanto, necessita ser suplementada. A suplementação pode ser obtida através de uma dieta rica em frutos do mar, carnes e ovos ou pela ingestão de aminoácidos precursores como a metionina e a cisteína na presença de vitamina B6 no fígado (HUXTABLE, 1992). No fígado, a cisteína é oxidada pela cisteína dioxigenase levando à formação de ácido sulfínico, o qual é descarboxilado pela enzima cisteína ácido sulfínico descarboxilase para produzir hipotaurina que é oxidado à taurina (BOUCHENOOGHE et al., 2006).

1.5 Formação e efeitos biológicos das haloaminas Tau-NHCl e Tau-NHBr

O aminoácido não essencial taurina pode ser oxidado pelos ácidos hipo-halosos HOCl e HOBr gerados via ação catalítica das enzimas mieloperoxidase (MPO) e peroxidase de eosinófilos (EPO) (WEISS et al., 1986). Os produtos dessas oxidações são as haloaminas, taurina cloramina (Tau-NHCl), taurina bromamina (Tau-NHBr) e taurina di-bromaminama (Tau-NBr₂) (WEISS et al., 1986, PETRÔNIO et al., 2012) (Figura 2).

Estas moléculas estão envolvidas quimicamente em vias de sinalização, regulação do sistema redox, alterações na expressão e na atividade de mediadores inflamatórios, incluindo óxido nítrico, prostaglandinas, NADPH oxidase, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), citocinas e interleucinas (KONTNY et al., 2007).

As haloaminas Tau-NHCl e Tau-NHBr apresentam boa atividade antimicrobiana e antiparasitária. Essas haloaminas, em níveis fisiológicos não apresentam citotoxicidade quando comparadas com HOCl e HOBr, além disso são capazes de diminuir significativamente a produção de espécies reativas de oxigênio geradas através de diversos processos oxidativos em nosso organismo (KIM et al., 1996). Em 2005 Klebanoff descreveu que Tau-NHCl e Tau-NHBr mostraram forte ação microbicida para bactérias patogênicas do tipo *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Propionibacterium acnes* e a Tau-NHBr exibiu atividade antiparasitária ao eliminar o *Schistosoma mansoni* causador da esquistossomose (YAZDABAKHSH et al., 1987). A Tau-NHCl e Tau-NHBr estão sendo alvos de diversos estudos biológicos a fim de elucidar ainda mais as suas propriedades farmacológicas. Para comprovar esse fato, Marcinkiewicz (2009), demonstrou propriedades anti-inflamatórias da Tau-NHBr, sendo assim, essa biomolécula foi incorporada para tratamento de acne, revelando a sua importância como agente terapêutico. Nesse contexto, ressaltamos a importância de estudar as haloaminas uma vez que ainda estão obscuras muitas funções dessas biomoléculas.

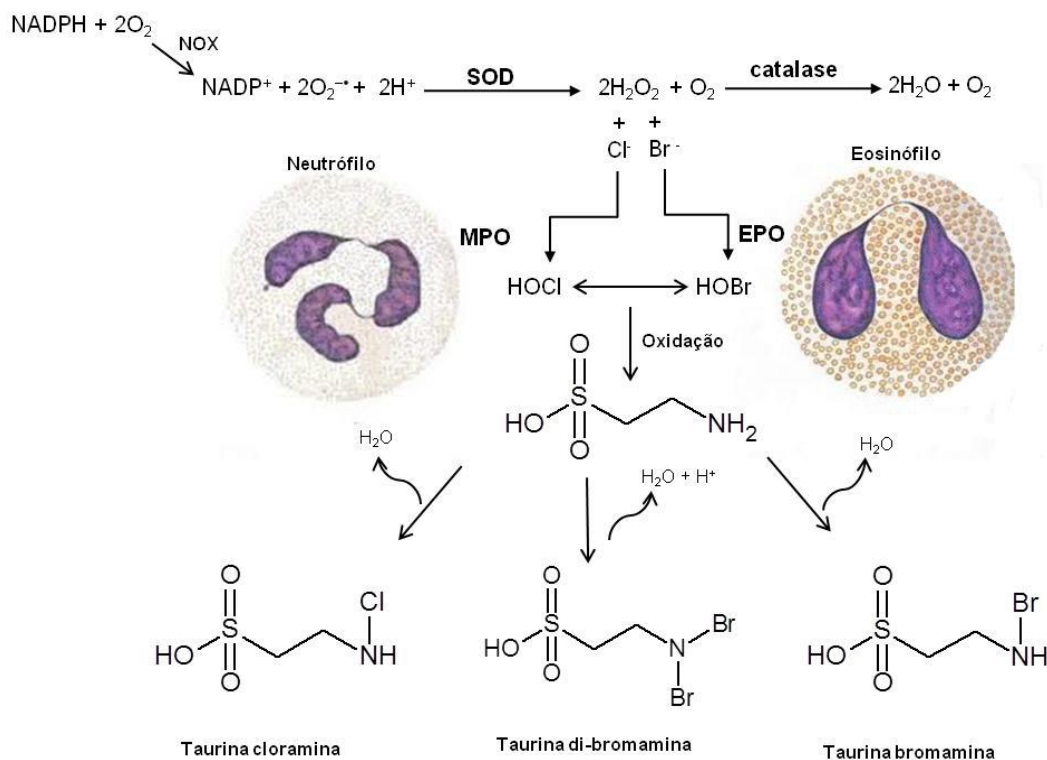


Figura 2: Formação das Haloaminas *in vivo*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

1.6 Lisoзима

Lisoзима é uma proteína globular monomérica de cadeia polipeptídica com 129 aminoácidos de peso molecular de 14.305 Daltons, foi descoberta pelo médico escocês Alexander Fleming em 1922, com sua estrutura tridimensional definida por David Chilton Phillips e colaboradores em 1965 (Figura 3).

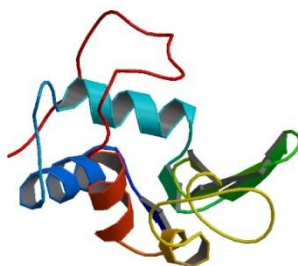


Figura 3: Estrutura 3D da lisoзима

Disponível em: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=5LYZ> acesso em Nov. 2014

A lisozima possui dois domínios estruturais: um domínio alfa (α) e um domínio beta (β). A proteína adota essencialmente a conformação helicoidal ($\sim 30\%$ α -hélice e $\sim 6\%$ folha- β). O domínio α é formado pela sequência de aminoácidos de 1-39 e 89-129, ainda é composto por quatro α -hélices, duas perto do C-terminal, dois perto do N-terminal e um C-terminal com hélices 3_{10} . O domínio beta é formado pela sequência de aminoácidos de 40-88, apresentando uma cadeia tripla de folhas anti-paralelas, uma hélice 3_{10} , e uma longa alça. A hélice 3_{10} é ligeiramente mais curta em comparação com um α -hélice, e tem cerca de três resíduos por sua vez (VANEY et al., 1996). A lisozima apresenta quatro ligações dissulfetos entre os resíduos de cisteína 6:127, 30:115, 64:86 e 76:94, que atuam para estabilizar a sua estrutura (MATAGNE e DOBSON, 1998). Através dos resíduos catalíticos glutamato 35 e aspartato 52, a lisozima catalisa a quebra das ligações glicosídicas β 1-4 entre o ácido *N*-acetilmurâmico e *N*-acetilglicosamina presentes no peptidoglicano da parede celular bacteriana (MARANA et al., 2006). Também apresenta atividade de quitinase, ou seja, rompe as ligações glicosídicas da quitina presente na parede dos fungos (BERNASCONI et al., 1987). Pode ser encontrada em secreções como lágrimas, saliva, mucosa nasal, bem como em grânulos citoplasmáticos de neutrófilos e na clara do ovo. Tem como principais funções: atividade antimicrobiana e atividade na resposta imune inata (SWAMINATHAN et al., 2011). A lisozima, sob determinadas condições (baixo pH, temperatura elevada, na presença de etanol), pode se transformar em fibras amilóides, tendo este processo sido bem caracterizado (TREXLER et al., 2007). Em lisozima de humanos já foram descritas variantes que apresentam mutações: uma mutação (I56T, F57I, W64R e D67H) ou duas mutações (F57I/T70N e T70N/W112R) no gene que codifica para a lisozima. Essas mutações estão associadas à amiloidose sistêmica não-neuropática, onde se observa a deposição de fibras em certos órgãos, tais como: o fígado, o baço e o rim (SWAMINATHAN et al., 2011). Além de estar envolvida em doenças amiloides a lisozima também está associada à doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (LOIVOS, 2009). A DPOC se caracteriza por uma leve inflamação crônica por todas as vias aéreas, parênquima e vasculatura pulmonar. A destruição da parede alveolar resulta de um desequilíbrio entre as proteases e anti-proteases no pulmão. A lisozima é produzida pelas células serosas do pulmão e é liberada em processos inflamatórios e infecciosos (LOIVOS, 2009).

1.7 Formação de proteínas amiloides

As proteínas são macromoléculas formadas pela sequência de vários aminoácidos, unidos por ligações peptídicas (cadeia polipeptídica). Desempenham diversas funções no organismo, tais como: estrutural, hormonal, enzimática, imunológica, nutritiva e de transporte citoplasmático (MARZZOCO, 2007). Para realizar todas essas funções, as proteínas possuem estruturas tridimensionais adquiridas por um processo de dobramento da cadeia polipeptídica (*folding* proteico), conduzindo-as a uma estrutura nativa estável e funcional. O *folding* proteico é um processo natural que ocorre em todas as proteínas e leva a formação da estrutura nativa, enquanto o estado desnaturado refere-se ao conjunto de conformações proteicas não-nativas que são formadas através de ambientes desfavoráveis, tais como: agentes desnaturantes, pH, temperatura, pressão, e etc (LEHNINGER et al., 2008). Nesse contexto, a transição dos estados desdobrados para os estados nativos pode produzir estruturas intermediárias. A transição do estado desdobrado para o estado dobrado pode ser chamado de dois estados de enovelamento onde se enquadram proteínas tipicamente pequenas que apresentam menos de 150 aminoácidos (FERSHT et al., 1993). As proteínas maiores requerem mais cuidados, são mais complexas e assim, tendem a se dobrar por meio de um ou mais intermediários de dobragem como exemplo: as chaperonas (FENTON; HORVICH, 2003). Em um modelo de dois estados de enovelamento a proteína pode ocupar apenas um dos dois estados: o estado desdobrado ou o estado dobrado, sendo assim um processo de tudo ou nada. A passagem do estado desdobrado para o estado dobrado é espontânea e controlada por forças de Van der Waals o que contribui para o aumento da entropia na energia livre de Gibbs (FENTON e HORVICH, 2003). O aumento da entropia é causado através da movimentação dos aminoácidos hidrofóbicos para o interior da proteína e os aminoácidos hidrofílicos para o exterior da proteína (JAHN e RADFORD, 2005).

O *folding* proteico é passível de falhas e assim algumas proteínas não conseguem atingir a forma nativa necessária para o correto desempenho biológico. Essas falhas na maquinaria proteica podem resultar no aparecimento de muitas doenças associadas à agregação proteica e ao estado amilóide, como Alzheimer, Parkinson, Esclerose Lateral Amiotrófica, Encefalopatia Espongiforme Bovina e *Scrapie* (CHITI e DOBSON, 2006).

O correto enovelamento das proteínas é dependente de energia estabilizadora junto à maquinaria proteica. O mecanismo de formação da estrutura da proteína é complexo, depende da conformação da cadeia polipeptídica no espaço, da diversidade na sequência dos aminoácidos e das diferentes interações que os estabilizam. Desta forma, torna-se difícil a previsão da formação das estruturas desordenadas (DILL et al., 2008). Tornou-se cada

vez mais evidente que a capacidade de uma proteína se dobrar corretamente está relacionada a um perfeito e delicado equilíbrio energético. Este equilíbrio pode ser perturbado por mutações nas sequências das proteínas ou mudanças no seu ambiente, por exemplo, a mudança do pH ou da temperatura. O equilíbrio energético consiste em diversas interações tais como: ligações de hidrogênio (8-21 kJ/mol), interações eletrostáticas (~21 kJ/mol) forças de Van der Waals (0,04-0,8 kJ/mol por par de átomo) e efeito hidrofóbico. Cada interação tem um efeito pequeno, mas, quando todas as interações estão em equilíbrio produzem um efeito estabilizador significativo (VOET e VOET, 2006). Os pesquisadores Jahn e Radford (2005) demonstraram através do funil energético o mecanismo pelo qual ocorre a formação de agregados proteicos. De acordo com esta teoria o topo do funil possui um conjunto de proteínas com conformações desnaturadas que estão em elevados níveis energéticos. Do outro lado do funil encontram-se as proteínas nativas com mais baixo nível energético. Esse nível energético mais baixo existe por conta das interações eletrostáticas e interações hidrofóbicas das proteínas estabilizando-as no nível mais baixo de energia. Através de interações intermoleculares entre agregados proteicos e proteínas parcialmente dobradas pode-se levar à formação de oligômeros, agregados amorfos ou agregados fibrilares altamente ordenados, chamados de fibras amiloides (Figura 4).

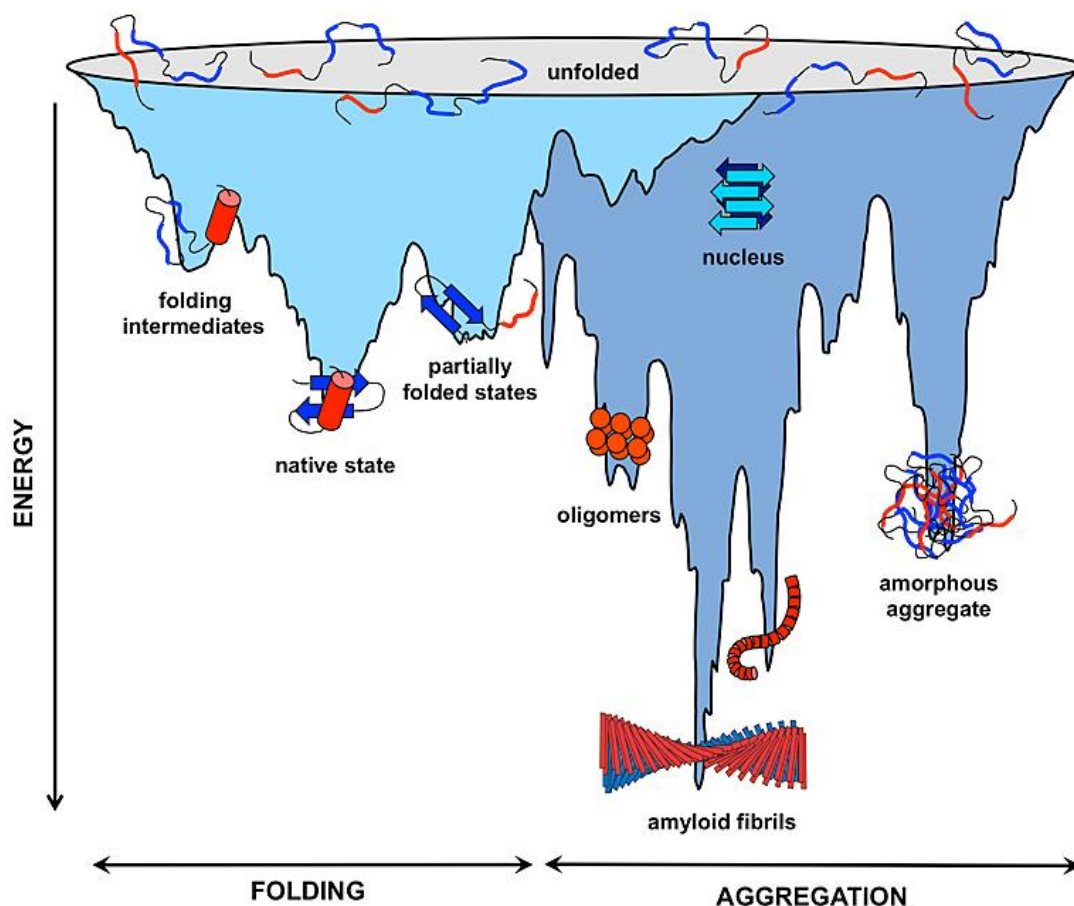


Figura 4: Esquema representativo do *folding* proteico através do funil energético proposto por Jahn e Radford.

Fonte: JAHN; RADFORD, 2005, p. 5963.

A formação das fibras amilóides é um processo complexo e minucioso envolvendo diversas etapas. Os possíveis processos de formação das fibras amilóides incluem a ativação de monômeros, a formação de espécies pré-nucleares, nucleação primária, processo de crescimento secundário, alongamento por adição de monômeros e coagulação, rearranjo conformacional, associação lateral ou agregação de monômeros, e a separação de fases (MANKAR et al., 2011). As proteínas amilóides são caracterizadas por terem uma estrutura rica em folha- β , que são orientadas perpendicularmente ao eixo maior da fibra na cadeia polipeptídica, resultando numa série de folhas- β que se propagam ao longo da fibra. A torção das fibras- β faz com que essas adquiram um arranjo helicoidal. Uma das características das cadeias β é terem as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos orientadas alternadamente para um e outro lado da folha- β . Este arranjo é mantido ao longo das folhas- β paralelas e anti-paralelas (SUNDE et al., 1997). *In vivo* as mutações pontuais

podem desestabilizar as sequências de aminoácidos causando a formação de proteínas amilóides. Esse fato já foi descrito para a lisozima humana (VALLEIX et al., 2002), β -2 microglobulina (SMITH et al., 2003) e transtirretina (McCUTCHEN et al., 1995).

Os oligômeros são altamente heterogêneos e estruturalmente desorganizados; são formados através de processos termodinamicamente desfavoráveis na fase de latência da agregação proteica. Os monômeros são convertidos em oligômeros através do mecanismo de crescimento de nucleação na fase inicial da cinética de formação das fibras (JARRETT e LANSBURY, 1993, LOMAKIN et al., 1996). O núcleo pode se associar rapidamente a outros monômeros e assim desenvolvendo os agregados amiloides (LOMAKIN et al., 1996). Os oligômeros têm sido descritos como moléculas tóxicas para as células neuronais devido ao seu acúmulo. Através da clivagem do peptídeo amiloide da proteína precursora de amiloide (PPA) esse peptídeo se remonta formando dímeros, trímeros e oligômeros (ZHAO et al., 2012). Os agregados amorfos são formados por problemas no prolongamento da fase inicial da cinética de formação de fibras. Evidências experimentais recentes sugerem que agregados amorfos podem iniciar a formação das proteínas amiloides a partir de polipeptídeos desdobrados (FOLLMER e NETTO, 2013).

Na via do *folding* existem ainda os intermediários proteicos que são chamados de *molten globule*. Estes *molten globule* possuem estrutura secundária nativa, mas com pouca ou nenhuma estrutura terciária, com muitas zonas hidrofóbicas expostas (YON, 1997). Estes intermediários podem potencializar a agregação na neurodegeneração (MAHLEY e HUANG, 2006, SKORA et al., 2010).

1.8 Formação de agregados proteicos mediados por oxidação

Há evidências de que processos oxidativos podem mediar a formação de agregados proteicos. A imunoglobulina IgG pode ser oxidada por ERO gerados no processo inflamatório caracterizando a artrite reumatoide. A oxidação de IgG pode causar a sua desnaturação e agregação (LUNEC et al., 1985). Os agentes oxidantes HOCl e HOBr têm sido alvos de muitos estudos no que diz respeito a oxidação e agregação de proteínas. Estudos com as proteínas apomióglobina e apo-hemoglobina demonstraram que a oxidação pelo HOCl levou a formação de agregados e oligômeros proteicos (CHAPMAN et al., 2003). As proteínas lisozima e STI (inibidor de tripsina de soja) foram submetidas à oxidação com o HOBr e o estudo demonstrou que baixas concentrações molares de HOBr podem levar a inativação de ambas enzimas assim como, resultar na formação de agregados proteicos (HAWKINS e DAVIES, 2005a). Muitos estudos estão sendo realizados sobre o mecanismo pelo qual o

HOCl atua contra micro-organismos invasores. Assim, pesquisadores demonstraram que a oxidação de proteínas termolábeis de *E. coli* pelo HOCl pode causar desnaturação e agregação levando à destruição da bactéria. Desta forma, conclui-se que os efeitos deletérios do HOCl sobre a bactéria seriam provavelmente devido à capacidade de provocar a desnaturação e agregação de proteínas essenciais para a sua sobrevivência (WINTER et al., 2008). Em doenças de cunho inflamatório onde o HOCl é elevado ocorre desequilíbrio de ferro resultando em acúmulo de ferro livre. O ferro livre é tóxico devido a sua capacidade de gerar radicais livres através de reações de Fenton. Estudos recentes demonstram que o HOCl se liga ao grupo heme da hemoglobina (Hb) e gera espécies férricas intermediárias. Essas espécies geradas participam na agregação da metaloproteína e destruição do grupo heme (MAITRA et al., 2012). A produção dos ácidos hipo-halosos (HOCl e HOBr) e das haloaminas (Tau-NHCl, Tau-NHBr e Tau-NBr₂), está intimamente ligada a processos inflamatórios e infecciosos através da grande concentração de neutrófilos e/ou eosinófilos e taurina presente na parede celular dos neutrófilos (SCHULLER-LEVIS e PARK, 2004, BEHE, SEGAL, 2007). Sendo assim, a produção descontrolada de HOCl e HOBr tem sido associada na iniciação e progressão de muitas doenças inflamatórias e degenerativas (GUNGOR et al., 2010, NUSSHOLD et al., 2010). Além disso, a oxidação de lisozima por HOCl provoca a perda de atividade enzimática e promove o desdobramento da proteína (HAWKINS e DAVIES, 2005b). Este desdobramento pode promover o início da formação de agregados amiloidais, sendo descrito uma correlação entre a fibrilogênese de lisozima e alterações na composição do meio de redox representada pela concentração de cisteína e cistina (WANG et al., 2009). Considerando-se: a relevância dos resíduos de triptofano no sítio ativo da lisozima (KURODA et al., 1975), a evidência de que este aminoácido é essencial para a estabilidade da proteína apomioglobina evitando a sua agregação e formação de fibras amiloides (SIRANGELO et al., 2002), a recente descoberta de que Tau-NHBr apresenta seletividade na oxidação resíduos de triptofano na albumina bovina (XIMENES et al., 2011) e ainda a importância de estudar as haloaminas uma vez que muitas funções dessas biomoléculas são obscuras, ressaltamos nessa tese a relevância de estudar as alterações na atividade enzimática da lisozima, bem como sua propensão de agregação da quando submetida à oxidação pelos ácidos HOCl e HOBr, e pelas haloaminas Tau-NHCl, Tau-NHBr e Tau-NBr₂.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo estudar as alterações estruturais e funcionais na proteína lisozima provocadas por sua oxidação pelo ácido hipocloroso, ácido hipobromoso e suas haloaminas, taurina cloramina, taurina mono-bromamina e taurina di-bromamina.

2.1 Objetivos específicos

- I)** Estudar a oxidação do triptofano pelos ácidos hipo-halosos e haloaminas.
- II)** Estudar a oxidação da lisozima pelos ácidos hipo-halosos e haloaminas.
- III)** Estudar a inibição da atividade enzimática da lisozima provocada por sua oxidação.
- IV)** Estudar a formação de agregados amiloides na lisozima provocados por sua oxidação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes e Soluções

2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH), 5,5'-ditio-bis(2- ácido nitrobenzóico), acetonitrila, ácido acético, ácido fórmico, ácido fosfórico, ácido tricloroacético, ácido trifluoroacético, alanina, albumina bovina, brometo de sódio, células liofilizadas de *Micrococcus lysodeikticus*, cloreto de sódio, dodecil sulfato de sódio (SDS), glicina, hidrocloreto de guanidina, lisozima de ovo de galinha, melatonina, metanol, *N*-acetiltryptofano, sal de magnésio de 8-anilino-1-naftalenossulfonato (ANS), serotonina, taurina, tioflavina T, triptofano foram adquiridos pela Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Os reagentes usados para preparação da solução salina tamponada (PBS, *phosphate buffered saline*), demais tampões, soluções e fases móveis foram de grau HPLC. Soluções de trabalho de ácido hipocloroso (HOCl) foram preparadas a partir de uma solução comercial de hipoclorito de sódio (5%) Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), e suas concentrações foram determinadas por espectrofotometria após diluição em 0,01 M NaOH ($\epsilon_{292\text{nm}} = 350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). O HOBr foi sintetizado pela combinação de 100 mM HOCl e 200 mM NaBr em água. A solução de lisozima na concentração de 1 mM foi preparada em tampão fosfato 10 mM pH 7,0 e estocada a 4°C e a sua concentração foi determinada por espectrofotometria ($\epsilon_{280\text{nm}} = 43\,824 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A solução de ANS 3 mM foi preparada em tampão fosfato 10 mM pH 7,0. Estas soluções foram preparadas no momento de uso.

3.2 Preparação e análise de taurina cloramina (Tau-NHCl), taurina mono-bromamina (Tau-NHBr) e di-bromamina (Tau-NBr₂)

A solução de trabalho Tau-NHCl foi preparada pela adição de 5 mM de HOCl em 50 mM de taurina em tampão fosfato 10 mM pH 7,0. A concentração de Tau-NHCl foi determinada por sua absorbância ($\epsilon_{252\text{nm}} = 429 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Taurina di-bromamina (Tau-NBr₂) foi preparada pela combinação de HOBr 5 mM e taurina 2,5 mM em tampão fosfato 10 mM pH 7,0. Tau-NHBr foi preparada pela combinação de HOBr 5 mM e 500 mM de taurina em tampão fosfato 10 mM pH 7,0. As concentrações de Tau-NBr₂ e Tau-NHBr foram determinadas por suas absorbâncias ($\epsilon_{241\text{nm}} = 2713 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e ($\epsilon_{288\text{nm}} = 430 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), respectivamente (THOMAS et al., 1995). As haloaminas Tau-NHCl, Tau-NHBr e Tau-NBr₂ foram analisadas utilizando um espectrofotômetro com arranjo de fotodiodos Hewlett Packard 8452 (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

3.3 Estudos de quimiluminescência do triptofano

As reações foram constituídas por 0,5 mM dos oxidantes (HOCl/HOBr) e 0,5 mM do triptofano na presença ou ausência de taurina ou alanina em PBS, pH 7,4, a 25°C. As reações foram iniciadas pela adição dos ácidos hipo-halosos ou haloaminas e a luz emitida foi medida usando luminômetro de microplaca LB 960 (Berthold Technologies, Oak Ridge, TN, EUA). Para os ensaios, utilizando haloaminas as substâncias foram sintetizadas como indicado anteriormente e adicionadas à solução de triptofano. As reações foram iniciadas pela adição dos oxidantes através de injetor automático.

3.4 Estudos de quimiluminescência de derivados indólicos

As reações foram constituídas por 0,5 mM dos oxidantes (HOCl/HOBr) e 0,5 mM dos derivados de indólicos (triptofano, melatonina, serotonina e *N*-acetiltryptofano) em PBS, pH 7,4, a 25°C. As reações foram iniciadas pela adição dos ácidos hipo-halosos (HOCl/HOBr) e a luz emitida foi medida usando luminômetro de microplaca LB 960 (Berthold Technologies, Oak Ridge, TN, EUA). As reações foram iniciadas pela adição dos oxidantes através de injetor automático.

3.5 Estudos de quimiluminescência dos aminoácidos taurina e alanina

As reações foram constituídas por 0,5 mM dos oxidantes (HOCl/HOBr) e 0,5 mM do triptofano na presença ou ausência de taurina (0,5 mM) ou alanina (0,5 mM) em PBS, pH 7,4, a 25°C. As reações foram iniciadas pela adição dos ácidos hipo-halosos e a luz emitida foi medida usando luminômetro de microplaca LB 960 (Berthold Technologies, Oak Ridge, TN, EUA). As reações foram iniciadas pela adição dos oxidantes através de injetor automático.

3.6 Estudos de quimiluminescência da oxidação do triptofano pelas haloaminas

As reações foram constituídas por 0,5 mM das haloaminas e 0,5 mM do triptofano em PBS, pH 7,4, a 25°C. As reações foram iniciadas pela adição das haloaminas e a luz emitida foi medida usando luminômetro de microplaca LB 960 (Berthold Technologies, Oak Ridge, TN, EUA). As reações foram iniciadas pela adição dos oxidantes através de injetor automático.

3.7 Estudos de fluorescência da oxidação do triptofano

As reações foram constituídas por 0,5 mM dos oxidantes e 0,5 mM dos derivados de indólicos em PBS, pH 7,4, a 25°C. As reações foram iniciadas pela adição dos ácidos hipohalosos e a fluorescência intrínseca do triptofano foi monitorada em λ_{ex} 295 nm e λ_{em} 360 nm. A formação dos produtos foi monitorada em λ_{ex} 340 nm e λ_{em} 440 nm. Os experimentos foram realizados em espectrofluorímetro LS55 (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA).

3.8 Estudos por cromatografia Líquida de alta eficiência

As reações foram constituídas por 0,5 mM dos oxidantes (HOCl e HOBr) e 0,5 mM dos derivados de indólicos em PBS, pH 7,4, a 25°C. Após incubação por 5 minutos, alíquotas das misturas de reação (20 μ L) foram injetadas no sistema cromatográfico (Jasco, Easton, MD, EUA). O consumo dos reagentes e formação dos produtos foram analisados utilizando um detector de arranjo de fotodiodos, monitorado em 254 nm. As análises foram realizadas em modo isocrático utilizando uma coluna de fase reversa C₁₈ Phenomenex® LUNA (2) (250 X 4.6 mm, 100Å, 5 μ m) com fase móvel constituída por uma solução aquosa de 0,1% de ácido fórmico:metanol (6: 94, v / v). A bomba de fluxo foi de 1,0 mL / min, foi utilizado injetor automático e a temperatura do forno a 25°C, não foi utilizado pré-coluna.

3.9 Estudos de Fluorescência intrínseca

A fluorescência intrínseca da lisozima foi medida usando espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 55 (Perkin Elmer, Shelton, CT, USA) nas seguintes condições: λ_{ex} 295 nm, e varredura de emissão na faixa de 310 a 500 nm. As fendas para excitação e emissão foram fixadas em 5 nm. Foi utilizado cubeta de quartzo de 3 mL com caminho ótico de 10 mm sob agitação magnética. A mistura da reação foi constituída por 5 μ M lisozima e 20 μ M oxidantes em tampão fosfato 10 mM pH 7,0. A fluorescência foi medida após 5 minutos de adição dos oxidantes. Para os estudos cinéticos, as reações foram disparadas pela adição dos oxidantes com excitação e emissão em λ_{ex} 295 e λ_{em} 344 nm, respectivamente.

3.10 Estudos de Fluorescência extrínseca

Os estudos de fluorescência extrínseca da lisozima, ou seja, utilizando a sonda ANS foram realizados nas seguintes configurações: λ_{ex} 378 nm e varredura de λ_{em} 410 a 600 nm. As fendas para excitação e emissão foram fixadas em 5 nm. Foi utilizado uma cubeta de quartzo de 3 mL com caminho ótico de 10 mm sob agitação magnética. A mistura da reação foi constituída por 5 μ M lisozima e 20 μ M de oxidantes em tampão fosfato 10 mM pH 7,0.

Após a oxidação, adicionou-se 100 μM de metionina para a supressão de oxidantes remanescentes e incubado por mais 5 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação foram adicionados 90 μM da sonda ANS e incubado por mais 30 minutos antes da leitura. Para os experimentos em pH 9,2 as condições de reação foram: 50 μM de lisozima e 200 μM de oxidantes em tampão fosfato 10 mM pH 7,0. Após a oxidação foram adicionados 1000 μM de metionina para supressão de oxidantes remanescentes e incubados por mais 5 minutos. Após a incubação foram adicionados 90 μM da sonda ANS e incubou-se mais 30 minutos antes da leitura. Então a mistura da reação foi diluída 10 vezes em tampão glicina 100 mM pH 9,2 antes da leitura.

3.11 Estudos de Espalhamento de luz

O espalhamento da luz é uma indicação da formação de agregados proteicos. Para realização desse experimento no espectrofluorímetro, a emissão deve ser monitorada em uma faixa que compreende a excitação. Para isso, a excitação foi fixada em λ_{ex} 280 nm e a emissão varrida λ_{em} 270 nm e 300 nm. As fendas para excitação e emissão foram fixadas em 5 nm. Foi utilizado uma cubeta de quartzo de 3 mL com caminho ótico de 10 mm sob agitação magnética. A mistura da reação foi constituída por 5 μM lisozima e 20 μM oxidantes em tampão fosfato 10 mM pH 7,0. As medidas foram realizadas 5 minutos após a adição dos oxidantes.

3.12 Estudos de Anisotropia

A medida da anisotropia é uma indicação do grau de liberdade de uma molécula em um sistema. Para isso, os ensaios foram realizados afim de investigar a formação de agregados após a oxidação da lisozima pelos ácidos hipo-halosos e haloaminas. Os comprimentos de onda foram fixados em excitação λ_{ex} 378 nm e λ_{em} 485 nm para emissão. As fendas para excitação e emissão foram fixadas em 5 nm. Foi utilizado uma cubeta de quartzo de 3 mL com caminho ótico de 10 mm sob agitação magnética. As misturas de reações foram constituídas por 50 μM lisozima 500 μM oxidantes em tampão fosfato 10 mM pH 7,0. Após a oxidação, foi adicionado 1000 μM de metionina para a supressão de resíduos dos oxidantes remanescentes e incubados por 5 minutos em temperatura ambiente. Na sequência, a mistura da reação foi diluída em tampão glicina 0,1 M pH 9,2 e então, adicionado 90 μM da sonda ANS e incubado por 30 minutos antes da leitura.

3.13 Ensaio de agregação

A possível formação de agregados amiloidais foi avaliada por meio da sonda fluorescente tioflavina T. O meio de reação foi constituído por 50 μM lisozima e 200 μM oxidantes em tampão fosfato 10 mM pH 7,0, incubados por 30 minutos em temperatura ambiente sob leve agitação. Após a oxidação, foi adicionado 1000 μM de metionina para a supressão de resíduos dos oxidantes remanescentes e incubados por 5 minutos em temperatura ambiente. A mistura da reação foi diluída 20 vezes em tampão glicina 0,1 M de pH 9,2 contendo 10 μM de Tioflavina T e a mistura foi incubada por 15 minutos. A fluorescência da Tioflavina T, que é a indicação de sua ligação a agregados amiloidais foi mensurada como segue. A excitação foi fixada em 440 nm e a emissão varrida entre 450 nm e 600 nm. As fendas para excitação e emissão foram fixas em 5 nm. Foi utilizado uma cubeta de quartzo de 3 mL com caminho ótico de 10 mm sob agitação magnética. Nos experimentos na presença de SDS, este composto foi adicionado (300 μM) após as reações de oxidação e incubado por 15 minutos antes da adição de Tioflavina T.

3.14 Determinação da Concentração Relativa de Grupos Carbonílicos nas Proteínas

A lisozima 50 μM foi incubada com 200 μM de oxidantes em 10 mM de tampão fosfato de sódio pH 7,0 durante 30 min a 25°C sob leve agitação. Em seguida, 1 mM de metionina foi adicionado ao meio de reação para remover possíveis resíduos de oxidantes e incubada por mais 5 min. A formação de grupos carbonílicos nas proteínas produzidas pela oxidação com as haloaminas ou ácidos hipo-halosos foi analisada como descrito na literatura anteriormente com pequenas modificações (FAGAN et al., 1999). A mistura da reação contendo a lisozima oxidada (0,5 mL) foi adicionado a 0,5 mL DNPH (10 mM em HCl 2 M) e foi incubada durante 1 hora em temperatura ambiente e agitando em intervalos de 10 minutos. A proteína foi precipitada pela adição de 0,5 mL de TCA gelado (concentração final: 30% P/V) e incubada em banho de gelo durante 30 minutos. A solução foi submetida à centrifugação a 11.000 rpm durante 10 minutos e após a centrifugação o sobrenadante foi descartado. A proteína precipitada foi lavada três vezes com 1 mL de uma mistura de etanol 1:1 acetato de etila (v/v). A proteína precipitada foi então dissolvida em 0,5 mL de cloridrato de guanidina 6 M (preparada em 20 mM de fosfato de potássio pH 2,3) e incubada a 37 ° C durante 1 hora. Em seguida, a mistura da reação foi centrifugada a 11.000 rpm durante 10 min e o teor de grupos carbonílicos formados foi determinado em espectrofotômetro ($\epsilon_{370 \text{ nm}} = 22.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e expresso em nmol/mg de proteína.

3.15 Determinação da Atividade Enzimática da lisozima

A atividade da lisozima foi determinada medindo a taxa de perda na turvação de uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (ATCC 4698). As misturas reacionais foram 5 μ M de lisozima e 20 μ M de oxidantes em tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,0. Após a oxidação, 100 μ M metionina foi adicionado para a supressão de oxidantes residuais e incubado durante 5 minutos à temperatura ambiente. Uma alíquota de 50 μ L da mistura de reação foi adicionada a 2950 μ L de uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* (0,01% p/v em tampão fosfato de potássio 66 mM pH 6,24) em cubeta de quartzo de 3 mL sob agitação magnética a 25°C (SHUGAR et al., 1952). A taxa de decaimento da absorbância foi medida a 450 nm e a atividade enzimática foi mensurada em $\Delta A/\text{min}$ na parte linear da curva, tendo o controle como referência.

3.16 Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada pelo programa GraphPadPrism, aplicando-se teste t ou análise de variância (ANOVA) com comparações múltiplas e teste de Tukey como pós-teste, com determinação do nível de significância para $p < 0,05$. Foram realizados pelo menos três experimentos independentes em triplicata.

4. RESULTADOS

4.1 Estudos da oxidação do triptofano

4.1.1 Avaliação da quimiluminescência produzida durante a oxidação de triptofano

Este trabalho teve como base estudos anteriores que demonstraram que as haloaminas oxidavam com eficiência, a proteína albumina e nessa reação observava-se emissão de luz (XIMENES et al., 2011). Este achado somado ao fato de que a oxidação de derivados indólicos são susceptíveis à geração de estados excitados (LAKOWICZ, 2000), nos levou ao estudo da oxidação do aminoácido triptofano pelos ácidos hipo-halosos e haloaminas.

Iniciamos esse trabalho submetendo o aminoácido triptofano à oxidação e comparando a eficiência da geração de quimiluminescência quando utilizado HOCl ou HOBr. Os resultados apresentados na Figura 5a e 5b mostram que a oxidação promovida pelo HOBr foi significativamente mais eficiente na geração de luz se comparado ao HOCl. Como pode ser observado, trata-se de uma reação rápida, sendo necessária a utilização do sistema de injeção automática para não perder o início da emissão. Na Figura 5c observa-se o estudo da variação da concentração do HOBr mantendo fixa a concentração do aminoácido. O máximo de emissão foi alcançado em uma relação de 1:2 (triptofano:HOBr). Deve-se esclarecer que a emissão de luz, embora aparentemente alta, trata-se de emissão classificada como ultra-fraca, sendo visível apenas em luminômetro altamente sensível.

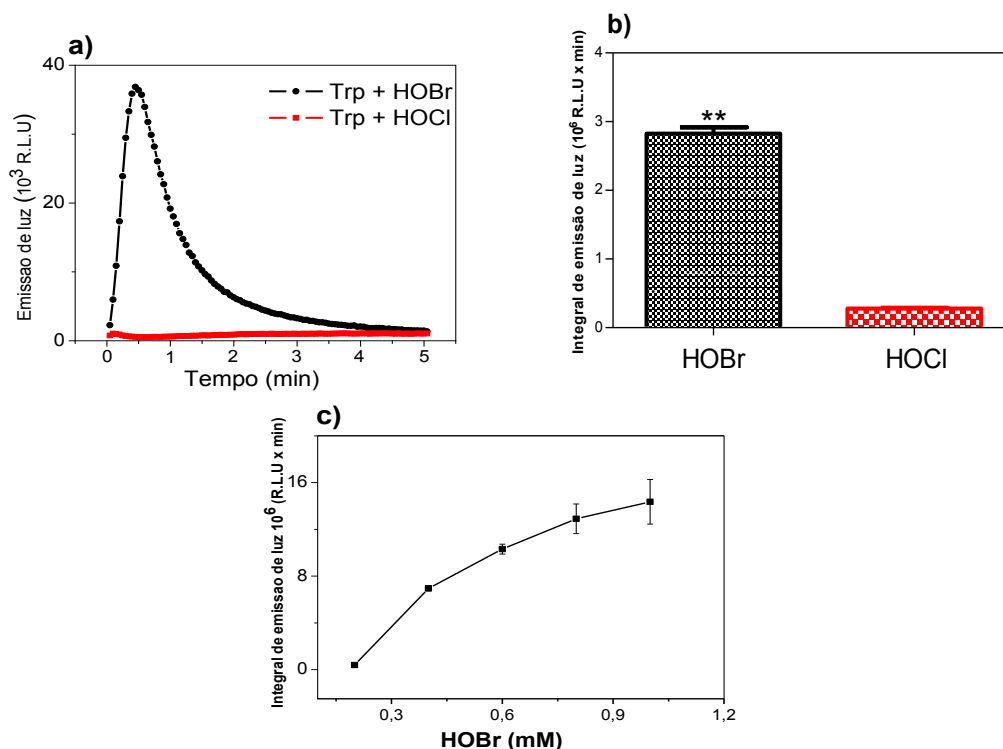


Figura 5: Ensaio de quimiluminescência da oxidação do triptofano: **(a, b)** ácido hipobromoso (HOBr) versus o ácido hipocloroso (HOCl) $** (p < 0,01)$ de acordo com o teste t. A reação consistiu em 0,5 mM triptofano e 0,5 mM de oxidante em PBS, pH 7,4, a 25°C. **(c)** Efeito da concentração de HOBr na emissão de luz. A concentração de triptofano foi 0,5 mM. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes.

4.1.2 Estudos de fluorescência da oxidação do triptofano

No experimento anterior o HOBr mostrou-se mais eficiente na geração de luz quando comparado ao HOCl. Desta forma, o próximo passo foi avaliar e comparar o perfil cinético de oxidação do triptofano por HOCl e HOBr. Os resultados apresentados na Figura 6a mostram a eficiência dos ácidos hipo-halosos na oxidação do triptofano, pois houve uma diminuição, praticamente instantânea, de cerca de 50% da sua fluorescência. Esse resultado indica que ambos os ácidos oxidam o triptofano com a mesma velocidade e com a mesma eficiência.

Considerando-se que não houve diferenças no que diz respeito à eficiência e a velocidade de oxidação para ambos os ácidos, buscou-se então indícios na formação dos produtos secundários durante a oxidação. Como o triptofano é um derivado indólico e há relatos de que, quando oxidados, esta classe de compostos emite luminescência em cerca de 400 nm (XIMENES et al., 2005), procuramos indícios da formação de substância fluorescentes nesta região do espectro. Para isso, acompanhamos as reações monitorando

a fluorescência em 340/440 nm. Na Figura 6b observamos que o consumo do triptofano foi seguido por uma reação secundária e mais lenta quando oxidado com HOBr. Ao contrário, para o HOCl não se observou essa reação secundária. Esses dados sugeriram que a oxidação do triptofano com HOBr gera produtos secundários que são posteriormente oxidados pelo HOBr gerando espécies que emitem fluorescência.

Esses achados corroboram com os dados anteriores (Figura 5a) indicando a possibilidade de que reações secundárias de oxidação do triptofano por HOBr podem ser as responsáveis pela eficiência do HOBr na geração de luz quando comparado com o HOCl.

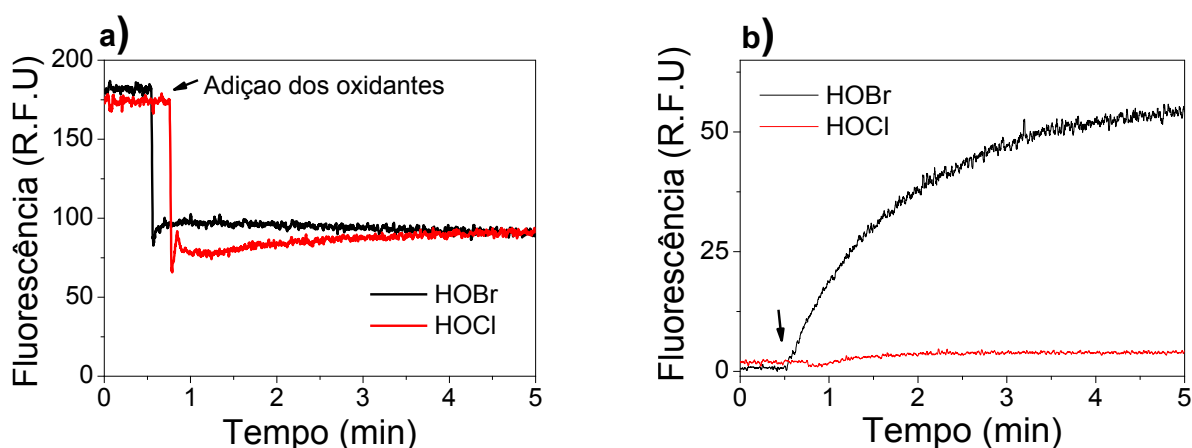


Figura 6: Perfil cinético da oxidação do triptofano. Ácido hipobromoso (HOBr) versus ácido hipocloroso (HOCl). **(a)** O consumo do triptofano foi monitorado através da fluorescência intrínseca (λ_{ex} 295 nm / λ_{em} 360 nm). **(b)** Formação de produtos de oxidação (λ_{ex} 340 nm / λ_{em} 440 nm). A mistura de reação consistiu de 0,5 mM triptofano e 0,5 mM de oxidantes em PBS, pH 7,4, a 25°C.

4.1.3 Análise da oxidação de triptofano por cromatografia líquida de alta eficiência

Os dados apresentados no experimento anterior mostraram a formação de produtos secundários gerados pela oxidação do triptofano por HOBr.

Para estudar os produtos formados utilizou-se cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD). As análises foram monitoradas em $\lambda=254$ nm. Inicialmente, foi injetado triptofano (0,5 mM) para a padronização do método. As condições de reação foram as mesmas utilizadas nos estudos de quimiluminescência. Como pode ser observado e corroborando com os resultados anteriores, o consumo de triptofano foi o mesmo para ambos oxidantes (Figura 6a).

A Figura 7 traz os espectros UV-Vis dos principais produtos (picos) formados na oxidação do triptofano, os quais foram identificados com dados da literatura: *N*-formilquinurenina (NFK), quinurenina (Kyn), 1,2,3,3a,8,8a-hexahidro-3a-Hidroxipirroló[2,3-b]-

indol-2-ácido carboxílico (Pic), oxindolalanina (Oia) e dioxindolalanina (DiOia) (SALMINEN e HEINONEN, 2008). Os produtos formados para ambos os ácidos foram os mesmos, no entanto, na oxidação com o HOBr os picos apresentaram menor área, o que pode sugerir que os mesmos foram formados com menor eficiência ou oxidados ao serem formados com exceção do produto DiOia. Esta segunda hipótese se ajusta melhor aos resultados anteriores, pois somente para o HOBr foram observadas reações secundárias.

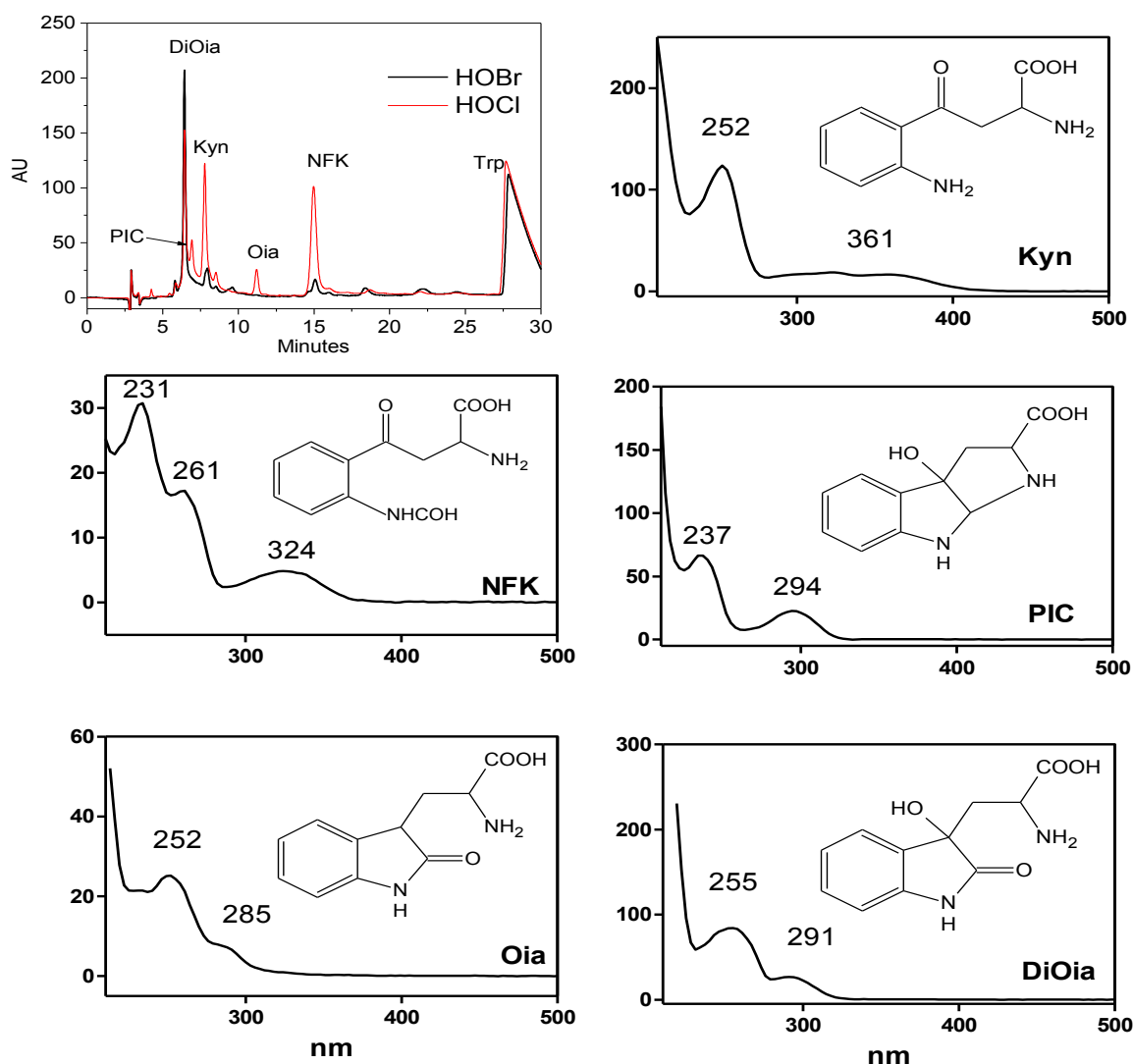


Figura 7: Cromatogramas e espectros UV-Vis dos produtos de oxidação do triptofano: ácido hipocloroso (HOCl) versus ácido hipobromoso (HOBr). A mistura de reação foi injetada no CLAE após 5 minutos do início da reação. As misturas de reação consistiram em 0,5 mM de triptofano e 0,5 mM de oxidante em PBS, pH 7,4, a 25°C.

4.1.4 Estudos da oxidação de outros compostos indólicos

Para um melhor entendimento do processo de emissão de luz durante a oxidação do triptofano por HOBr, realizamos estudos com outros derivados indólicos. Para isso foi utilizado o hormônio melatonina, o neurotransmissor serotonina e a forma acetilada do triptofano, ou seja, *N*-acetiltryptofano (Figura 8).

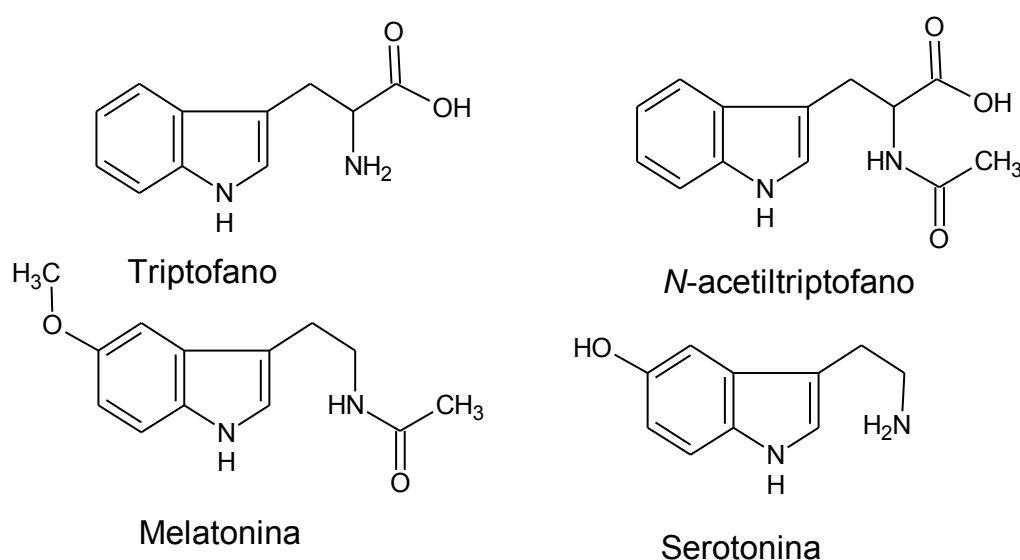


Figura 8: Estrutura dos derivados indólicos

Fonte: ACD/ChemSketch

Os resultados da Figura 9a demonstraram que, diferente do triptofano, estas biomoléculas quando oxidadas não produziram emissão de luminescência. Deve-se enfatizar que não se trata de ausência de oxidação, pois todos os compostos foram eficientemente oxidados, como pode ser verificado para o *N*-acetiltryptofano (Figura 9b). Observa-se também que a oxidação do *N*-acetiltryptofano resultou em apenas um produto majoritário, o que o difere totalmente do triptofano (Figura 7). Em conjunto, esses resultados sugerem que a emissão de luz é dependente da presença do grupo amino livre e, provavelmente, as reações secundárias responsáveis pela emissão estão a ele relacionados.

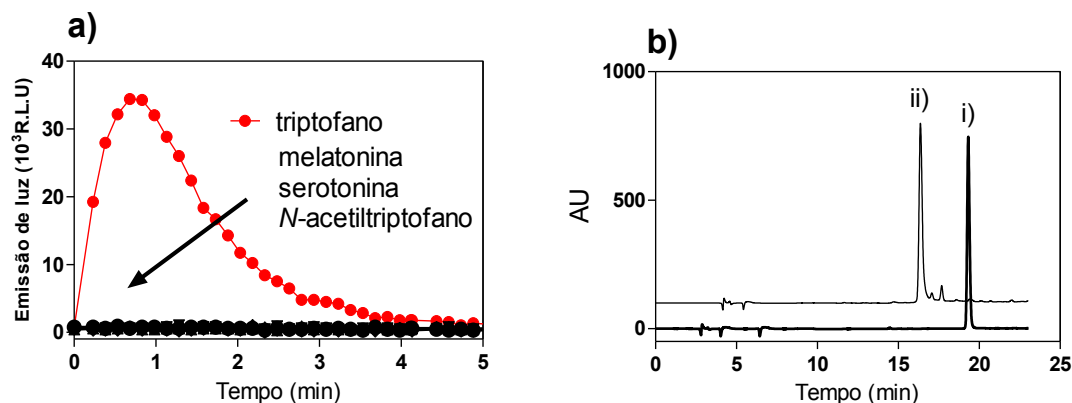


Figura 9: Oxidação das biomoléculas indólicas com ácido hipobromoso. (a) emissão de luz. (b) cromatografia líquida de alta eficiência após a oxidação do *N*-acetiltryptofano: (i) *N*-acetiltryptofano, ii) oxidação do produto de *N*-acetiltryptofano. A reação consistiu em 0,5 mM de derivados de indólicos e 0,5 mM de ácido hipobromoso em PBS, pH 7,4, a 25 ° C.

4.1.5 Avaliação do efeito da adição de taurina e alanina na oxidação do triptofano

A partir dos resultados precedentes, parecia evidente o envolvimento de produtos intermediários na geração de fluorescência e para isso o grupo α -amino precisava estar livre. Desta forma, estudamos o efeito de um segundo aminoácido adicionado à reação. Escolheu-se os aminoácidos alanina e taurina. Foi utilizado o injetor automático do luminômetro para não perder o início das reações. Os resultados apresentados na Figura 10 mostram que a oxidação do triptofano por HOBr na presença de taurina resultou em um aumento significativo na emissão de luz. Por outro lado, a presença de alanina não alterou a eficiência de emissão. No contexto aqui explorado, a diferença entre alanina e taurina está na estabilidade das espécies intermediárias formadas. Como se sabe, enquanto a taurina produz haloaminas relativamente estáveis, a alanina é degradada na presença dos ácidos hipo-halosos (DRABIK e NASKALSK, 2001). Diferente dos resultados com HOBr, a presença de taurina ou alanina não causou alteração na emissão de luz quando utilizado HOCl como oxidante (Figura 10c).

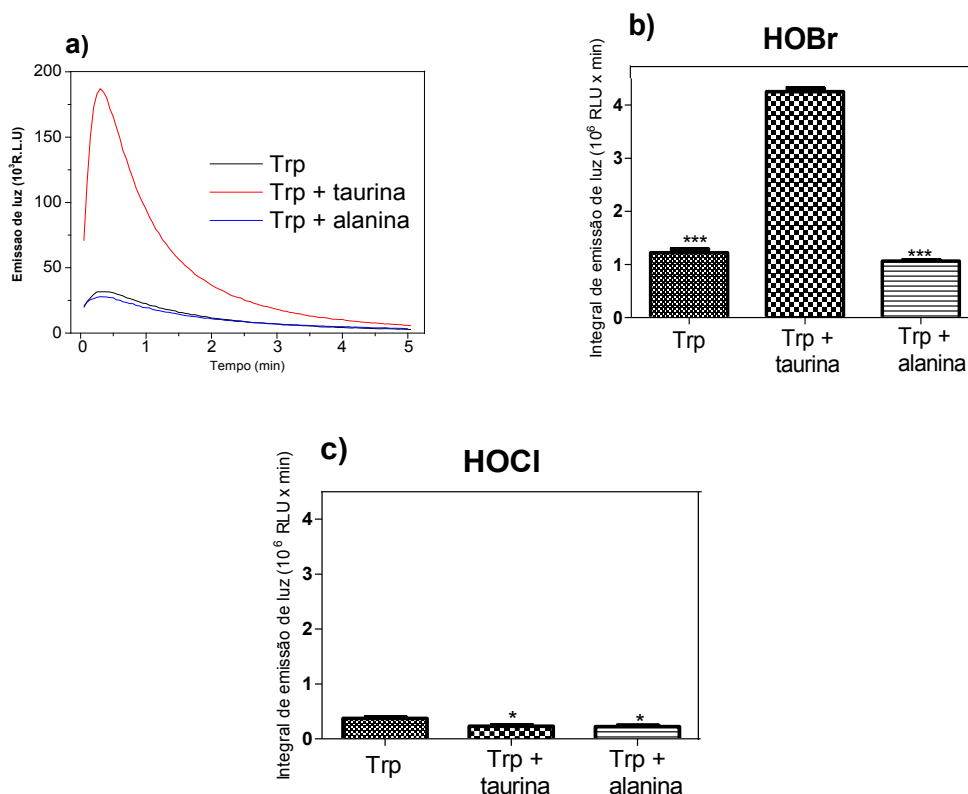


Figura 10: Efeito do aminoácido adicional na emissão de luz a partir da oxidação do triptofano. **(a)** Efeitos da taurina e alanina na emissão de luz. **(b)** Oxidação do triptofano por HOBr na presença de taurina e alanina respectivamente. ***($p < 0,001$) quando comparados com Trp + taurina usando ANOVA. **(c)** Oxidação do triptofano por HOCl na presença de taurina e alanina respectivamente. As misturas de reação consistiram em 0,5 mM de triptofano na ausência ou presença de 0,5 mM de alanina ou taurina e 0,5 mM dos oxidantes *($p < 0,05$) quando comparado com Trp usando ANOVA. A reação foi desencadeada por adição dos oxidantes através do injetor automático do luminômetro. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes.

4.1.6 Avaliação da quimiluminescência na oxidação de triptofano pelas haloaminas

Os resultados dos ensaios anteriores mostraram que a formação de bromaminas poderiam estar envolvidas na quimiluminescência observada na oxidação do triptofano por HOBr. Desta forma, preparamos as haloaminas, taurina di-bromamina (Tau-NBr₂) e taurina monobromamina (Tau-NHBr) pela mistura dos reagentes nas seguintes proporções: HOBr 5 mM e taurina 2,5 mM que leva à formação de Tau-NBr₂; HOBr 5 mM e taurina 50 mM, levando a formação de 90% Tau-NHBr e 10% de Tau-NBr₂ e HOBr 5 mM e 500 mM de taurina levando a formação de Tau-NHBr (HAWKINS et al., 2008).

A formação desses compostos foi confirmada por seus espectros de absorção na região do (UV). Os espectros na Figura 11 mostram a diferença entre a Tau-NBr₂ (banda

centrada em 241 nm) e Tau-NHBr (288 nm) e a mistura de ambas as formas (HAWKINS et al., 2008). Após a confirmação da síntese dos compostos utilizamos a equivalência molar de 1:1 triptofano:oxidantes para as reações de oxidação. Os resultados das oxidações demonstraram que Tau-NBr₂ foi o mais eficiente na emissão de luz a partir da oxidação de triptofano. No entanto, Tau-NHBr que possui um excesso de taurina na sua composição não foi um promotor eficiente na geração de luz quando comparado com Tau-NBr₂ e HOBr.

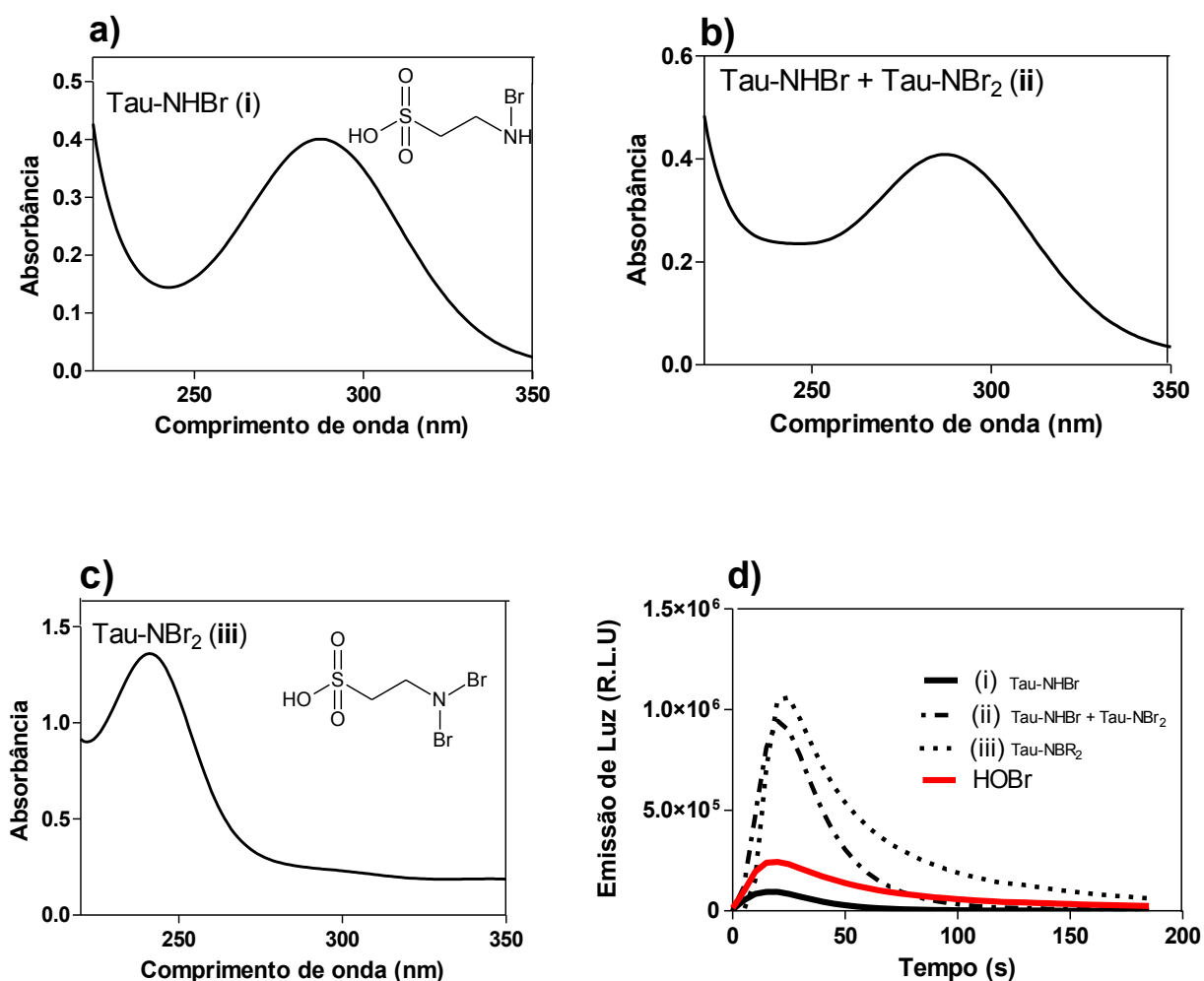


Figura 11: Quimiluminescência da oxidação do triptofano: haloaminas x HOBr. **a)** espectro na região do ultravioleta de Tau-NHBr (i), **(b)** Tau-NHBr + Tau-NBr₂, (ii) **(c)** Tau-NBr₂ (iii) **(d, e)** quimiluminescência da oxidação do triptofano. A reação foi desencadeada por adição dos oxidantes. **($p < 0,01$) quando comparado com (i), ***($p < 0,001$) quando comparados com todos os outros grupos usando ANOVA. As misturas reacionais consistiram em: 0,5 mM de triptofano e 0,5 mM dos oxidantes. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes.

4.1.7 Avaliação da quimiluminescência na oxidação de resíduos de triptofano na proteína albumina bovina

Tendo em vista todos os dados obtidos sobre a emissão de luz na oxidação do triptofano pelas haloaminas e seus precursores, nos propomos a estudar as oxidações de resíduos de triptofano em proteínas. Desta forma escolhemos inicialmente a albumina bovina que possui dois resíduos de triptofano (Trp-134 e Trp-213) (MORIYAMA et al., 1996). Os resultados obtidos na Figura 12 confirmaram os estudos anteriores pois, de fato, o HOBr e principalmente Tau-NBr₂ foram mais eficientes na geração de luz quando utilizados como oxidantes de resíduos de triptofano.

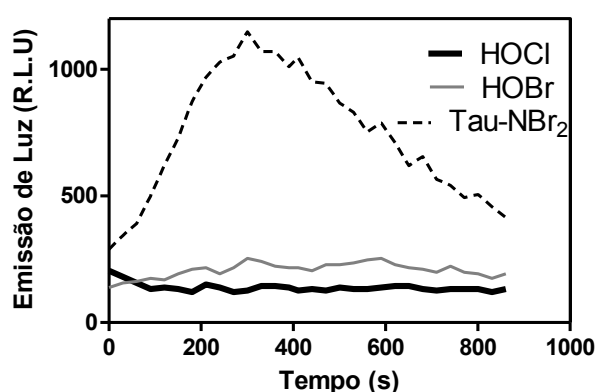


Figura 12: Quimiluminescência da oxidação da albumina bovina. A mistura reacional consistiu em 50 µM de albumina e 2 mM dos oxidantes. A reação foi desencadeada pela adição de oxidante através do injetor do luminômetro.

4.1.8 Proposta de mecanismo para a oxidação do triptofano

Após a identificação dos produtos secundários na Figura 7 (item 4.1.3, p. 49) gerados através da oxidação do triptofano pelo HOBr, foi possível montar uma proposta para a formação desses produtos. Ficou evidente pelo cromatograma que o intermediário DiOia estava aumentado após a oxidação do triptofano pelo HOBr. Esse fato não ocorreu na oxidação do triptofano pelo HOCl. Esses indícios levaram a acreditar que esse intermediário é o responsável pela emissão de luz.

- Formação do produto Oia. O HOBr faz um ataque no anel indólico do triptofano gerando-se as espécies intermediárias $^{\bullet}\text{HO}-\text{Br}^+$, posteriormente ocorre o rompimento dessa ligação saindo $-\text{OH}^{\bullet}$. A molécula de água faz um ataque nucleofílico no intermediário de reação liberando um próton. No intermediário formado ocorre a eliminação de HBr formando-se o tautômero com equilíbrio cetoenol oxindolalanina (Oia).

- Formação do produto Pic. O HOBr faz um ataque no anel indólico do triptofano, ciclizando e formando um anel de três membros com o Br⁺. O Nitrogênio faz um ataque no carbono C⁺ rompendo o ciclo. O [•]HO faz um ataque nucleofílico no C⁺ liberando o íon brometo e formando o intermediário 1,2,3,3a,8,8a-hexahidro-3a-Hidroxipirrolo[2,3-b]-indol-2-ácido carboxílico (Pic).
- Formação do produto NFK e Kyn: O HOBr faz a abstração de um H⁺ formando uma espécie radicalar. O radical sofre oxidação formando um anel de quatro membros. Assim com o deslocamento da nuvem eletrônica para o nitrogênio radicalar rompe-se a ligação dioxi do anel levando a formação da *N*-formilquinurenina (NFK). A *N*-formilquinurenina sofre a eliminação de um ácido gerando a quinurenina (Kyn).
- Formação do produto DiOia: Após ocorrer a formação do intermediário Oia, o mesmo sofre uma oxidação formando um radical, que sofre outra oxidação levando à formação do dioxindolalanina (DiOia).

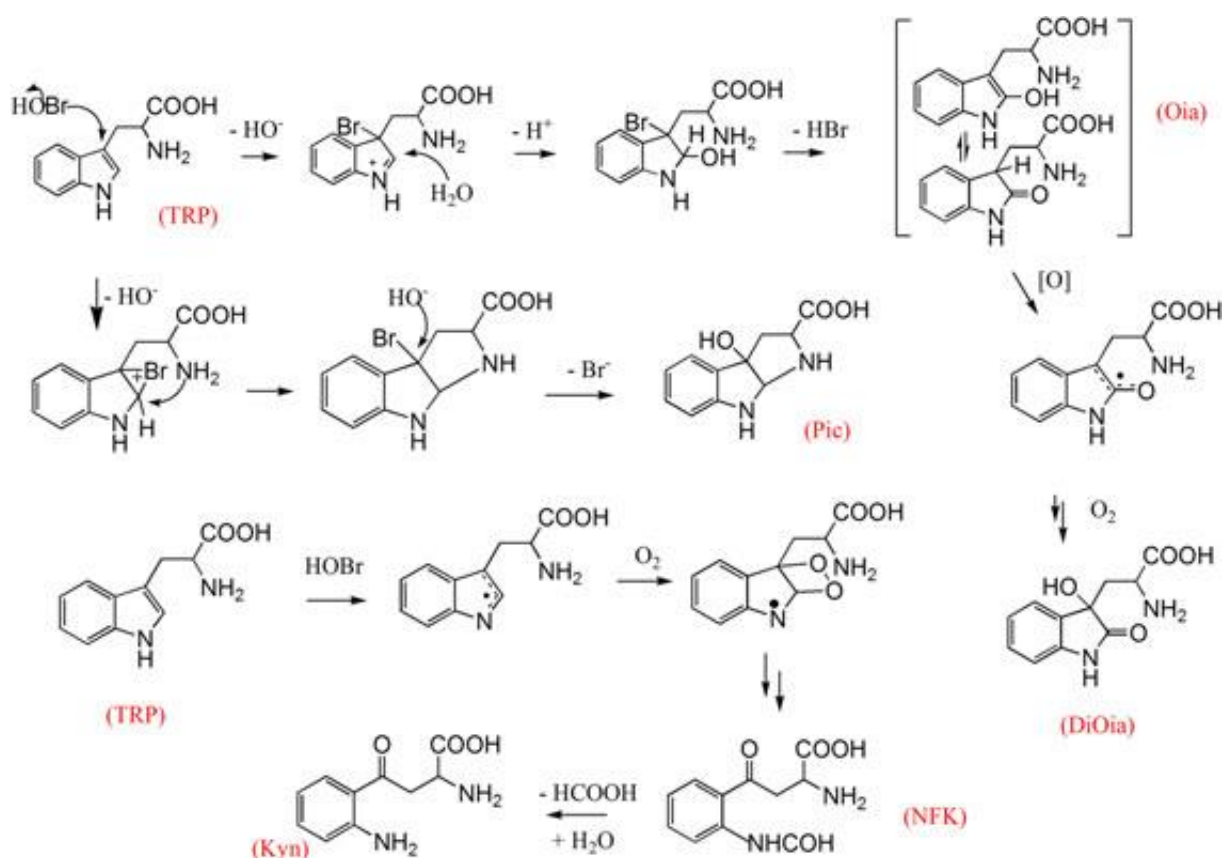


Figura 13: Proposta do mecanismo de oxidação do triptofano pelo HOBr.

4.2 Estudos da oxidação da lisozima

4.2.1 Avaliação da fluorescência intrínseca na oxidação de lisozima

Como demonstrado no item anterior, HOBr e suas haloaminas Tau-NBr₂ e Tau-NHBr, se comportaram de modo significativamente diferente no que diz respeito a oxidação de triptofano livre, ou mesmo como um resíduo em albumina. Tendo isso como ponto de partida, somado ao fato de que a lisozima é uma proteína útil para os estudos de formação de agregados amiloidais e também por possuir seis resíduos de triptofano, resolvemos estudar como a sua oxidação afetaria suas características estruturais.

Primeiramente, o estudo focou-se na fluorescência intrínseca da lisozima, que é resultado dos seus seis resíduos de triptofano. Na Figura 14a apresentamos o perfil cinético de depleção da fluorescência intrínseca da lisozima quando oxidada pelos ácidos hipohalosos e haloaminas. Utilizando um excesso molar de apenas 4 vezes de Tau-NHBr ou Tau-NBr₂ em relação a lisozima, já foi suficiente para depleção quase completa da banda de fluorescência. Por outro lado, HOCl e HOBr provocaram uma depleção de apenas 40% e 50% (Figura 14a e 14b). Além da diferença na eficiência da reação, foi observado que as reações com Tau-NHBr e Tau-NBr₂ eram mais lentas se comparado ao HOBr e HOCl, que instantaneamente depletaram o triptofano (Figura 14c). A reação com Tau-NHCl com lisozima causou apenas uma pequena diminuição na fluorescência, demonstrando ser um fraco oxidante.

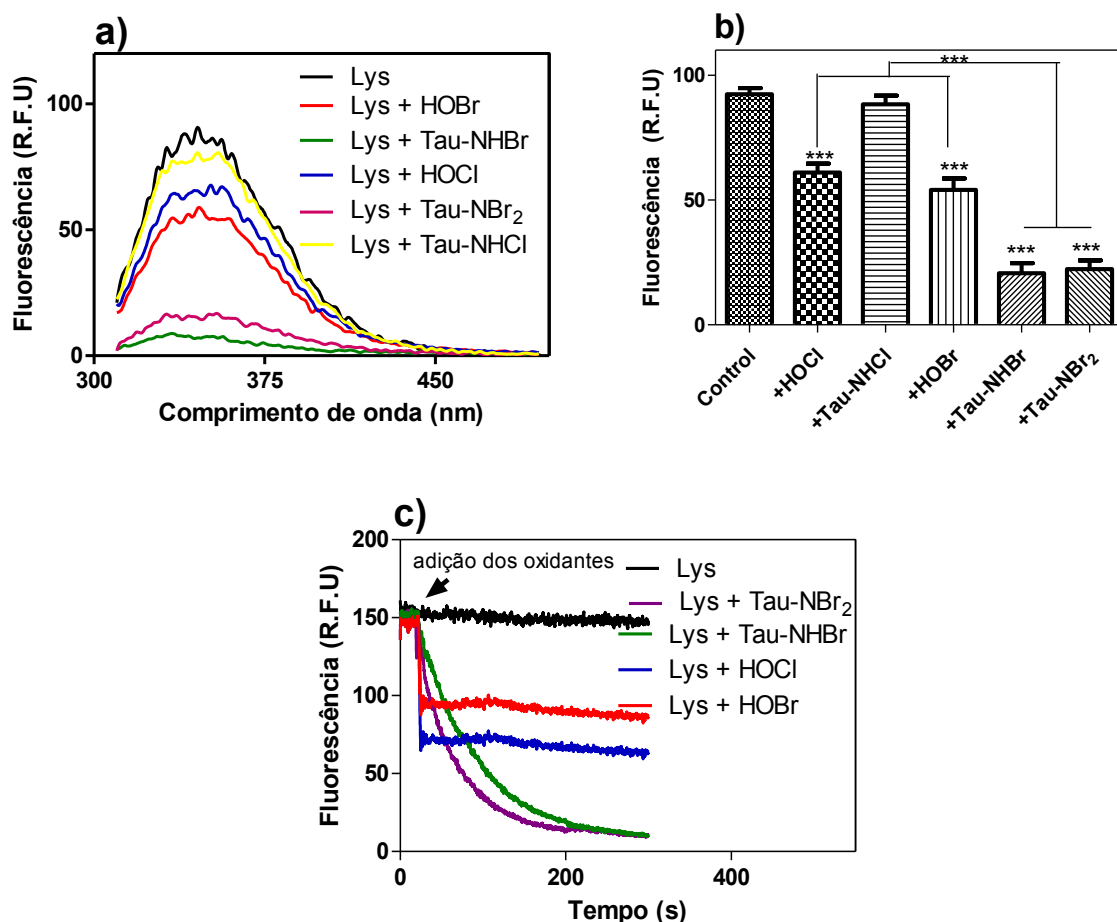


Figura 14: Depleção da banda de emissão do triptofano **a)** Depleção da fluorescência intrínseca da lisozima pelos ácidos hipo-halososo e haloaminas **b)** Oxidação relativa de lisozima pelos ácidos-halosos e haloaminas. ***($p < 0,001$) quando comparados com o Controle ou conforme indicado. **c)** Cinética de oxidação da lisozima e depleção da fluorescência intrínseca. As reações consistiram em 5 μM de lisozima e 20 μM de oxidantes em tampão de fosfato 10 mM, pH 7,0 em 25°C. Os espectros foram realizados em cinética de 5 minutos após a adição dos oxidantes (λ_{ex} 295 nm / λ_{em} 344 nm). Os resultados são apresentados como a média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes.

4.2.2 Estudos de inibição da atividade enzimática da lisozima

A lisozima é uma enzima extremamente importante no organismo humano tendo como principais funções: a atividade antimicrobiana e a atividade na resposta imune inata em processos infecciosos e inflamatórios (SWAMINATHAN et al., 2011). Os dados anteriores demonstraram indícios de seletividade das haloaminas na oxidação de resíduos de triptofano em proteínas. Partindo do pressuposto que o sítio ativo da lisozima contém três resíduos de triptofano (Trp 62, Trp 63 e Trp 108) e que os mesmos são essenciais para a sua atividade, avaliou-se então o efeito das oxidações causadas pelas

haloaminas e ácidos hipo-halosos na sua atividade enzimática. Neste ensaio, após a oxidação, a lisozima foi incubada com *M. lysodeikticus* e a sua atividade foi medida pela taxa de diminuição da absorbância a 450 nm, que é uma consequência da hidrólise das ligações glicosídicas β -1,4, entre o ácido *N*-acetilmurâmico e a *N*-acetilglucosamina na parede bacteriana e a diminuição da turvação do meio. Na Figura 15a foi possível observar o efeito da oxidação na cinética de hidrólise das ligações glicosídicas. Mais uma vez, uma diferença significativa entre os oxidantes foi observada, Tau-NHBr e Tau-NBr₂ foram mais eficazes como inibidores da atividade enzimática do que os ácidos precursores HOCl e HOBr. Esse fato se deve pela seletividade das haloaminas aos sítios de triptofano que estão localizados no sítio ativo da lisozima.

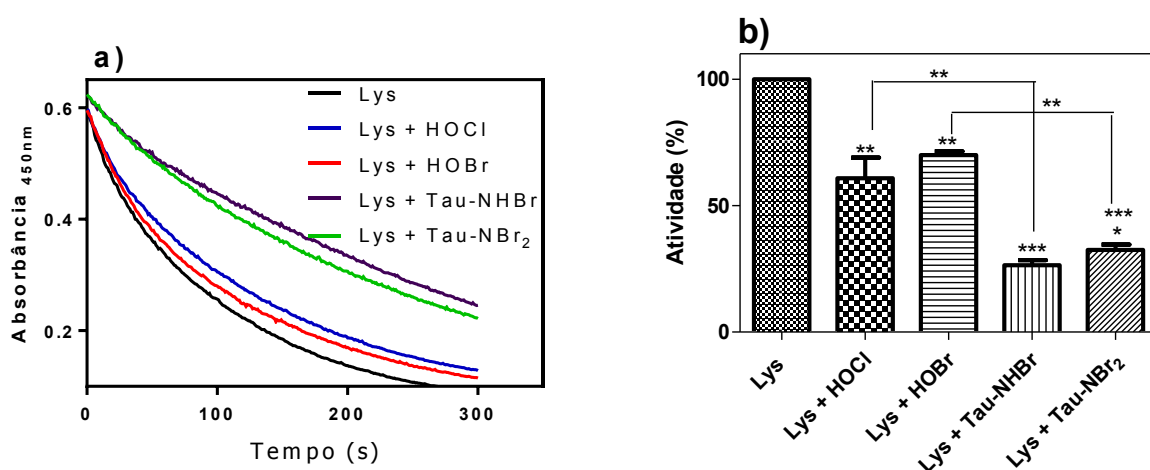


Figura 15: Inibição da atividade enzimática de lisozima provocado pela oxidação com os ácidos hipo-halosos e haloaminas: **a)** cinética de hidrólise das ligações glicosídicas na ausência e na presença de oxidantes **b)** perda relativa de atividade enzimática. *($p < 0,05$) quando comparado com Lys + HOCl, **($p < 0,01$) e ***($p < 0,001$) quando comparado com Lys ou conforme indicado usando ANOVA. As misturas reacionais consistiram em 5 μ M de lisozima e 20 μ M de oxidantes em tampão de fosfato 10 mM, pH 7,4 a 25°C. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes.

4.2.3 Avaliação da concentração relativa de grupos carbonílicos

Além de oxidar resíduos de triptofano, é sabido que ácidos hipo-halosos oxidam proteínas levando à formação de grupos carbonílicos. Os produtos carbonílicos são formados quando ocorre fragmentação das cadeias laterais e oxidação dos aminoácidos treonina, prolina, arginina e lisina (BERLETT e STADTMAN, 1997). Por esta razão estudamos a sua formação em nossos modelos de oxidação.

Os resultados apresentados na Figura 16 demonstram que Tau-NHBr foi menos eficaz na geração de grupos carbonílicos. Diferentemente de Tau-NHBr, a Tau-NBr₂ e o seu precursor HOBr mostraram-se potentes geradores de grupos carbonílicos. Esses dados já eram esperados uma vez que a reação de HOBr com proteínas pode resultar na formação desses produtos (SHARMA e ROKITA, 2012). Como esperado, e observado nos experimentos, a Tau-NHCl não foi um bom oxidante, não gerando grupos carbonílicos diferentemente de seu precursor HOCl que assim como o HOBr é um forte indutor de grupos carbonílicos.

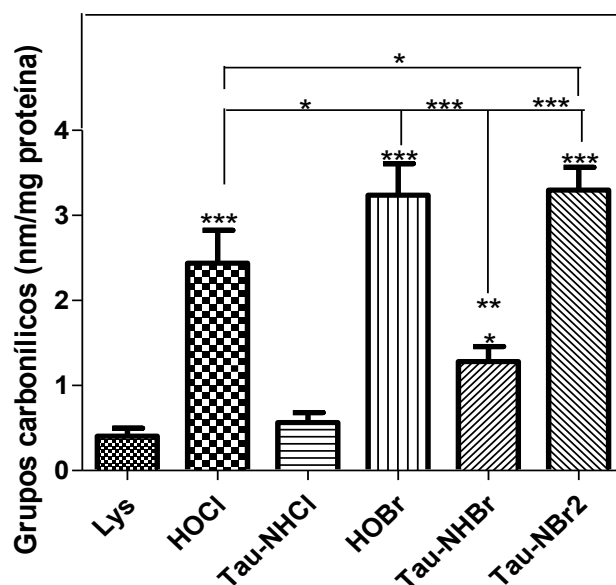


Figura 16: Produção de grupos carbonílicos na oxidação da lisozima. As reações consistiram em 50 μ M de lisozima e 200 μ M de oxidantes em tampão fosfato 10 mM, pH 7,0 a 25°C. Os grupos carbonílicos foram mensurados como derivados de hidrazona em DNPH e expressos em nmol/mg de proteína. *($P < 0.05$), **($P < 0.01$) e ***($P < 0.001$) quando comparados com Lys ou conforme indicado usando ANOVA. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes.

4.2.4 Avaliação de alterações estruturais por espalhamento de luz e fluorescência de ANS

Após a oxidação da enzima com os ácidos hipo-halosos, verificou-se que visualmente havia turvação do meio reacional. Esses dados indicaram a agregação da lisozima. Para as haloaminas não foi observado visualmente qualquer tipo de alteração. Os resultados apresentados na Figura 17 mostraram as alterações espectrais causadas pelas haloaminas e ácidos hipo-halosos após a oxidação da proteína. As misturas reacionais consistiram em 5 μ M lisozima e 20 μ M oxidantes em tampão fosfato 10 mM, pH 7,0 a 25°C. A oxidação da

proteína foi monitorada através das alterações na banda centrada em 280 nm no UV-Vis, com espectros sequenciais a cada minuto. As Figuras 17a e 17b mostram que a adição das haloaminas provocou uma diminuição na banda centrada em 280 nm. Para o HOBr foi observado um aumento na linha de base devido ao desenvolvimento de turbidez no meio de reação. Na Figura 17c demonstrou-se o espalhamento de luz quando a amostra é excitada em 280 nm e emissão varrida na faixa 270-300 nm (espalhamento Rayleigh). Assim foi possível observar que a oxidação da proteína por HOCl e por HOBr resultou numa alteração significativa na estrutura da proteína indicando a formação de agregados. Para as haloaminas, Tau-NHBr e Tau-NBr₂ isso não ocorreu, embora os resíduos de triptofano tenham sido oxidados com maior eficiência.

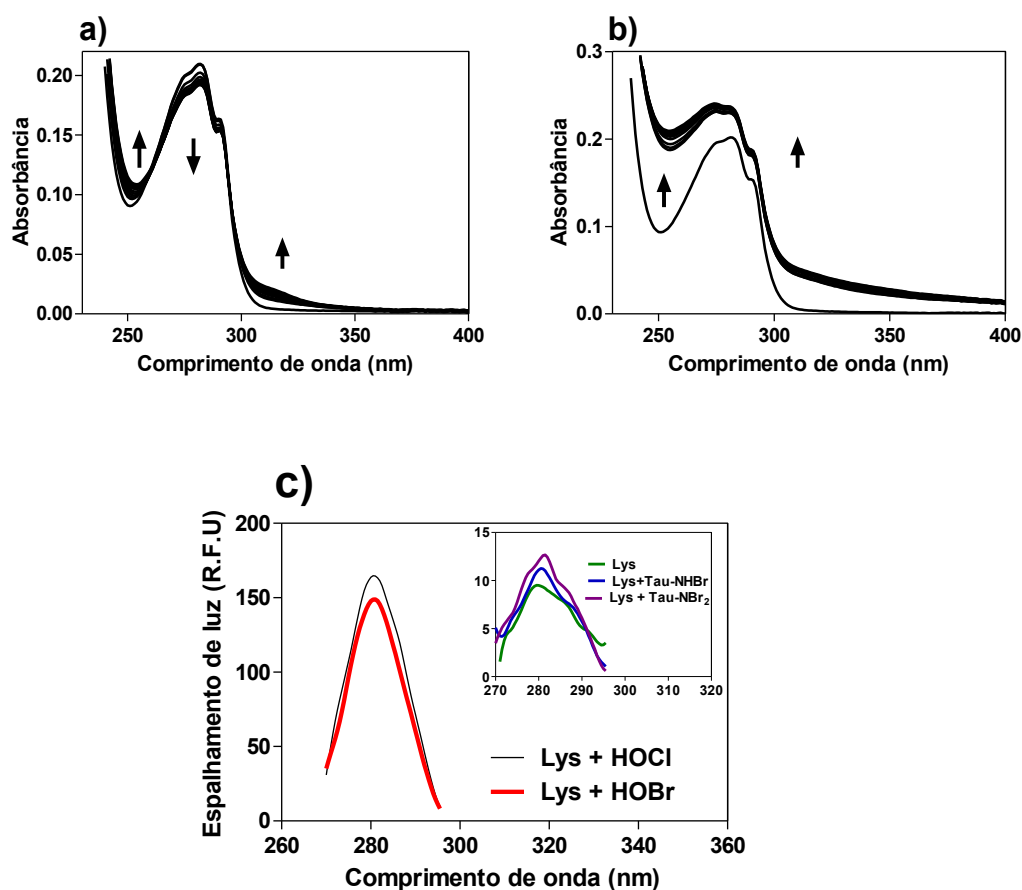


Figura 17: Depleção da banda intrínseca no UV-vis de lisozima e espalhamento de luz. **a)** oxidação de lisozima por Tau-NHBr **b)** oxidação de lisozima por HOBr **c)** espalhamento de luz da lisozima após a oxidação. As misturas reacionais consistiram em 5 μ M lisozima e 20 μ M oxidantes em tampão fosfato 10 mM, pH 7,0 a 25°C. Os espectros foram realizados em intervalos de 1 min.

As alterações estruturais da lisozima foram também estudadas no contexto de exposição de sítios hidrofóbicos após a oxidação. Para isso os estudos foram realizados utilizando a sonda fluorescente ANS que se caracteriza pelo aumento na eficiência da fluorescência quando está em contato com sítios hidrofóbicos em proteínas. Para garantirmos que não havia excesso de oxidantes no meio reacional, adicionamos o aminoácido metionina para agir como supressor dos oxidantes em excesso e assim prevenir que a sonda seja oxidada.

Inicialmente estes estudos foram realizados em pH 7,0 como utilizado em todos os experimentos anteriores. No entanto a lisozima se mostrou pouco sensível à presença de ANS neste pH. Por esta razão, os experimentos foram iniciados em pH 9,2 pois tínhamos indicações de que neste pH essa proteína era mais susceptível a sondas fluorescentes. Como pode ser observado, em pH alcalino houve, de fato, um aumento na eficiência da fluorescência (Figuras 18a e 18b).

Os resultados apresentados na Figura 18 mostram ainda uma diferença significativa na fluorescência após oxidação, sendo que a Tau-NBr₂ causou uma alteração mais significativa na fluorescência do ANS. Pode-se ainda observar um deslocamento das bandas de fluorescência para regiões de menor comprimento de onda, o que sugere a exposição da sonda ANS a sítios hidrofóbicos na proteína após a oxidação com as haloaminas. Esse fenômeno pode ser chamado de “*Blue Shift*” (HAWKE et al., 2008).

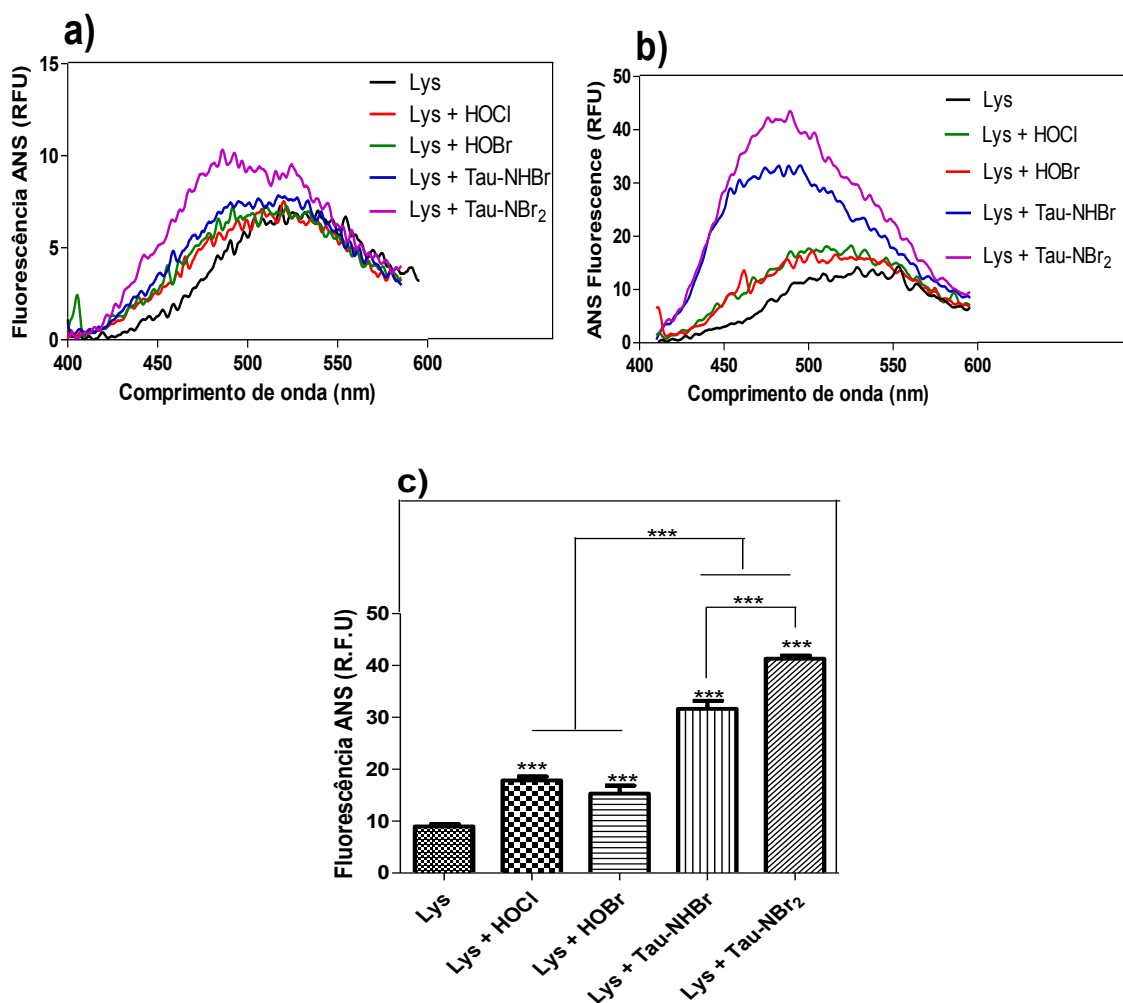


Figura 18: Aumento da fluorescência do ANS na lisozima provocada pela oxidação: **a)** medidas em tampão glicina pH 7,0 **b)** medidas em tampão glicina pH 9,2. **c)** efeitos da sonda ANS em pH 9,2 na oxidação da lisozima ***($p < 0,001$) quando comparados com Lys ou conforme indicado usando ANOVA. As misturas reacionais consistiram em 5 μM de lisozima, 20 μM e 90 μM de ANS em tampão fosfato 10 mM pH 7,0. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes.

4.2.5 Avaliação da anisotropia de fluorescência da lisozima oxidada

Considerando os resultados acima e que demonstravam que havia a formação de agregados quando a lisozima era oxidada, foi realizado experimentos com o intuito de avaliar a alteração na anisotropia de fluorescência do meio. As medidas de anisotropia podem indicar, além de outras propriedades, uma medida da dimensão molecular, pois estruturas poliméricas ou agregados, que é o caso, possuem maior dificuldade de rotacionar no meio e, portanto, maior anisotropia.

Os resultados apresentados na Figura 19 confirmaram os ensaios de espalhamento de luz feitos anteriormente, pois a oxidação por HOCl e HOBr foi significativamente mais eficaz na promoção da agregação da lisozima o que acarretou no aumento de anisotropia do sistema.

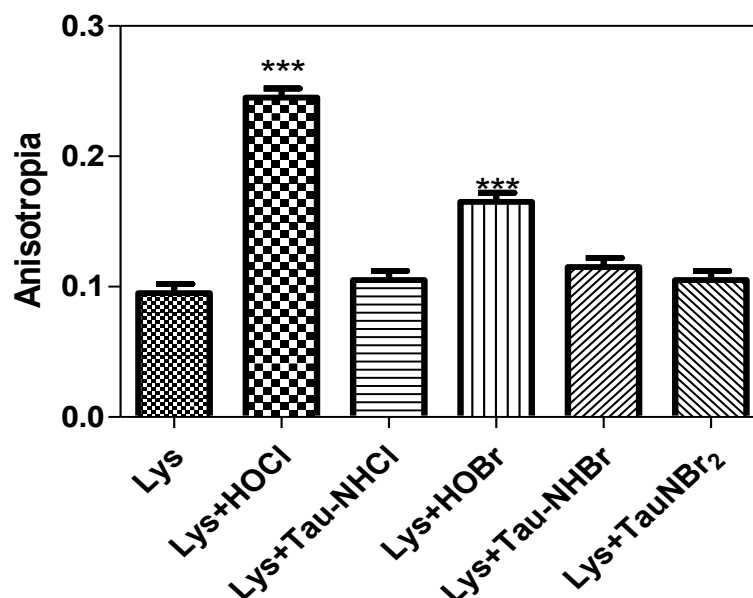


Figura 19: Aumento da anisotropia lisozima-ANS provocado pela oxidação ***($P < 0.001$) quando comparados com todos os grupos usando ANOVA. As misturas reacionais consistiram de 5 μM de lisozima, 20 μM de oxidantes e 90 μM ANS em pH 9,2. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ DP de 3 experimentos independentes.

4.2.6 Verificação da formação de fibras amiloidais: Tioflavina T

A agregação de uma proteína pode ser um indício da formação de fibras amiloidais. Um método para detecção da presença de fibras amiloidais é o aumento de fluorescência da sonda Tioflavina T, a qual possui elevada afinidade por fibras amiloidais em proteínas e resulta em um aumento de sua fluorescência quando ligada as mesmas (MOOSAVI-MOVAHEDI et al., 2007).

Para maior certeza da formação dessas fibras, foi reproduzido um método utilizado para induzir a formação desses agregados amiloidais em proteínas. Trata-se da incubação da proteína com o agente desnaturante SDS em pH alcalino (JAIN et al., 2011). O resultado apresentado na Figura 20a mostra o aumento da fluorescência da Tioflavina-T quando a lisozima foi incubada com SDS.

Assim, tendo em mãos estes controles experimentais, passamos aos estudos, onde a proteína foi inicialmente oxidada nas diferentes condições aqui empregadas e então diluída

em tampão pH 9,2 e adicionado Tioflavina T. Na Figura 20, observamos que a oxidação prévia da lisozima também causou um aumento na fluorescência de Tioflavina T, o que é um indicativo da formação de fibras amiloidais. O resultado mais significativo foi obtido com a oxidação com HOCl seguido de HOBr. Estes resultados coincidem com aqueles obtidos nos ensaios de espalhamento de luz e anisotropia.

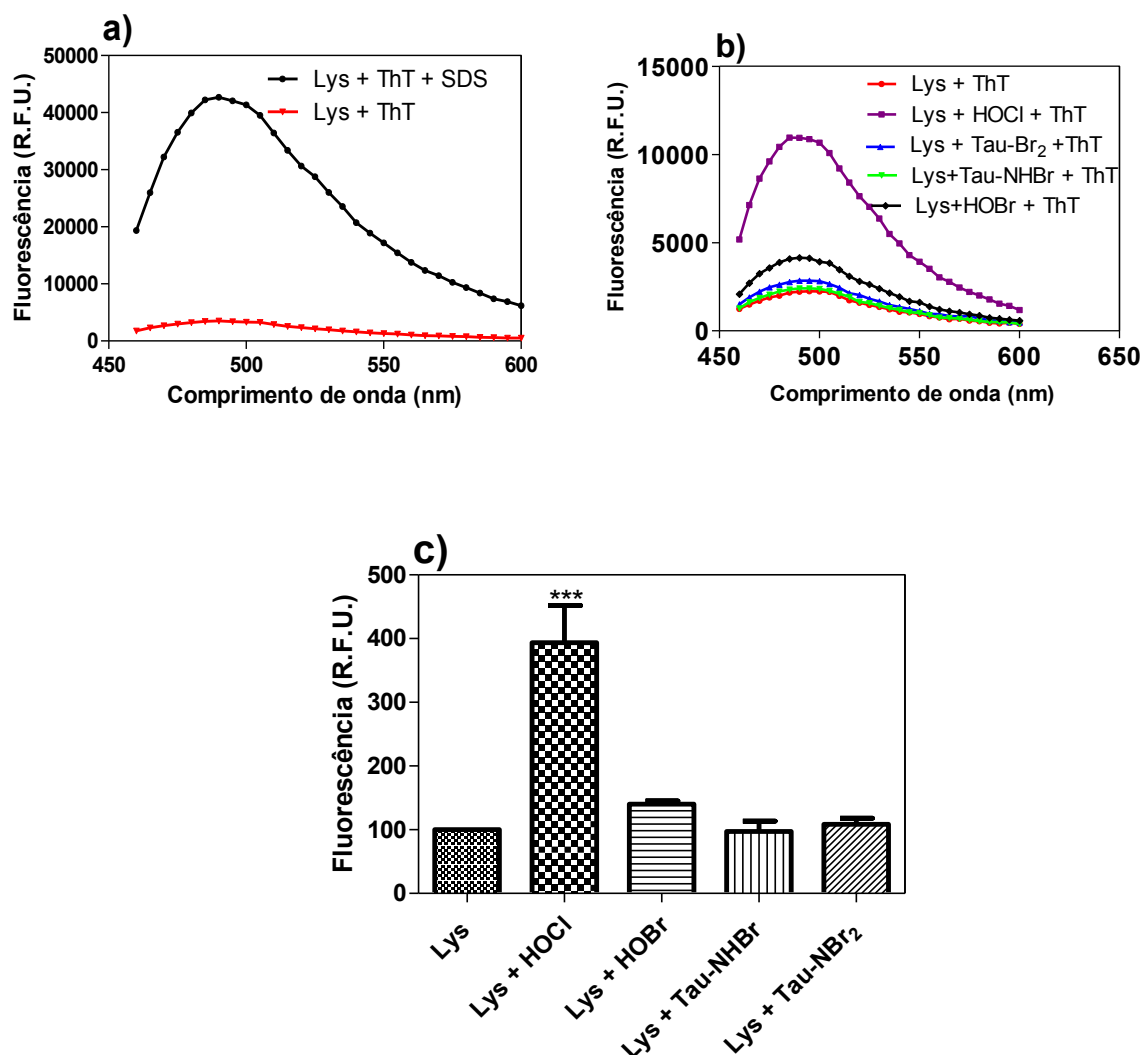


Figura 20: Espectros de emissão de fluorescência de Tioflavina T: **a)** efeito do SDS sobre a lisozima em pH 9,2. **b)** efeito do SDS sobre a lisozima oxidada com os ácidos HOCl e HOBr e as haloaminas Tau-NHBr e Tau-NBr₂ em pH 9,2. **c)** efeito na fluorescência de Tioflavina T na lisozima quando oxidada em pH 9,2. ***($P < 0.001$) quando comparado os outros grupos usando ANOVA. As reações foram feitas com 50 μ M de lisozima para 200 μ M de oxidantes em tampão fosfato 10 mM pH 7,0, incubados por 30 minutos em temperatura ambiente sob leve agitação.

Em um segundo conjunto de experimentos, foi analisado como a adição de SDS poderia alterar a fluorescência da Tioflavina T em uma amostra de lisozima já oxidada. Os

resultados apresentados na Figura 21a e 21b mostraram a banda de fluorescência antes e depois da adição de SDS, respectivamente. Como pode ser observado, a oxidação por Tau-NHBr impediu parcialmente que a adição de SDS provocasse um aumento significativo na fluorescência da Tioflavina T, o que sugere uma inibição na formação do agregado amiloidal.

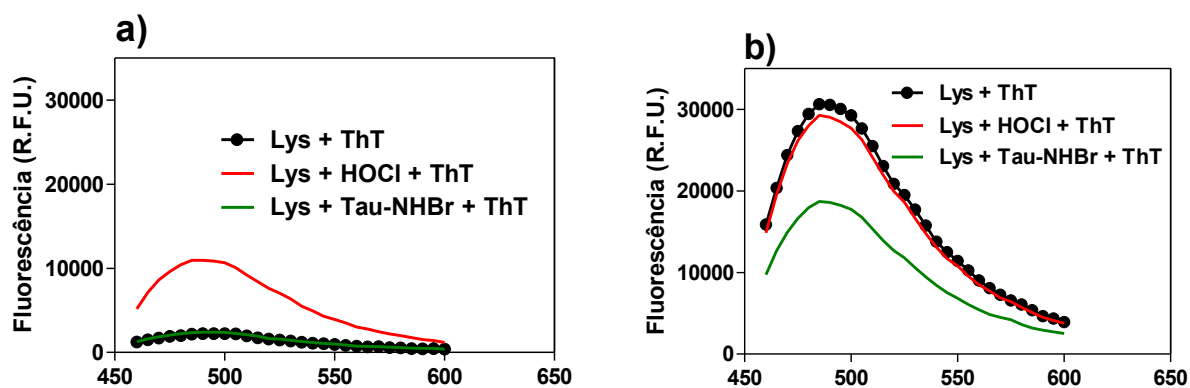


Figura 21: Efeito de SDS sobre o espectro de emissão de fluorescência de Tioflavina T **a)** Oxidação de lisozima por HOCl e Tau-NHBr na formação de fibras amiloides. **b)** Adição de SDS após a oxidação. A lisozima foi oxidada a pH 7,0 e diluiu-se 10 vezes em tampão de glicina a pH 9,2 com 300 μ M de SDS.

5. DISCUSSÃO

5.1 Estudos da oxidação do triptofano

A emissão ultra-fraca de luz através da oxidação de biomoléculas pode ser considerada uma ferramenta importante na análise de oxidações endógenas e exógenas. Moléculas indólicas estão presentes em todos os organismos vivos, como exemplo: triptofano em proteínas, serotonina como neurotransmissor e melatonina como neuro-hormônio. Essas moléculas participam de diversas reações no organismo, podendo ser oxidadas principalmente por espécie reativas de oxigênio (EROs). Essas reações merecem uma atenção especial, pois são frequentemente associadas a processos quimiluminescentes. Diversos exemplos podem ser citados, tais como: oxidação de melatonina catalisada por peroxidases (SILVA et al., 2000) oxidação de triptofano por HOCl (ASPÈE et al., 2002), peroxinitrito (POLLET et al., 1998) e oxigênio singlete (ALARCON et al., 2007).

Para compreender melhor as diferentes características químicas entre os ácidos hipo-halosos HOCl e HOBr, foi necessário entender que são potentes oxidantes endógenos e ambos foram capazes de oxidar grupos indólicos (XIMENES et al., 2005). Nesta tese, foram utilizadas técnicas de fluorescência e quimiluminescência para avaliar a oxidação do triptofano. Assim, o triptofano foi instantaneamente oxidado por ambos oxidantes HOCl e HOBr. No entanto, observou-se apenas um consumo parcial do triptofano, o qual pode ser facilmente explicado, uma vez que o produto primário oxidado pode ser oxidado posteriormente, resultando em vários outros produtos. Desta forma, pode-se sugerir que a emissão de luz está relacionada com a formação de produtos secundários após a oxidação do triptofano. Esse fato não é novo, foi descrito anteriormente que a oxidação do triptofano pelo radical hidroxil gerava produtos secundários (ROSÁRIO et al., 2003). Análise dos produtos formados após a oxidação do triptofano pelos ácidos hipo-halosos mostrou uma diferença significativa entre os ácidos. Os produtos de oxidação identificados tendo como base resultados semelhantes descritos na literatura foram: *N*-formilquinurenina, quinurenina, oxindolalanina e 1,2,3,3a, 8,8a-hexa-hidro-3a-hidroxipirrólo [2,3-b] indol-2-carboxílico (SALMINEN e HEINONEN, 2008). Esses produtos foram diminuídos pelo HOBr como oxidante ou quando o HOBr foi adicionado na reação após a oxidação por HOCl. Estes resultados indicaram que a maior eficiência na emissão de luz pode estar relacionada com a oxidação destes compostos. Verificou-se também um aumento do composto DiOia após a adição do HOBr na reação de oxidação do HOCl. Através desses dados foi possível propor que o composto DiOia foi o responsável pela emissão de luz. Assim, também foi demonstrado que a velocidade de

formação da reação secundária foi coincidente com a cinética da emissão de luz, quando utilizado HOBr.

Os estudos de luminescência com as biomoléculas análogas do triptofano (melatonina, *N*-acetiltryptofano e serotonina) demonstraram que existe a necessidade do grupo α -amino estar livre para que ocorra uma maior eficiência na emissão de luz. Essas biomoléculas possuem o grupo α -amino bloqueado o que foi preponderante para que não ocorresse a emissão de luz. Está bem relatado na literatura que as cloraminas são oxidantes brandos quando comparados com HOCl, e assim, a formação deste tipo de intermediário provavelmente implica numa baixa reatividade das moléculas frente ao triptofano. Inversamente, as bromaminas são significativamente mais reativas do que as cloraminas (XIMENES et al., 2011), e assim, a sua produção implica em maior eficiência na formação de reações secundárias. De acordo com este conceito, a emissão de luz era ainda mais eficiente utilizando Tau-NHBr e Tau-NBr₂ como oxidantes, e ao contrário das bromaminas a oxidação do triptofano por Tau-NHCl foi completamente ineficaz na emissão de luz.

Ficou evidente nos experimentos de luminescência que o grupo α -amino livre estava envolvido com a formação de reações secundárias. Essa afirmação ficou ainda mais clara quando a forma acetilada do triptofano, o *N*-acetiltryptofano foi oxidada, pois foi possível observar através de cromatografia líquida de alta eficiência a formação de um produto majoritário comprovando a não ocorrência de reações secundárias. Esses dados nos levaram a fazer a seguinte pergunta: Por que a formação das bromaminas estava envolvida na emissão de luz? Uma proposta plausível seria o envolvimento de radicais livres na homólise da ligação N-Br. De fato, a emissão de luz gerada após a oxidação do triptofano com HOCl pode ser atribuída a reações secundárias mediadas por cloraminas (ASPEE e LISSI, 2002).

A maior reatividade das bromaminas na oxidação do grupo α -amino também pode explicar as oxidações subsequentes. Um desses compostos é oxindolalanina, a sua ausência após oxidação por HOBr sugere a sua conversão em DiOia. Os estudos relacionados com a adição da taurina no meio reacional mostraram um aumento na emissão de luz. Esses dados também podem ser explicados levando em conta o envolvimento de radicais livres como espécies intermediárias de reação responsáveis pela emissão de luz.

O aminoácido triptofano também foi oxidado como resíduo em proteína. A proteína albumina bovina foi oxidada com os ácidos hipo-halosos e haloaminas e também foi

verificado um aumento significativo na emissão de luz quando a albumina bovina foi oxidada com Tau-NBr₂.

5.2 Estudos de oxidação da lisozima

O dano oxidativo em proteínas está envolvido com inúmeras doenças inflamatórias e degenerativas (GARCIA et al., 2012). Em processos inflamatórios e infecciosos a ativação da resposta imune inata libera uma gama de moléculas oxidantes no organismo e entre essas moléculas estão os ácidos hipo-halosos HOCl e HOBr. Em altas concentrações esses agentes oxidantes podem causar danos em proteínas oxidando vários aminoácidos entre eles estão: cisteína, metionina, tirosina e triptofano (SZUCHMAN-SAPIR et al., 2010). Neste contexto, muitas evidências apontam a oxidação do triptofano como um biomarcador de oxidação em proteínas, sendo possível desenvolver métodos imunológicos para avaliar essa alteração e sua correlação com doenças inflamatórias e degenerativas (EHRENSHAFT et al., 2009). Alguns oxidantes endógenos apresentam seletividade em relação à oxidação de triptofano em proteínas. Este é o caso do *ácido hipotiocianoso* (HOSCN), que é produzido pela oxidação do ânion tiocianato (SCN⁻), por meio de catálise da enzima mieloperoxidase (MPO) de neutrófilos ou peroxidase eosinofílica (EPO) de eosinófilos (HAWKINS et al., 2008). Assim como o ácido hipotiocianoso tem afinidade pela oxidação de resíduos de triptofano, foi demonstrado recentemente que a haloamina Tau-NHBr apresentou seletividade para a oxidação de resíduos de triptofano na proteína albumina bovina (XIMENES et al., 2011).

Nesta tese, obtivemos evidências de que resíduos de triptofano na proteína lisozima também são preferencialmente oxidados por Tau-NHBr. Entretanto, Tau-NBr₂ também foi eficaz na oxidação do triptofano na proteína. Isto é relevante uma vez que Tau-NBr₂ é produzida sem excesso de taurina e pode ser facilmente produzida em sítios inflamatórios, onde existe uma grande concentração de neutrófilos e/ou eosinófilos, que são fontes importantes de HOBr e taurina (BEHE et al., 2007). Os ácidos hipo-halosos apresentaram uma cinética de oxidação mais rápida na depleção da fluorescência do triptofano quando comparado com as haloaminas e isso reflete na baixa eficácia dos ácidos hipo-halosos em relação à seletividade apresentada pelas haloaminas nos sítios de triptofano. As haloaminas Tau-NHBr e Tau-NBr₂ foram mais eficazes como inibidores da atividade enzimática da lisozima, quando comparado com os ácidos precursores HOCl e HOBr. A redução no decaimento da turvação indica comprometimento na atividade da enzima e evidencia a hidrólise das ligações glicosídicas β -1,4, entre o ácido *N*-acetil

murâmico e a *N*-acetilglucosamina na parede bacteriana do *M. lysodeikticus* provocados pelas bromaminas. Esses dados confirmaram a seletividade das haloaminas por resíduos de triptofano, uma vez que, os resíduos Trp 62, Trp 63 e Trp 123 fazem parte do sítio ativo da enzima e estão diretamente envolvidos na ligação da enzima aos seus substratos (WIERZCHOWSKI, 1997). KURODA e colaboradores (1975) demonstraram que oxidação de Trp 62 pelo ozônio levou à formação do derivado *N*-formilquinurenina e também provocou a inativação da enzima. Esse produto apresentou uma banda *UV-vis* centrada em 322 nm. Essa banda também foi visível quando a lisozima foi oxidada com bromaminas, o que não ocorreu com os ácidos hipo-halosos.

A formação de produtos carbonílicos está relacionada à fragmentação das cadeias laterais e oxidação dos aminoácidos treonina, prolina, arginina e lisina (BERLETT e STADTMAN, 1997). Neste contexto, os produtos carbonílicos formados na lisozima estão ligados principalmente à oxidação dos grupos α -aminos, onde os ácidos HOCl e HOBr são mais eficazes na promoção da oxidação quando comparados com as haloaminas (HIMMELFARB et al., 2000). A diferença entre os ácidos hipo-halosos e as bromaminas no que diz respeito à oxidação também teve efeito sobre a estrutura da lisozima. Os ácidos provocaram forte agregação na proteína, que foi evidenciado pelo desenvolvimento de turbidez, espalhamento de luz e anisotropia. Os estudos de turbidez demonstraram que a oxidação da lisozima pelo HOBr desenvolveu turbidez, esse achado é um indicativo da formação de agregados. A formação de agregados também foi observada através dos experimentos de espalhamento de luz. A oxidação da lisozima causou um aumento no espalhamento de luz para HOCl e HOBr e não ocorreu para as haloaminas.

Para confirmar os resultados de espalhamento de luz e turbidez foi utilizado a sonda ANS. A sonda ANS se liga a proteínas em ambientes apolares aumentando a intensidade da fluorescência provocando o deslocamento da banda para o azul do espectro "*blue shift*" e essas alterações ocorrem por conta do desdobramento da proteína e a exposição dos sítios hidrofóbicos. (HAWE et al., 2008). A oxidação da proteína pelas bromaminas também produziu fortes diferenças em relação à emissão de fluorescência da sonda ANS. A lisozima também foi oxidada em tampão glicina pH 7,0 e nesse pH demonstrou pouca sensibilidade a sonda ANS (HUNG et al., 2010). Assim a proteína foi oxidada pelas bromaminas em tampão glicina pH 9,2 e os resultados revelaram um aumento significativo na fluorescência da sonda ANS, efeito esse não observado na oxidação da proteína com os ácidos precursores.

Esta diferença entre os ácidos e as haloaminas foi similar ao processo de desdobramento da lisozima mediada pelo aumento do pH (HAMEED et al., 2007). Em pH 12,75 a lisozima assumiu um estado de *molten globule* que possui alta afinidade pela sonda ANS. No entanto, em pH 13,2 a proteína se desdobrou totalmente e assim a sua afinidade pelo ANS foi diminuída (HAWKINS et al., 2008). Desta forma, a diminuição da fluorescência do ANS para a lisozima oxidada com os ácidos hipo-halosos poderia estar relacionada com um grau maior de desdobramento da proteína em relação à oxidação mais suave provocada pelas bromaminas. Assim, foi utilizado a lisozima nativa para a realização dos experimentos. Esse controle indicou uma menor fluorescência da sonda e essa característica foi relacionada a não exposição dos grupos hidrofóbicos que estavam internalizados na enzima, uma vez que a mesma possui uma estrutura dobrada e compacta. Os agregados formados através da oxidação da lisozima pelos ácidos hipo-halosos HOCl e HOBr apresentaram propriedades espectroscópicas que sugeriram a formação de fibras amiloides. Dados semelhantes já haviam sido descritos na literatura. Pesquisadores demonstraram que a oxidação das proteínas lisozima e STI (inibidor de tripsina de soja) foram submetidas à oxidação com o HOBr e esse estudo demonstrou que baixas concentrações molares de HOBr podem levar a inativação de ambas enzimas assim como, resultar na formação de agregados amiloidais (HAWKINS e DAVIES, 2005a).

As fibras amiloides têm como característica grande concentração de folhas β . As folhas β das cadeias laterais possuem resíduos de aminoácidos orientadas alternadamente para um e outro lado da folha- β . Esse arranjo é mantido ao longo das folhas- β paralelas e anti-paralelas. Na estrutura fibrilar, as cadeias laterais das diferentes faces da folha- β , formam canais com orientação paralela ao eixo principal da fibra amilóide e perpendicular às cadeias β (SALEMME, 1983). A largura desses canais é estimada em cerca de 6,5 a 6,95 angstrom (SALEME, 1983). Sabendo-se desses dados utilizou-se a sonda Tioflavina T para a detecção das fibras amiloides. A sonda Tioflavina T se posiciona nos canais da folha - β com o seu eixo maior paralelo ao eixo das fibras (KREBS et al., 2005). Assim, o aumento de fluorescência da Tioflavina T observado na presença de fibras amilóides, não se deve à ligação regular das moléculas da sonda, mas sim à limitação do espaço físico disponível para a Tioflavina T e consequente restrição da sua dinâmica molecular. Desta forma, a oxidação da lisozima utilizando os ácidos hipo-halosos mostrou um aumento na emissão da fluorescência da Tioflavina T quando as fibras foram excitadas em 440nm e esse dado indicou a formação das fibrilas amiloides. No entanto, com as haloaminas a banda de emissão de fluorescência da sonda em 485

nm foi menos intensa, quando comparada com os ácidos. Então surgiu a seguinte pergunta: Por que a oxidação dos sítios de triptofano na lisozima pelas bromaminas eram menos eficazes na formação de agregados amiloidais? Uma possível explicação reside na necessidade do aminoácido triptofano fazer interações proteína-proteína. Sabe-se que, o triptofano é o resíduo predominante em (21%) dos locais que promovem as associações de proteína-proteína, e isso corrobora com a facilidade do triptofano formar interações π com grupos aromáticos (BOGAN e THORN, 1998). Esta propriedade do triptofano foi sugerida como um possível efeito inibitório que a ciclodextrina desenvolve sobre a formação de agregados amiloidais induzidas pelo agente surfactante SDS na lisozima. Ao limitar este aminoácido, a ciclodextrina impede a interação entre os resíduos de triptofano, bloqueando assim a interação de algumas regiões hidrofóbicas da lisozima responsáveis pela agregação (MOOSAVI-MOVAHEDI et al., 2007). Desta forma, o consumo dos resíduos de triptofano na lisozima pelas bromaminas poderia impedir parcialmente a sua agregação. Este fato foi visualizado nos experimentos de indução de agregação utilizando o agente surfactante SDS. As bromaminas impediram parcialmente a formação de fibras amiloidais, ao contrário do que ocorreu com os ácidos precursores.

Como descrito anteriormente, a lisozima tem um papel importante na imunomodulação (VALISENA et al., 1996). O nível de lisozima no escarro é significativamente diminuído em pacientes com DPOC e pode contribuir para a persistência bacteriana nestes pacientes (PARAMESWARAN et al., 2011). As células do sistema imune, os neutrófilos e os eosinófilos desempenham papel importante em doenças pulmonares tais como: asma e DPOC (BAFADHEL et al., 2012). Essas células tornam o ambiente favorável para a formação das bromaminas Tau-NHBr, Tau-NBr₂. Assim, a inibição da lisozima por esses oxidantes pode representar uma via na progressão das doenças pulmonares. Nesta tese, demonstramos que Tau-NHBr e Tau-NBr₂ foram significativamente mais eficazes do que os ácidos precursores HOCl e HOBr como inibidores da atividade enzimática da lisozima. Em síntese, foi demonstrado nessa tese que a oxidação da lisozima pelos ácidos hipo-halosos e bromaminas pode representar uma nova via nas alterações das propriedades biológicas e funções da proteína. As capacidades de Tau-NHBr e particularmente Tau-NBr₂ como inibidores da atividade bactericida da lisozima pode representar uma nova via para a exacerbação da infecção pulmonar, uma vez que os leucócitos são fontes ricas em taurina e HOBr. Por outro lado, a oxidação da lisozima por um pequeno excesso de oxidantes, uma condição que,

também pode ser encontrada em processos inflamatórios podendo representar uma nova via para a iniciação da agregação da proteína e formação de fibras amilóides.

6. CONCLUSÕES

- O ácido hipobromoso e o ácido hipocloroso oxidam o triptofano com a mesma eficiência e mesma intensidade;
- O grupo α -amino do triptofano precisa estar livre para que ocorra a emissão de luz;
- A emissão de luz gerada após a oxidação do triptofano pelo HOBr acontece devido à formação de reações secundárias;
- As haloaminas Tau-NHBr e Tau-NBr₂ mostraram ser seletivas para a oxidação de triptofano em resíduos de proteínas;
- Os ácidos hipo-halosos mostraram ser potentes indutores na formação de fibras amiloides após a oxidação da lisozima, e esse fato aconteceu com menos intensidade com as haloaminas;
- Com relação à atividade da enzima, as haloaminas demonstraram ser inibidores da atividade o que não ocorre com os ácidos hipo-halosos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTI, J. M.; ALTMAN, L. C.; AYARS, G. H.; LOEGERING, D. A.; GLEICH, G. J.; KLEBANOFF, S. J. The injurious effect of eosinophil peroxidase, hydrogen peroxide, and halides on pneumocytes in vitro. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 79, p. 496-504, 1987.

AGOSTINI, C.; CARRATU, B.; BONIGLIA, C.; RIVA, E.; SANZINI, E. Free amino acid content in standard infant formulas: comparison with human milk. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 19, p. 434-438, 2000.

ALARCON, E.; HENRIQUEZ, C.; ASPÈE, A.; LISSI, E. A. Chemiluminescence associated with singlet oxygen reactions with amino acids, peptides and proteins. **Photochemistry and Photobiology**, v. 83 p. 475-80, 2007.

ANDERSON, P. A.; BAKER, D. H.; CORBIN, J. E.; HELPER, L. C. Biochemical lesions associated with taurine deficiency in the cat. **Journal of Animal Science**, v. 49, p. 1227-1234, 1979.

ASPEE, A.; LISSI, E. A. Chemiluminescence associated with amino acid oxidation mediated by hypochlorous acid. **Luminescence**, v. 17, p. 158-164, 2002.

BABIOR, B. M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, v. 93, p. 1464-76, 1999.

BAFADHEL, M.; McKENNA, S.; TERRY, S.; MISTRY, V.; PANCHOLI, M.; VENGE, P.; LOMAS, D. A.; BARER, M. R.; JOHNSTON, S. L.; PAVORD, I. D.; BRIGHTLING, C. E. Brightling. Blood eosinophils to direct corticosteroid treatment of exacerbations of COPD: a randomized placebo controlled trial. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 186, p. 48-55, 2012.

BALASUBRAMANIAN, D.; DU, X.; ZIGLER, J. S. The reaction of singlet oxygen with proteins, with special reference to crystallins. **Photochemistry Photobiology**, v. 52, p. 761-768, 1990.

BALDUS, S.; HEESCHEN, C.; MEINERTZ, T.; ZEIHNER, A. M.; EISERICH, J. P.; MÜNDEL, T. Myeloperoxidase Serum Levels Predict Risk in Patients with Acute Coronary Syndromes. **Circulation**, v. 108, p. 1440-1445, 2003.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p.113-123, 2006.

BAUER, G. HOCl-dependent Singlet Oxygen and Hydroxyl Radical Generation Modulate and Induce Apoptosis of Malignant Cells. **Anticancer Research**, v. 33 p. 3589-3602, 2013.

BEDARD, K.; KRAUSE, H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiological Reviews**, v. 81, p. 245-313, 2007.

BEHE, P.; SEGAL, A. W. The function of the NADPH oxidase of phagocytes, and its relationship to other NOXs. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, p. 1100-1103. 2007.

BERLETT, B. S.; STADTMAN, E. R. Protein oxidation in aging, disease and oxidative Stress. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 20, p. 313-316, 1997.

BERNASCONI, R. L.; PILLET, P. E.; JOLLES, J.; JOLLES, P. Purification and N-terminal amino acid sequence of basic lysozyme from *Parthenocissus quinquefolia* cultured *in vitro*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 915, p. 254-260, 1987.

BOGAN, A. A.; THORN, K. S. Anatomy of hot spots in protein interfaces. **Journal of Molecular Biology**, v. 280, p.1-9, 1998.

BOUCKENOOGHE, T.; REMACLE, C.; REUSENS, B. Is Taurine a functional nutrient? **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 9, p. 28-733, 2006.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochemical Journal**, v.134, p. 707-716, 1973.

BUCHBERGER, W. Investigations into lactoperoxidase-catalysed bromination of tyrosine and thyroglobulin. **Journal of Chromatography**, v. 432, p. 57-63, 1988.

CARR, A. C.; WINTERBOURN, C. C.; VAN DEN BERG, J. J. Peroxidase-mediated bromination of unsaturated fatty acids to form bromohydrins. **Archives Biochemistry Biophysics**, v. 327, p. 227-233, 1996.

CHAPMAN, A. L.; WINTERBOURN, C. C.; BRENNAN, S. O.; JORDAN, T. W.; KETTLE, A. J. Characterization of non-covalent oligomers of proteins treated with hypochlorous acid. **Biochemical Journal**, v. 375, p. 33-40, 2003.

CHITI, F.; DOBSON, C. M. Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. **Annual Review Biochemistry**, v. 75, p. 333-366, 2006.

CROSS, C. E.; REZNIK, A. Z.; PACKER, L.; DAVIS, P. A.; SUZUKI, Y. J. HALLIWELL, B. Oxidative damage to human plasma proteins by ozone. **Free Radical Research Communications**, v. 15, p. 347-352, 1992.

DAVIES, K. J. A. Protein damage and degradation by oxygen radicals. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, p. 95-99, 1987.

DAWSON, R. J.; BIASETTI, M.; MESSINA, S. DOMINY, J. The cytoprotective role of taurine in exercise-induced muscle injury. **Amino Acids**, v. 22, p. 309-324, 2002.

DEAN, R. T.; FU, S.; STOCKER, R.; DAVIES, M. J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. **Biochemical Journal**, v. 324, p. 1-18, 1997.

DILL, K. A.; MACCALLUM, J. L. The protein folding problem. **Annual Review Biophysics**, v. 37, p. 289-316, 2008.

DONNE-DALLE, I.; ROSSI, R.; GIAUSTARINI, D.; MILZANI, A.; COLOMBO, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, p. 23-38, 2003.

DRABIK, G.; NASKALSK, J. W. Chlorination of *N*-acetyltyrosine with HOCl, chloramines, and myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system. **Acta Biochimica Polonica**, v. 48, p. 271-275, 2001.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Review**, v. 82, p. 47-95, 2002.

EHRENSHAFT, M.; SILVA, S. O.; PERDIYVARA, I.; BILSKI, P.; SIK, R. H.; CHIGNELL, C. F.; TOMER, K. B.; MASON, R. P. Immunological detection of N-formylkynurenine in oxidized proteins. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, p. 1260-1266, 2009.

EISERICH, J. P.; VAN DER VILET, A.; HANDELMAN, G. J.; HALLIWELL, B. CROSS, C. E. Dietary antioxidants and cigarette smoke-induced biomolecular damage: A complex interaction. **The American Journal of Clinical. Nutrition**, v. 62, p.1490-1500, 1995.

EL-BENNA, J.; DANG, P. M.; GOUGEROT-POCIDALO, M. A.; ELBIM, C. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 53, p.199-206, 2005.

EL-REMESSY, A. B.; FRANKLIN, T.; GHALEY, N.; YANG, J.; BRANDS, M. W.; CALDWELL B. R.; ALI, B. M. Diabetes-Induced Superoxide Anion and Breakdown of the Blood-Retinal Barrier: Role of the VEGF/uPAR Pathway. **PLoS one**, v. 8, p.1-13 2013.

FAGAN, J. M.; SLECZKA, B. G.; SOHAR, I. Quantitation of oxidative damage to tissue proteins. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 31, p. 751-757, 1999.

FENTON, W. A.; HORWICH, A. L. Chaperonin-mediated protein folding: fate of substrate polypeptide Quarterly. **Reviews of Biophysics**, v. 36, p. 229-256, 2003.

FERSHT, A. R. Protein folding and stability: the pathway of folding of barnase. **Febs Letter**, v. 325, p. 5-16, 1993.

FOLLMER, C. NETTO, H. J. C. B. Multifunctional drugs: monoamine oxidase and α -synuclein as targets for the treatment of Parkinson's disease. **Química. Nova**, v. 36, p. 306-313, 2013.

FRIDOVICH, I. Oxidative stress. **Encyclopedia of life sciences**, 2001.

FRIDOVICH, I. Superoxide Anion Radical O_2^- , Superoxide Dismutases and Related Matters. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 18515-18517, 1997.

FRIEDMAN, A. H.; MOGULIS, S. The oxidation of amino acids with sodium hypobromite. **Journal of the American Chemical Societ**, v. 58, p. 909-913, 1939.

FUCCI, L.; OLIVER, C. N.; COON, M. J.; STADTMAN, E. R. Inactivation of key metabolic enzymes by mixed-function oxidation reactions: Possible implication in protein turnover and ageing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 80, p. 521-1525, 1983.

GARCIA, A. G.; RODRIGUEZ-ROCHA, H.; MADAYIPUTHIYA N.; PAPPA, A.; PANAYIOTIDIS, M. I.; Franco, R. Biomarkers of protein oxidation in human disease. **Current Molecular Medicine**, v. 12 p. 681-697, 2012.

GARRISON, W. M.; JAYKO, M. E.; BENNETT, W. Radiation-induced oxidation of protein in aqueous solution. **Radiation Research**, v. 16, p. 483-502, 1962.

GIESEG, S. P.; SIMPSON, J. A.; CHARLTON, T. S.; DUNCAN, M. W. DEAN, R. T. Protein bound 3,4-dihydroxyphenylalanine is a major reductant formed during hydroxyl radical damage to proteins. **Biochemistry**, v. 32, p. 4780-4786, 1993.

GROEMPING, Y.; RITTINGER, K. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. **Biochemical Journal**, v. 386, p. 401-16, 2005.

GÜNGÖR, N.; KNAAPEN, A. M.; MUNNIA, A.; PELUSO, M.; HAENEN, G. R.; CHIU, R. K.; GODSCHALK, R. W.; VAN SCHOOTEN, F. J. Genotoxic effects of neutrophils and hypochlorous acid. **Mutagenesis**, v. 25 p, 149-154, 2010.

HABERLAND, M. E.; FONG, D.; CHENG, L. Malondialdehyde-altered protein occurs in atheroma of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. **Science**, v. 241, p. 215-218, 1988.

HALLIWELL B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **Journal of Neurochemistry**, v. 59, p. 609-623, 1992.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. Free radicals in biology and medicine. **Oxford University Press**, v. 3, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymology**, v.186, p. 1-85. 1990.

HAMEED, M.; AHMAD, B.; FAZILI, K. M.; ANDRABI, K.; KHAN, R. H. Different molten globule-like folding intermediates of hen egg white lysozyme induced by high pH and tertiary butanol. **Journal Biochemistry**, v. 141, p, 573-583, 2007.

HARMAN, D. Aging - A theory based on free-radical and radiation-chemistry. **The Journal Gerontology**, v.11, p. 298-300, 1956.

HARTLEY, D. P.; KROLL, D. J.; PETERSEN, D. R. Prooxidant-initiated lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes: Detection of 4-hydroxynonenal- and malondialdehyde-protein adducts. **Chemical Research in Toxicology**, v. 10, p. 895-905, 1997.

HAWE, A.; SUTTER, M.; JISKOOT, W. Extrinsic Fluorescent Dyes as Tools for Protein Characterization. **Pharmaceutical Research**, v. 25, p. 1487-1499, 2008.

HAWKINS, C. L.; DAVIES, M. J. Hypochlorite-induced damage to nucleosides: formation of chloramines and nitrogen-centered radicals. *Chemical Research in Toxicology*. v. 14, p.1071-1081, 2001.

HAWKINS, C. L.; DAVIES, M. J. Inactivation of protease inhibitors and lysozyme by hypochlorous acid: role of side-chain oxidation and protein unfolding in loss of biological function. **Chemical Research in Toxicology**, v. 18, p.1600-1610, 2005a.

HAWKINS, C. L.; DAVIES, M. J. The role of N-bromo species and radical intermediates in hypobromous acid-induced protein oxidation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 39, p. 900-912, 2005b.

HAWKINS, C. L.; PATTISON, D. I.; STANLEY, N. R.; DAVIES, M. J. Tryptophan residues are targets in hypothiocyanous acid-mediated protein oxidation. **Biochemistry Journal**, v. 416, 441-452, 2008.

HAYATSU, H.; PAN, S. K.; UKITA, T. Reaction of sodium hypochlorite with nucleic acids and their constituents. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 19, p. 2189-2192, 1971.

HAZELL, L. J.; VAN DEN BERG, J. J. M.; STOCKER, R. Oxidation of low-density lipoprotein by hypochlorite causes aggregation that is mediated by modification of lysine residues rather than lipid oxidation. **Biochemical Journal**, v. 302, p. 297-304, 1994.

HEINECKE, J. W.; LI, W.; MUELLER, D.M.; BOHRER A.; TURK, J. Cholesterol chlorohydrin synthesis by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system: potential markers for lipoproteins oxidatively damaged by phagocytes. **Biochemistry**, v. 33, p. 10127-10136, 1994.

HENDERSON, J. P.; BYAN, J.; MUELLER, D. M.; HEINECKE, J. W. The eosinophil peroxidase-hydrogen peroxide-bromide system of human eosinophils generates 5-bromouracil, a mutagenic thymine analogue. **Biochemistry**, v. 40, p. 2052-2059, 2001a.

HENDERSON, J. P.; BYUN, J.; HEINECKE, J. W. Chlorination of nucleobases, RNA and DNA by myeloperoxidase: a pathway for cytotoxicity and mutagenesis by activated phagocytes. **Redox Report**, v. 4, p.319-320, 1999.

HENDERSON, J. P.; BYUN, J.; WILLIAMS, M. V.; MCCORMICK, M. L.; PARKS, W. C.; RIDNOUR, L. A. AND HEINECKE, J. W. Bromination of deoxycytidine by eosinophil peroxidase: A mechanism for mutagenesis by oxidative damage of nucleotide precursors. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 98, p. 1631-1636, 2001b.

HIMMELFARB, J.; MCMONAGLE, E.; McMENAMIM, E. Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. **Kidney International**, v. 58 p. 2571-2578, 2000.

HONG, SUNG-YONG.; ROZE, L. V.; LINZ, J. E. Oxidative Stress-Related Transcription Factors in the Regulation of Secondary Metabolism. **Toxins**,v. 5, 683-702, 2013.

HUNG Y. T.; LIN, M. S.; CHEN, W. Y.; WANG, S. S. Investigating the effects of sodium dodecyl sulfate on the aggregative behavior of hen egg-white lysozyme at acidic pH. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 81, p. 141-151, 2010.

HUXTABLE, J. R. Physiological actions of taurine. **Physiological Reviews**, v. 72, p. 101-163, 1992.

ISCHIROPOULOS, H.; AL-MEHDI, A. B. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. **FEBS Letters**, v. 364, p. 279-282, 1995.

JAHN, T. R.; RADFORD, S.E. The Yin and Yang of protein folding. **The FEBS Journal**, v. 272, p. 5962-5970, 2005.

JAIN, N.; BHATTACHARYA, M.; MUKHOPADHYAY, S. Kinetics of surfactant-induced aggregation of lysozyme studied by fluorescence spectroscopy. **Journal of Fluorescence**, v. 21, p. 15-25. 2011.

JARRETT, J. T., LANSBURY, P. T. JR. Seeding one-dimensional crystallization of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie. **Cell**, v. 73, p. 1055-1058. 1993.

JOHNSON, D. K.; SCHILLINGER, K. J.; KWAIT, D. M.; HUGHES, C. V.; MCNAMARA, E. J.; ISHMAEL, F.; O'DONNELL, R. W.; CHANG, M. M.; HOGG, M. G.; DORDICK, J. S.; SANTHANAN, L.; ZIEGLER, L. M.; HOLLAND, J. A. Inhibition of NADPH oxidase activation in endothelial cells by ortho-methoxy-substituted catechols. **Endothelium**, v. 9, p.191-203, 2002.

KANOFISKY, J. R. Singlet oxygen production by chloroperoxidase-hydrogen peroxide-halide systems. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, p. 5596-5600, 1984.

KANOFISKY, J. R. Singlet oxygen production by lactoperoxidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 258, p. 5991-5993, 1983.

KANOFISKY, J. R.; HOOGLAND, H.; WEVER, R.; WEISS, S. J. Singlet oxygen production by human eosinophils. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 9692-9696. 1988.

KANOFISKY, J. R.; WRIGHT, J.; TAUBER, A. I. Effect of ascorbic acid on the production of singlet oxygen by purified human myeloperoxidase. **FEBS Letters**, v. 187, p. 299-301, 1985.

KIM, C.; PARK, E.; QUINN, M. R.; SCHULLER-LEVIS, G. The production of superoxide anion and nitric oxide by cultured murine leukocytes and the accumulation of TNF-alpha in the conditioned media is inhibited by taurine chloramine. **Immunopharmacology**, v. 34, p. 89-95, 1996.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase. **Proceedings of the Association of American Physicians**, v. 111, p. 383-389, 1999.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, p. 598-625, 2005.

KONTNY, E.; CHORAZY-MASSALSKA, M.; RUDNICKA, W.; MARCINKIEWICZ, J.; MASLINSKI, W. Comparison of taurine chloramine and taurine bromamine effects on rheumatoid arthritis synoviocytes. **Amino Acids**, v. 32, p. 447-452, 2007.

KORBASHI, P.; KOHEN, R.; KATZHENDLER, J.; CHEVION, M. Iron mediates paraquat toxicity in Escherichia coli. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 12, p.472-476, 1986.

KREBS, M. R.; BROMLEY, E. H.; DONALD, A. M. The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications. **Journal of Structural Biology**, v. 149, p. 30-37, 2005.

KURODA, M.; SAKIYAMA, F.; NARITA, K. Oxidation of tryptophan in lysozyme by ozone in aqueous solution. **The Journal of Biochemistry**, v. 78, p. 641-651, 1975.

LAKOWICZ, J. R. Topics in fluorescence spectroscopy. **Protein fluorescence**, v. 6, 2000.

LAMBETH, J. D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, p. 181-189, 2004.

LEHNINGER, A.; NELSON, D.; COX, M. **Lehninger principles of biochemistry**, 5. ed. New York: W. H. Freeman, 2008.

LOIVOS, L. P. COPD-definitions and concepts - **Clinical bases**, v. 1, p. 34-37, 2009.

LOMAKIN, A.; CHUNG, D. S.; BENEDEK, G. B.; KIRSCHNER, D. A.; TELOW, D. B. On the nucleation and growth of amyloid beta-protein fibrils: detection of nuclei and quantitation of rate constants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 1125-1129, 1996.

LUNEC, J.; BLAKE, D. R.; McCLERY, S. J.; BRAILSFORD, S.; BACON, P. A. Self-perpetuating mechanisms of immunoglobulin G aggregation in rheumatoid inflammation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 76, p. 2084-2090, 1985.

MAHLEY, R. W.; HUANG, Y. Apolipoprotein (apo) E4 and Alzheimer's disease: unique conformational and biophysical properties of apoE4 can modulate neuropathology. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 185, suppl., p. 8-14, 2006.

MAITRA, D.; ABDULHAMID, I.; DIAMOND, M. P.; SAED, G. M, ABU-SOUD, H. M. Melatonin attenuates hypochlorous acid-mediated heme destruction, free iron release, and protein aggregation in hemoglobin. **Journal of Pineal Research**, v. 53, p.198-205, 2012.

MANKAR, S.; ANOOP, A.; SEM, S.; MAJI, S. K. Nanomaterials: amyloids reflect their brighter side. **Nano Reviews**, v. 2, p. 6032, 2011.

MANZANO-MORENO. V.; ISHIKAWA, Y.; CANZANA-LUCIO, J.; KITAMURA, M. Selective involvement of superoxide anion, but not downstream compounds hydrogen peroxide and peroxynitrite, in tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis of rat mesangial cells. **The Journal Biological Chemistry**, v. 275, 12684-12691, 2000.

MARANA, S. R.; CANÇADO, F. C.; VALÉRIO, A. A.; FERREIRA, C.; TERRA, W. R. AND BARBOSA, J. A. R. G. Crystallization, data collection and phasing of two digestive lysozymes from *Musca domestica*. **Acta Crystallographica**, v. 62, p. 750-752, 2006.

MARZZOCO, A. **Bioquímica Básica**. 3 ed, *Editora Guanabara Koogan*, p. 11, 2007.

MASUDA, M.; SUZUKI, T.; FRIESEN, M. D.; RAVANAT, J. L.; CADET, J.; PIGNATELLI, B.; NISHINO, H.; OHSHIMA, H. Chlorination of guanosine and other nucleosides by hypochlorous acid and myeloperoxidase of activated human neutrophils. Catalysis by nicotine and trimethylamine. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 40486-40496, 2001.

MATAGNE A.; DOBSON, C. M. The Folding Process of Hen Lysozyme: A Perspective From The New View. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 54, p. 363-71, 1998.

McCUTCHEN, S.L.; LAI, Z.; MIROY, G.J.; KELLY, J.W.; COLON, W. Comparison of Lethal and Nonlethal Transthyretin Variants and Their Relationship to Amyloid Disease. **Biochemistry**, v. 34, p. 13527-13536, 1995.

MIAO, L.; DARET, K.; CLAI, S. T. Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, p.344-356, 2009.

MOHIUDDIN, I.; CHAI, H.; LIN, P. H.; LUMSDEN, A. B.; YAO, Q.; CHEN, C. Nitrotyrosine and chlorotyrosine: clinical significance and biological functions in the vascular system. **Journal of Surgical Research**, v. 133, p.143-149, 2006.

MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A.; PIRSADEH, P.; HASHEMNIA, S.; AHMADJNA, B.; HEMMATEENEJAD, M.; AMANIA, A. A.; SABOURY, F.; AHMADD, M.; SHAMSIPUR, G. H.; HAKIMELAHJI, Fu-Yuan Tsai.; ALIJANYAND, H. H.; YOUSEFI, R. Fibril formation of lysozyme upon interaction with sodium dodecyl sulfate at pH 9.2. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 60, p. 55–61, 2007.

MORIYAMA, Y.; OHTA, D.; HACHIYA, K.; MITSUI, Y.; TAKEDA, K. Fluorescence behavior of tryptophan residues of bovine and human serum albumins in ionic surfactant solutions: A comparative study of the two and one tryptophan(s) of bovine and human albumins. **Journal of Protein Chemistry**, v. 15, p. 265-272, 1996.

MOSLEHI, M.; YAZDANPARAST, R. SK-N-MC cell death occurs by distinct molecular mechanisms in response to hydrogen peroxide and superoxide anions: involvements of JAK2-STAT3, JNK, and p38 MAP kinases pathways. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 66, p. 817-829, 2013.

NIEDER, M.; HAGER, L. Conversion of R-amino acids and peptides to nitriles and aldehydes by bromoperoxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. v. 240, p. 121-127, 1985.

NOHL H. Involvement of free radicals in ageing: a consequence or cause of senescence. **British Medical Bulletin**, v. 49, p. 653-667, 1993.

NUSSHOLD, C.; KOLLROSER, M.; KÖFELER, H.; RECHBERGER, G.; REICHER, H.; ULLEN, A.; BERNHART, E.; WALTL, S.; KRATZER, I.; HERMETTER, A.; HACKL, H.; TRAJANOSKI, Z.; HRZENJAK, A.; MALLE, E.; SATTLER, W. Hypochlorite modification of sphingomyelin generates chlorinated lipid species that induce apoptosis and proteome alterations in dopaminergic PC12 neurons in vitro. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48 p. 1588-1600, 2010.

OLIVEIRA, M. W. S.; Potencial antioxidante *scavenger* de taurina em concentrações fisiológicas contra espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto alegre, 2008.

OLZA, J.; AGUILERA, C.M.; GIL-CAMPOS, M.; LEIS, R.; BUENO, G.; MARTÍNEZ-JIMÉNEZ, M.D.; VALLE, M.; CAÑETE, R.; TOJO, R.; MORENO, L.A.; GIL, A. Myeloperoxidase is an early biomarker of inflammation and cardiovascular risk in prepubertal obese children. **Diabetes Care**, v. 35, p. 2373-2376, 2012.

ONOUCHI, H.; ISHII, T.; MIYAZAWA, M.; UCHINO, Y.; YASUDA, K.; HARTMAN, P. S.; KAWAI, K.; TSUBOTA, K.; NAOAKI, ISHII. Mitochondrial Superoxide Anion Overproduction in *Tet-mev-1* Transgenic Mice Accelerates Age-Dependent Corneal. **Cell Dysfunctions**, v. 53, p. 5780-5787, 2012.

PARAMESWARAN, G.I.; SETHI, S.; MURPHY, T.F. Effects of bacterial infection on airway antimicrobial peptides and proteins in COPD. **Chest Journal**, v. 140, 611-617, 2011.

PASANTES-MORALES, H.; FLORES, R. Taurine content of Mexican beans. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 4, p. 322-328, 1991.

PATTISON, D. I.; DAVIES, M. J. A kinetic analysis of the reactions of hypobromous acid with protein components: Implications for cellular damage and the use of 3-bromotyrosine as a marker of oxidative stress. **Biochemistry**, v. 43, p. 4799-4809, 2004.

PATTISON, D. I.; DAVIES, M. J. Absolute rate constants for the reaction of hypochlorous acid with protein side-chains and peptide bonds. **Chemical Research in Toxicology**, v. 14, p. 1453-1464, 2001.

PETRÔNIO, M. S.; XIMENES, V. F. Effects of oxidation of lysozyme by hypohalous acids and haloamines on enzymatic activity and aggregation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Proteins and Proteomics**, v. 1824, p. 1090-1096, 2012.

PODREZ, E.; ABU-SOUD, H. M.; HAZEN, S.L. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, p. 1717-1725, 2000.

POLLET, E.; MARTINEZ, A.; METHA, B.; WATTS, B. P.; TURRENS, J.F. Role of tryptophan oxidation in peroxynitrite-dependent protein chemiluminescence. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 349, p.74-80, 1998.

PRUTZ, W. A. Consecutive halogen transfer between various functional groups induced by reaction of hypohalous acids: NADH oxidation by halogenated amide groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 371, p. 107-114, 1999.

PRUTZ, W. A. Interactions of hypochlorous acid with pyrimidine nucleotides, and secondary reactions of chlorinated pyrimidines with GSH, NADH, and other substrates. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 349, p. 183-191, 1998.

PULLAR, J. M.; VISSERS, M. C.; WINTERBOURN, C. C. Glutathione oxidation by hypochlorous acid in endothelial cells produces glutathione sulfonamide as a major product but not glutathione disulfide. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 22120-22125, 2001.

QUINN, M.T., AMMONS, M.C., DELEO, F.R. The expanding role of NADPH oxidases in health and disease: no longer just agents of death and destruction. **Clinical Science**, v. 111, p. 1-20, 2006.

RADI, R.; BUSH, K. M.; COSGROVE, T. P.; FREEMAN, B. A. Reaction of xanthine oxidase-derived oxidants with lipid and protein of human plasma. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 286, p. 117-125, 1991.

ROMAN, R. M.; WENDLAND, A. E.; POLANCZYK, C. A. Mieloperoxidase e Doença Arterial Coronariana: da Pesquisa à Prática Clínica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 91, p. 12-19, 2007.

ROSÁRIO, M.; DOMINGUES, M.; DOMINGUES, P.; REIS, A.; FONSECA, C.; AMADO, F. O. M. L.; FERRER-CORREIA, A. J. V. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 14, p. 406-416, 2003.

SALMINEN, H.; HEINONEN, M. Plant phenolics affect oxidation of tryptophan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 27, p. 7472-7481, 2008.

SALEMME, F. R. Structural properties of protein beta-sheets. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 42, p. 95-133, 1983.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress responses what have genome-scale studies taught us. **Genome Biology**, v. 3, p.1019.1-1019.6, 2002.

SCHULLER-LEVIS, G. B.; PARK, E. Taurine and its chloramine: modulators of immunity. **Neurochemical Research**, v. 29 p, 117-126, 2004.

SHACTER, E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. **Drug Metabolism Reviews**, v. 32, p. 307-326, 2000.

SHAO, B.; BELAAOUAJ, A.; VERLINDE, C. L.; FU, X.; HEINECKE, J. W. Methionine sulfoxide and proteolytic cleavage contribute to the inactivation of cathepsin G by hypochlorous acid: an oxidative mechanism for regulation of serine proteinases by myeloperoxidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 29311-29321, 2005.

SHARMA, V. K.; ROKITA, S. E. Oxidation of Amino Acids, Peptides, and Proteins: Kinetics and Mechanism. **Wiley**, v. 5, p. 1- 420, 2012.

SHUGAR, D. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 8, p. 302-309, 1952.

SHULLER-LEVIS, B. G.; PARK, E. Taurine: new implications for an old amino acid. **FEMS Microbiology Letters**, v. 226, p.195-202, 2003.

SILVA, A. S.; GONÇALVES, R. C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, p.994-1002, 2010.

SILVA, S. O.; XIMENES, V. F.; CATALANI, L. H.; CAMPA A. Myeloperoxidasecatalyzed oxidation of melatonin by activated neutrophils. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 279, p. 657-662, 2000.

SINGER, T. P.; RAMSAY, R. R. Mechanism of the neurotoxicity MPTP. An update. **FEBS Letters**, v. 274, p. 1-8, 1990.

SIRANGELO, I.; MALMO, C.; CASILLO, M.; MEZZOGIORNO, A.; PAPA, M.; IRACE, G. Tryptophanyl substitutions in apomyoglobin determines protein aggregation and amyloid-like fibril formation at physiological pH. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277 p. 45887-45891, 2002.

SKORA, L.; BECKER, S.; ZWECKSTETTER, M. Molten globule precursor states are conformationally correlated to amyloid fibrils of human beta-2-microglobulin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, p. 9223-9225, 2010.

SMITH, D. P.; JONES, S.; SERPELL, L. C.; SUNDE, M.; RADFORD, S. E. A systematic investigation into the effect of protein destabilisation on beta 2-microglobulin amyloid formation. **Journal of Molecular Biology**, v. 330, p. 943-954, 2003.

STADTMAN, E. R.; LEVINE, R. L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. **Amino acids**, v. 25, p. 207-218, 2003.

STARKOV, A. A.; FISKUM G. H₂O₂ production by brain mitochondria is regulated by membrane potential and depends on the nature of oxidizable substrate. **Free Radical Biomedicine**, v. 33, p. 49, 2002.

STONE, R. J.; YANG, S. Hydrogen Peroxide: A Signaling Messenger. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, p. 3-4, 2006.

SUNDE, M.; SERPELL, L. C.; BARTLAM, M.; FRASER, P. E.; PEPYS, M. B.; BLAKE, C. C. F. Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. **Journal of Molecular Biology**, v. 273, p. 729-739, 1997.

SWAMINATHAN, R.; RAVI, V. K.; KUMAR, S.; KUMAR, M. V.; CHANDRA, N. Lysozyme: a model protein for amyloid research. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, v. 84, p. 63-111, 2011.

SZUCHMAN-SAPIR, A. J.; PATTINSON, D. I.; DAVIES, M. J.; WITTING, P. K. site-specific hypochlorous acid-induced oxidation of recombinant human myoglobin affects specific amino acid residues and the rate of cytochrome b5-mediated heme reduction. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, p. 35-46, 2010.

THOMAS, E. L.; BOZEMAN, P. M.; JEFFERSON, M. M.; KING, C. C. Oxidation of bromide by the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. Formation of bromamines. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 2906-2913, 1995.

TIEN, M.; BERLETT, B. S.; LEVINE, R. L.; CHOCK, P. B.; STADTMAN, E. R. Peroxynitrite mediated modification of proteins at physiological carbon dioxide concentration: pH dependence of carbonyl formation, tyrosine nitration and methionine oxidation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 7809-7814, 1999.

TIRMENSTEIN, M. A.; NELSON, S. D. Acetaminophen-induced oxidation of protein thiols. Contribution of impaired thiol-metabolizing enzymes and the breakdown of adenine nucleotides. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 3059-3065, 1990.

TREXLER, A. J.; NILSSON, M. R. The Formation of Amyloid Fibrils from Proteins in the Lysozyme Family. **Current Protein & Peptide Science**, v. 8, p. 537-557, 2007.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **The Journal of Physiology**, v. 552, p. 335-344, 2003.

TURRENS, J. F.; BOVERIS, A. Generation of superoxide anion by NADH dehydrogenases of bovine heart mitochondria. **The Biochemical Journal**, v.191, p. 421-427, 1980.

ULRICH, P.; CERAMI, A. Protein glycation, diabetes, and aging. **Recent progress in hormone research**, v. 56, p. 1-21, 2001.

VALISENA, S.; VARALDO, P. E.; FONTANA, R. Lysozyme inhibitors enhance immune response in mice. **New Microbiology**, v.19, p. 25-30, 1996.

VALLEIX, S.; DRUNAT, S.; PHILIT, J.B.; ADOUE, D.; PIETTE, J.C.; DROZ, D.; MACGREGOR, B.; CANET, D.; DELPECH, M.; GRATEAU, G. Hereditary renal amyloidosis caused by a new variant lysozyme W64R in a French family. **Kidney international**, v. 61, p. 907-912, 2002.

VANEY, M. C.; MAIGNAN, S.; RIES-KAUTT M.; Ducriux, A. High-Resolution Structure (1.33 Å) of a HEW Lysozyme Tetragonal Crystal Grown in the APCF Apparatus. Data and Structural Comparison with a Crystal Grown under Microgravity from SpaceHab-01 Mission. **Acta Crystallographica Section D Biological crystallographi**. v. 52, p. 505, 1996.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; SILVA, M. A. M. GOMES, A. C. M. Oxidative hypothesis of hypertension: a mini-review. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 14, p. 269-274, 2007.

VISSERS, M. C. M.; CARR, A. C.; WINTERBOURN, C. C. Fatty acid chlorohydrins and bromohydrins are cytotoxic to human endothelial cells. **Redox Report**, v. 6, p. 49-55, 2001.

VISSERS, M. C.; CARR, A. C.; CHAPMAN, A. L. Comparison of human red cell lysis by hypochlorous and hypobromous acids: Insights into the mechanism of lysis. **Biochemical Journal**. v. 330, p. 131-138, 1998.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. p.260.

VOGT, W. Oxidation of methionyl residues in proteins: Tools, targets, and reversal. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 18, p. 93-105, 1995.

WANG, S. S.; LIU, K. N.; WU, C. H.; LAI, J. K. Investigating the influences of redox buffer compositions on the amyloid fibrillogenesis of hen egg-white lysozyme. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1794, p. 1663-1672, 2009.

WAUTERS, J.; PILLE, F.; MARTENS, A.; FRANCK, T.; SERTEYN, D.; GASTHUYS, F.; MEYER, E. Equine myeloperoxidase: A novel biomarker in synovial fluid for the diagnosis of infection. **Equine Veterinary Journal**, v. 45, p. 278-283, 2013.

WEISS, S. J.; TEST, S. T.; ECKMANN, C. M.; ROOS, D.; RECVANI, S. Brominating oxidants generated by human eosinophils. **Science**, v. 234, p. 200-203, 1986.

WEISS, W. J. B. Two divergently transcribed genes *soxR* and *soxS*, control a superoxide response regulon of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 2864-2871, 1991.

WHITEMAN, M.; JENNER, A.; HALLIWELL, B. Hypochlorous acid-induced base modifications in isolated calf thymus DNA. **Chemical Research in Toxicology**, v.10, p. 1240-1246, 1997.

WIERZCHOWSKI, K. L. Intramolecular electron transfer between tryptophan radical and tyrosine in oligoproline-bridged model peptides and hen egg-white lysozyme. **Acta Biochimistry Polish**, v. 44, p. 627-644, 1997.

WINTER, J.; ILBERT, M.; GRAP, P. C.; OZCELIK, D.; JACOB, U. Bleach activates a redox-regulated chaperone by oxidative protein unfolding. **Cell**, v.135, p. 691-701, 2008.

WINTERBOURN, C. C. Comparative reactivities of various biological compounds with myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride, and similarity of the oxidant to hypochlorite. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 840, p. 204-210, 1985.

WINTERBOURN, C. C.; BRENNAN, S. O. Characterization of the oxidation products of the reaction between reduced glutathione and hypochlorous acid. **Biochemical Journal**, v. 326, p. 87-92, 1997.

WINTERBOURN, C. C.; VAN DEN BERG, J. J. M.; ROITMAN, E.; KUYPERS, F.A. Chlorohydrin formation from unsaturated fatty acids reacted with HOCl. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 296, p. 547-555, 1992.

WU, W.; SAMOSZUK, M. K.; COMHAIR, S. A.; THOMASSEN, M. J.; FARVER, C. F.; DWEIK, R. A.; KAVURU, M. S.; ERZURUM, S. C.; HAZEN, S. L. Eosinophils generate brominating oxidants in allergen-induced asthma. **Journal of Clinical Investigation**, v. 105, p.1455-1463, 2000.

XIMENES, V. F.; FONSECA, L. M.; ALMEIDA, A. C. Taurine bromamine: A potent oxidant of tryptophan residues in albumin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 507, p.315-322, 2011.

XIMENES, V. F.; PAINO, I. M. M.; FARIA-OLIVEIRA, O. M. M.; FONSECA, L. M.; BRUNETI, I. L. Indole ring oxidation by activated leukocytes prevents the production of hypochlorous acid. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 1575-1583. 2005.

YAZDANBAKHS, M.; ECKMANN, C. M, ROSS, D. Killing of schistosomula by taurine chloramine and taurine bromamine. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 37, p. 106-110, 1987.

YON, J. M.; Protein folding: concepts and perspectives. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 53, p. 557-567, 1997.

ZELCO, I. N.; MARIANI, T. J.; FOLZ, R. J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free Radical Biology Medicine**, v. 33, p. 337-349, 2002.

ZHAO, L. N.; LONG-HONWAI.; MU-YUGUANG.; CHEW, L. Y. The Toxicity of Amyloid Oligomers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 7303-7327, 2012.

Capítulo 2

Light emission from tryptophan oxidation by hypobromous acid

Maicon Segalla Petrónio^{a,b} and Valdecir Farias Ximenes^{a,b,*}

ABSTRACT: The emission of ultraweak light from cells is a phenomenon associated with the oxidation of biomolecules by reactive oxygen species. The indole moiety present in tryptophan, serotonin and melatonin is frequently associated with the emission of light during the oxidation of these metabolites. This study presents results for hypobromous acid (HOBr) oxidation of tryptophan as a putative endogenous source of ultraweak light emission. We found that chemiluminescence elicited by the oxidation of tryptophan by HOBr was significantly higher than by hypochlorous acid (HOCl). This difference was related to secondary oxidation reactions, which were more intense using HOBr. The products identified during oxidation by HOCl, but depleted by using HOBr, were *N*-formylkynurenine, kynurenine, 1,2,3,3a,8,8a-hexahydro-3a-hydroxypyrrolo [2,3-*b*]-indole-2-carboxylic acid, oxindolylalanine and dioxindolylalanine. The emission of light is dependent on the free α -amino group of tryptophan, and hence, the indole of serotonin and melatonin, although efficiently oxidized, did not produce chemiluminescence. The emission of light was even greater using taurine monobromamine and dibromamine as the oxidant compared to HOBr. A mechanism based on bromine radical intermediates is suggested for the higher efficiency in light emission. Altogether, the experimental evidence described in the present study indicates that the oxidation of free tryptophan or tryptophan residues in proteins is an important source of ultraweak cellular emission of light. This light emission is increased in the presence of taurine, an amino acid present in large amounts in leukocytes, where this putative source of ultraweak light emission is even more relevant. Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: Tryptophan; chemiluminescence; hypobromous acid; hypochlorous acid; taurine bromamine; taurine dibromamine

Introduction

From the highly efficient luciferin–luciferase bioluminescent reactions to ultraweak cellular emission, the chemiluminescence phenomenon is ubiquitous in living organisms (1–3). In the latter, non-enzymatic redox reactions such as lipid peroxidation (4,5) and the oxidation of proteins by hypochlorous acid (HOCl) (6) and by peroxynitrite (7) are examples of sources of ultraweak cellular light emission. Ultraweak emission of light is also called intrinsic chemiluminescence, to be differentiated from the emission of light produced by luminescent probes such as luminol and lucigenin. The intrinsic emission of light from cells has been associated with the production of reactive oxygen species (ROS), and therefore, its detection can be applied in analytical methods to detect the production/involvement of ROS in biological experimental models (8,9). Another important source of intrinsic cellular light emission occurs in phagocytes. In this case, a cascade of reactions is initiated by the production of the superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), which spontaneously dismutates to hydrogen peroxide (H_2O_2) and is converted to HOCl by the chlorinating activity of myeloperoxidase (MPO). These ROS are responsible for the production of electronically excited carbonyl products, which have been implicated in the emission of light (10).

Hypobromous acid (HOBr) is an endogenous oxidant produced by human eosinophils. These innate immune cells are endowed with eosinophil peroxidase (EPO), an enzyme whose main substrate is the bromide anion (11). As with HOCl, the endogenous production of HOBr has been implicated in the pathogenesis of chronic inflammatory diseases such as asthma and cystic fibrosis (12,13). Both HOCl and HOBr react rapidly with taurine, a non-protein amino acid that is the most abundant free amino

acid in the heart, retina, skeletal muscle, brain, and leukocytes (14), giving rise to taurine monochloramine (Tau-NHCl) and taurine monobromamine (Tau-NHBr) (15). Eosinophils produce Tau-NHBr, which is capable of killing schistosomula of *Schistosoma mansoni* at physiological concentrations (16). Important chemical properties of Tau-NHBr compared to Tau-NHCl include its higher reactivity, membrane permeability and stronger microbicidal activity (17). In agreement with this finding, we recently demonstrated that Tau-NHBr shows increased efficiency regarding the oxidation of tryptophan in proteins and light emission during the reaction (18). For these reasons and considering the importance of HOBr in the deleterious process underlying chronic inflammatory diseases, we aimed to study the oxidation of tryptophan by HOBr, focusing on the emission of light produced by this reaction.

Materials and methods

Chemicals

Tryptophan, taurine, alanine, melatonin, serotonin, bovine serum albumin and *N*-acetyltryptophan, were purchased from

* Correspondence to: Dr. Valdecir Farias Ximenes, Departamento de Química, Faculdade de Ciências de Bauru, Universidade Estadual Paulista, CEP 17033-360, Brasil. Email: vfximenes@fc.unesp.br

^a Departamento de Química, Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista, Bauru, Sao Paulo, Brazil

^b Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, Sao Paulo, Brazil

Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). The reagents used for preparation of phosphate-buffered saline (PBS) and mobile phases were of analytical grade. HOCl was prepared by diluting a 5% stock solution, and the concentration was determined spectrophotometrically after dilution in 0.01 M NaOH, pH 12 ($\epsilon_{292\text{nm}} = 350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). HOBr was synthesized by combining 100 mM HOCl and 200 mM NaBr in 10 mM PBS (19).

Preparation of chloramine and bromamine

A working solution of Tau-NHCl was prepared immediately before use by the addition of 5 mM HOCl to 50 mM taurine in PBS at pH 7.4. The concentration of Tau-NHCl was determined spectrophotometrically in PBS at pH 7.4 ($\epsilon_{252\text{nm}} = 429 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (20). Taurine dibromamine (Tau-NBr₂) was prepared immediately before use by adding 5 mM HOBr to 2.5 mM taurine in PBS at pH 7.4. Tau-NHBr was prepared by the addition of 5 mM HOBr to 500 mM taurine in PBS at pH 7.4. The concentrations of Tau-NBr₂ and Tau-NHBr were determined spectrophotometrically in PBS at pH 7.4 ($\epsilon_{241\text{nm}} = 2713 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and $\epsilon_{288\text{nm}} = 430 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, respectively) (20). The production of Tau-NHCl, Tau-NHBr and Tau-NBr₂ was analyzed using a Hewlett Packard 8452 diode array spectrophotometer (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

Chemiluminescence studies

Unless otherwise stated the reaction mixture was constituted by 0.5 mM oxidant and 0.50 mM indole derivative in PBS, pH 7.4, at 25°C. Reactions were initiated by adding the haloamine or hypohalous acid, and the light emitted was measured using a Centro LB 960 microplate luminometer (Berthold Technologies, Oak Ridge, TN, USA). For the experiments using alanine and taurine as additive in the oxidation of tryptophan by HOCl and HOBr, these amino acids were added in the solution of tryptophan before the addition of oxidants. For experiments using haloamines, these substances were pre-synthesized and added to the tryptophan solution. The reactions were triggered by adding the oxidant using the automatic injector installed in the luminometer.

Fluorescence studies

Oxidants (0.5 mM) were added to 0.50 mM tryptophan in PBS, pH 7.4, at 25°C. Reactions were initiated by the addition of the hypohalous acid, and the intrinsic fluorescence of tryptophan ($\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 360 \text{ nm}$) and formation of products ($\lambda_{\text{ex}} = 340$, $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$) were monitored using an LS55 spectrofluorimeter (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA).

High performance liquid chromatography analysis

A solution containing 0.5 mM tryptophan or *N*-acetyltryptophan was added to 0.25 mM oxidant in PBS, pH 7.4, at 25°C. Reactions were initiated by the addition of tryptophan and were incubated for 5 min, unless otherwise stated. Consumption of tryptophan and *N*-acetyltryptophan was measured by HPLC in line with a diode array detector set at 254 nm (Jasco, Easton, MD, USA). The analyses were carried out isocratically on a Luna C18 reversed-phase column (250 × 4.6 mm, 5 μm) with a mobile

phase consisting of 0.1% formic acid–methanol (6:94 v/v). The flow rate was 1.0 mL/min.

Results

We found that light emission was produced when tryptophan was oxidized by HOBr. The efficiency of light emission was dependent on the HOBr concentration reaching a plateau at a molar ratio (HOBr–Trp) higher than 2. Moreover, the light emission was significantly greater with HOBr than HOCl as the oxidizing agent (Fig. 1). These results led us to search for

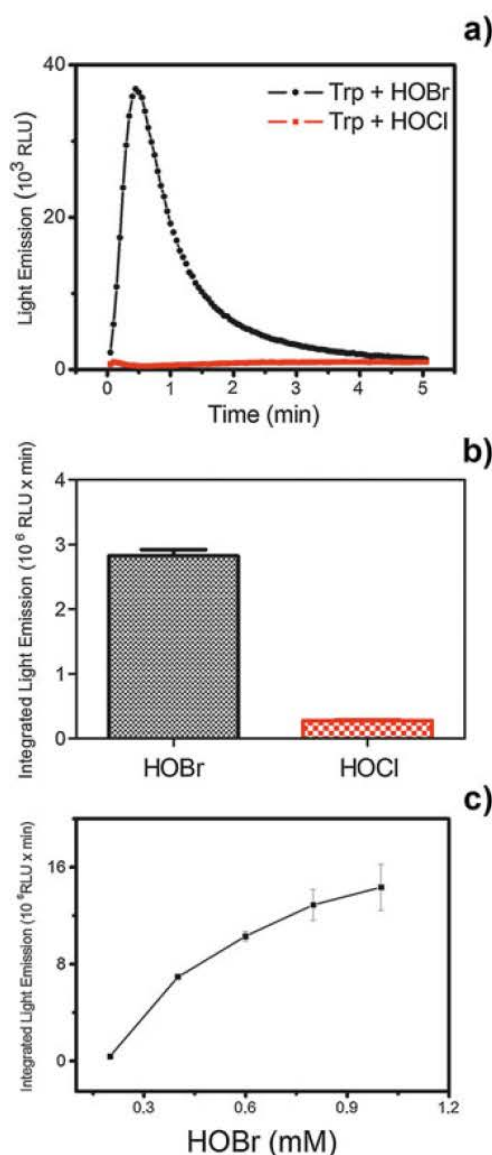


Figure 1. Chemiluminescence from tryptophan oxidation: hypobromous acid (HOBr) versus hypochlorous acid (HOCl). (a,b) Reaction mixture consisted of 0.5 mM tryptophan and 0.5 mM oxidant in phosphate-buffered saline, pH 7.4, at 25°C. (c) Effect of HOBr concentration on light emission. The concentration of tryptophan was fixed at 0.5 mM. The results are representative of at least three experiments.

Light emission from tryptophan oxidation by hypobromous acid

differences in the reaction features that could explain the higher efficiency of HOBr. First, the intrinsic fluorescence of tryptophan was used to follow its consumption after the addition of oxidants. The results depicted in Fig. 2(a) show that both HOCl and HOBr reacted instantaneously with tryptophan. However, the consumption of tryptophan was followed by a secondary and slower reaction that was monitored by the formation of fluorescent products (Fig. 2b). Unlike HOBr, HOCl did not elicit this secondary reaction. Moreover, the time course for this secondary reaction was coincident with the kinetics of light emission (Figs 1a and 2b).

Next, the reaction mixtures were injected into the HPLC system to compare the consumption of tryptophan and formation of products. Using both oxidants, tryptophan was partially consumed and generated several products, which are typically obtained when this amino acid is oxidized using oxidants such as hydrogen peroxide (21) and chlorine dioxide (22) and electrochemical oxidation (23). Among these products, *N*-formylkynurenine, kynurenine, 1,2,3,3a,8,8a-hexahydro-3a-hydroxypyrolo[2,3-*bj*]-indole-2-carboxylic acid, oxindolylalanine and dioxindolylalanine (Fig. 3) were identified by matching their ultraviolet-visible (UV-Vis) spectra, as has been previously reported (Fig. 4) (21). The oxidation by HOBr was similar to that by HOCl regarding the consumption of tryptophan. However, except for the compound dioxindolylalanine, which showed a small increase, the other products were significantly decreased compared to oxidation using HOCl. As this result could indicate their later oxidation, in an additional experiment, we added HOBr at the end of the reaction between tryptophan and HOCl and confirmed their depletion (data not shown).

The presence of the free α -amino group in tryptophan was essential for the emission of light through oxidation by HOBr. As can be observed in Fig. 5(a), the indole compounds melatonin and serotonin, which were also rapidly oxidized by both HOCl and HOBr, did not produce light. Similarly, the acetylation of the amino group of tryptophan resulting in *N*-acetyltryptophan blocked the emission of light when it was submitted to oxidation by HOBr. By monitoring the oxidation of *N*-acetyltryptophan by fluorescence (data not shown), its rapid oxidation was confirmed but without evidence of secondary reactions using either HOBr or HOCl. Moreover, unlike with tryptophan, the oxidation of *N*-acetyltryptophan

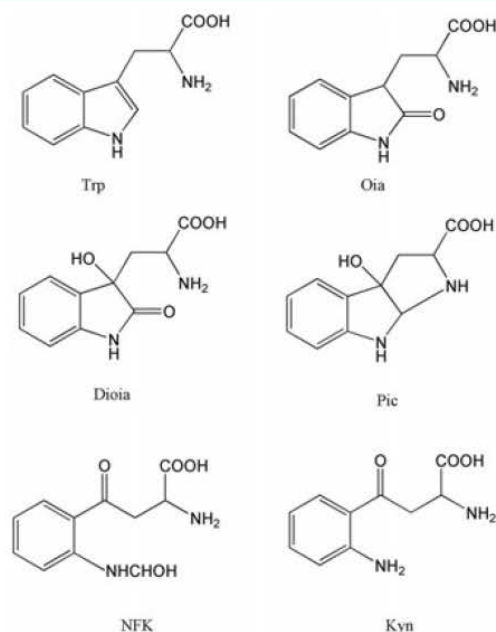


Figure 3. Tryptophan (Trp) and its oxidation products: *N*-formylkynurenine (NFK), kynurenine (Kyn), 1,2,3,3a,8,8a-hexahydro-3a-hydroxypyrolo[2,3-*bj*]-indole-2-carboxylic acid (Pic), oxindolylalanine (Oia) and dioxindolylalanine (Dioia).

led to its complete consumption and formation of a major product (Fig. 5b). This is consistent with the absence of secondary reactions, which are responsible for depleting part of the oxidant and demonstrate involvement of the α -amino group in these reactions.

Considering the importance of the α -amino group for light emission, and the putative involvement of intermediate haloamines in the light-generating pathway, we focused our attention on the effect of a second amino acid added to the reaction mixture. The choice of taurine was based on the fact that this β -amino acid produces stable chloramine and bromamine, whereas β -amino acids such as alanine produces unstable products (20,24). We found that alanine

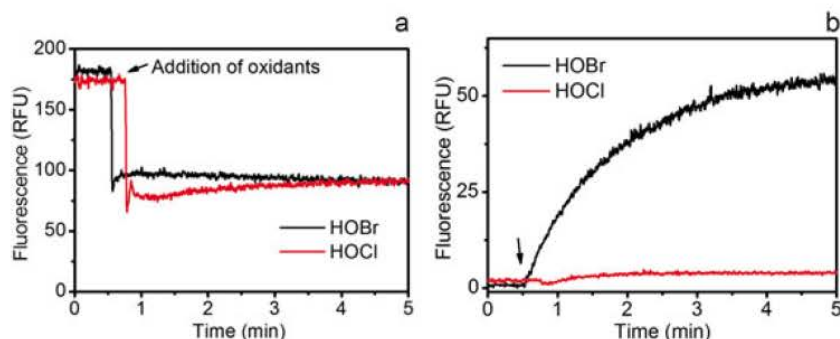


Figure 2. Kinetic profile for tryptophan oxidation: hypobromous acid (HOBr) versus hypochlorous acid (HOCl). (a) Depletion of tryptophan monitored by its intrinsic fluorescence (λ_{ex} 295 nm/ λ_{em} 360 nm). (b) Formation of oxidation products (λ_{ex} 340 nm/ λ_{em} 440 nm). Reaction mixture consisted of 0.5 mM tryptophan and 0.5 mM oxidant in PBS, pH 7.4, at 25°C. The results are representative of at least three experiments.

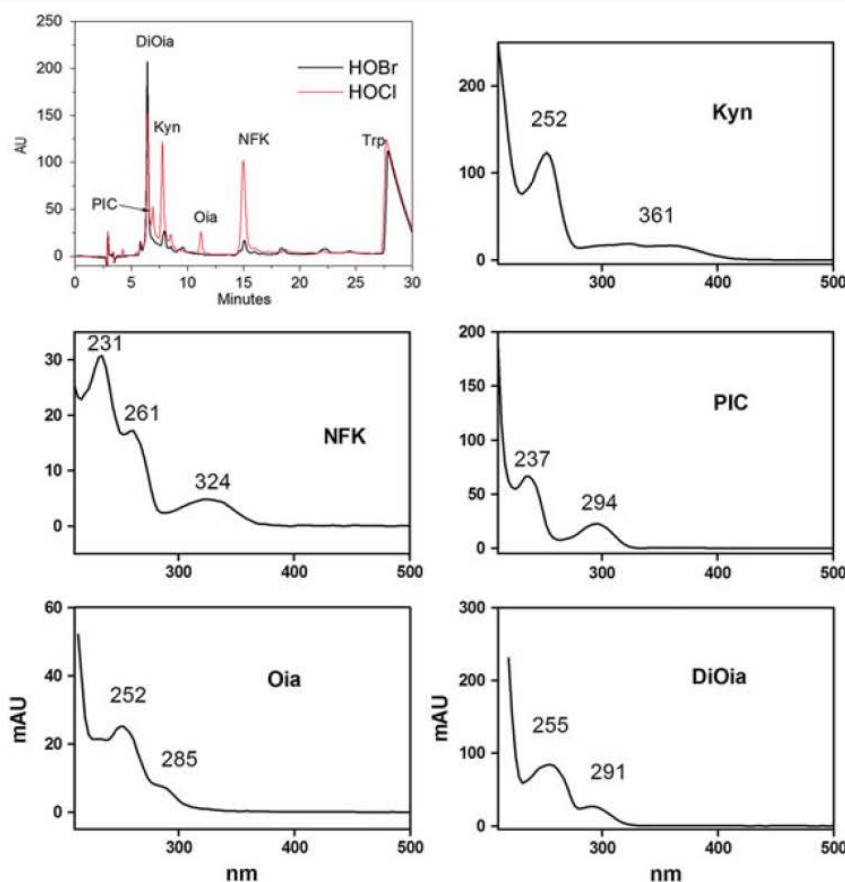


Figure 4. Chromatograms and ultraviolet-visible spectra of oxidation products: hypochlorous acid (HOCl) versus hypobromous acid (HOBr). The reaction mixture was injected 5 min after initiation of the reaction. Reaction mixtures consisted of 5.0 mM tryptophan and 5.0 mM oxidant in phosphate-buffered saline, pH 7.4, at 25°C.

had a concentration-dependent inhibitory effect on light emission during oxidation by HOBr (Fig. 6). On the other hand, taurine had a dual effect, increasing the light emission at low concentration and causing a decrease at higher concentration (Fig. 7). Using HOCl as oxidant, the addition of alanine and taurine always produced a decrease in light emission.

Considering the above results, preformed taurine bromamine was used to oxidize tryptophan. In this case, three different preparations of taurine bromamine were used: taurine-HOBr (1 : 2), which leads to the formation of Tau-NBr₂; taurine-HOBr (10 : 1), where a mixture of about 90% Tau-NHBr and about 10% of Tau-NBr₂ are in equilibrium in the reaction mixture; and taurine-HOBr (100 : 1), where the conversion to Tau-NHBr is complete (20). The UV-Vis spectra in Fig. 7 show the difference between Tau-NBr₂ (UV-Vis band centered at 241 nm) and Tau-NHBr (UV-Vis band centered at 288 nm) and the mixture of both forms, where a small increase at 241 nm can be noted (20). As can be observed, Tau-NBr₂ was the more effective promoter of light emission from tryptophan oxidation and Tau-NHBr was less effective.

The higher capacity of HOBr and Tau-NBr₂ as promoters of light emission from the oxidation of tryptophan was also

observed when this amino acid was a residue in a protein. This effect can be observed in Fig. 8, where bovine albumin was submitted to oxidation.

Discussion

Emission of ultraweak light from cells is a phenomenon associated with the oxidation of biomolecules by ROS. In this regard, the indole moiety, which is ubiquitous in living organisms as a component of tryptophan in proteins, the neurotransmitter serotonin and the pineal neurohormone melatonin, deserves special attention, as oxidation of these biomolecules is frequently associated with chemiluminescence. Examples are oxidation of melatonin catalyzed by peroxidases (25) and oxidation of tryptophan by HOCl (26), peroxynitrite (27) and singlet oxygen (28).

To understand the different chemical features between HOCl and HOBr, it must be understood that HOCl and HOBr are potent endogenous oxidants and that both are able to oxidize the indole moiety (29). In agreement, tryptophan was instantaneously oxidized by both oxidants. However, only partial consumption of tryptophan was observed, which can be easily explained, considering that the primary

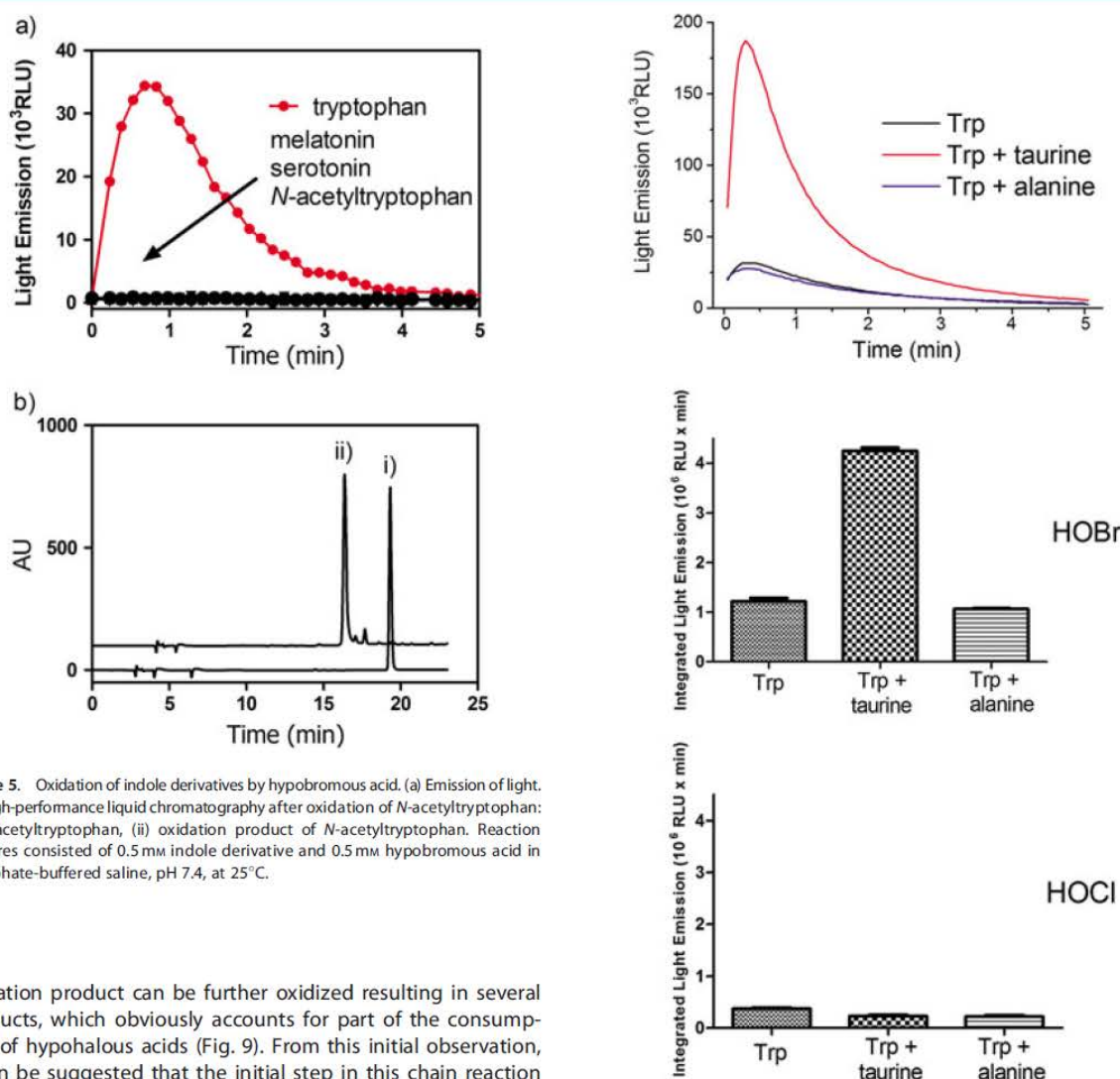


Figure 5. Oxidation of indole derivatives by hypobromous acid. (a) Emission of light. (b) High-performance liquid chromatography after oxidation of *N*-acetyltryptophan: (i) *N*-acetyltryptophan, (ii) oxidation product of *N*-acetyltryptophan. Reaction mixtures consisted of 0.5 mM indole derivative and 0.5 mM hypobromous acid in phosphate-buffered saline, pH 7.4, at 25°C.

oxidation product can be further oxidized resulting in several products, which obviously accounts for part of the consumption of hypohalous acids (Fig. 9). From this initial observation, it can be suggested that the initial step in this chain reaction does not seem to be the major factor for the emission of light. On the other hand, a significant difference between HOCl and HOBr can be observed regarding the distribution of the products. Among the oxidation products identified, the peaks corresponding to *N*-formylkynurenine, kynurenine, oxindolylalanine and 1,2,3,3a,8,8a-hexahydro-3a-hydroxypyrrolo[2,3-*b*]-indole-2-carboxylic acid were decreased using HOBr as the oxidant or when HOBr was added after oxidation by HOCl. These results indicate that the higher efficiency in emission of light may be related to oxidation of these compounds. Indeed, as demonstrated, the time course for secondary reaction was coincident with the kinetics of light emission using HOBr.

The necessity of a free α -amino group for a higher efficiency of light emission seems to be related to the formation of intermediate haloamines. It is well established that chloramines are poor oxidants compared to HOCl, and thus, formation of this kind of intermediate would likely imply a lower reactivity. Conversely, bromamines are significantly more reactive than chloramines (18–20), and thus, their generation would imply more efficient secondary reactions. In line with this notion, the emission of light was still more efficient using

Figure 6. Effect of additional amino acid on light emission from Trp oxidation. The reaction mixtures consisted of 0.5 mM Trp in the absence or presence of 0.5 mM alanine or 0.5 mM taurine and 0.5 mM oxidant. The reaction was triggered by the addition of oxidant. The results are representative of at least three experiments. HOBr, hypobromous acid; HOCl, hypochlorous acid; Trp, tryptophan.

Tau-NHBr and Tau-NBr₂ as oxidants instead of HOBr, and conversely, oxidation by Tau-NHCl was completely ineffective. The involvement of secondary reactions involving the free α -amino group was also evidenced by their absence during the oxidation of *N*-acetyltryptophan.

From the above, the remaining question is: How is the formation of bromamines involved in light emission? One proposal is the involvement of a free radical reaction in the homolysis of the N-Br bond. Aspée and Lissi previously demonstrated that oxidation of tryptophan results in light emission when subjected to treatment with HOCl and that the mechanism may be attributed to free radical-mediated secondary reactions of the initially produced chloramines

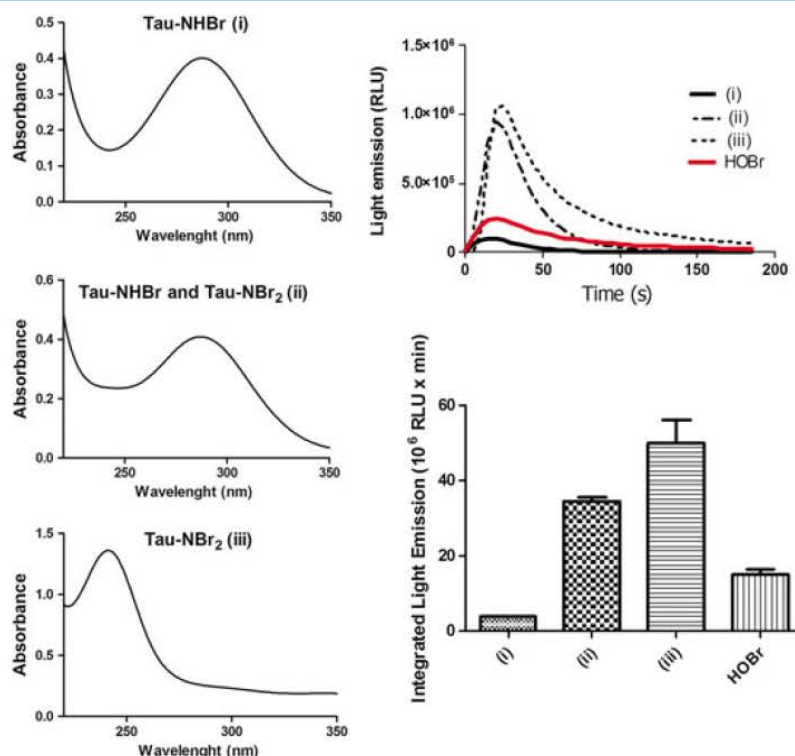


Figure 7. Chemiluminescence from oxidation of tryptophan: haloamines versus HOBr. The reaction mixtures consisted of 0.5 mM tryptophan and 0.5 mM oxidant. (a) Ultraviolet-visible spectrum of Tau-NHBr, (b) Tau-NHBr + Tau-NBr₂, (c) Tau-NBr₂. (d,e) Chemiluminescence. The oxidants were prepared as described in Materials and methods. The reaction was triggered by the addition of oxidant. The results are representative of at least three experiments. HOBr, hypobromous acid; Tau-NBr₂, taurine dibromamine; Tau-NHBr, taurine monobromamine.

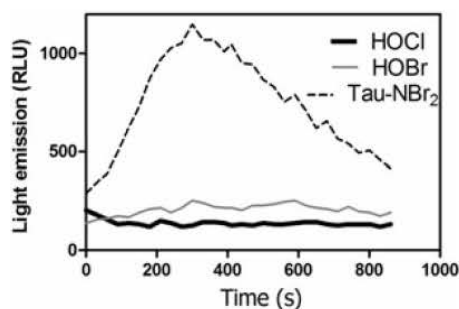


Figure 8. Chemiluminescence from oxidation of albumin. The reaction mixtures consisted of 50 μ M tryptophan and 2 mM oxidant. The reaction was triggered by the addition of oxidant. The results are representative of at least three experiments. HOBr, hypobromous acid; HOCl, hypochlorous acid; Tau-NHBr, taurine monobromamine.

explain subsequent oxidations. One of these compounds is oxindolylalanine, and its absence after oxidation by HOBr suggests its conversion to DiOia.

The dual effect of taurine on light emission can be also explained taking into account the involvement of intermediate free radicals species as responsible for light emission. Indeed, for the preparation of pure Tau-NHBr, a 100-fold excess of taurine is necessary. As taurine is also able to react with free radical species, we believe that parts of the light emission reactions were suppressed. In agreement with that, the addition of reducing endogenous substances such as glutathione and ascorbic acid were also able to deplete the light emission (data not shown).

In summary, the experimental evidence described in the present study indicates that the oxidation of free tryptophan or tryptophan residues in proteins is an important source of ultraweak cellular emission of light. This light emission is increased in the presence of taurine, an amino acid present in large amounts in leukocytes, where this putative source of emission of light is even more relevant.

Acknowledgments

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

(26). In agreement with a radical pathway for promoting light emission, the bromamines would be advantageous compared to chloramines, as bromine radicals are more easily formed compared to chlorine radicals due to their lower electronegativity and larger atomic radius. The higher reactivity of bromamines generated in the α -amino group may also

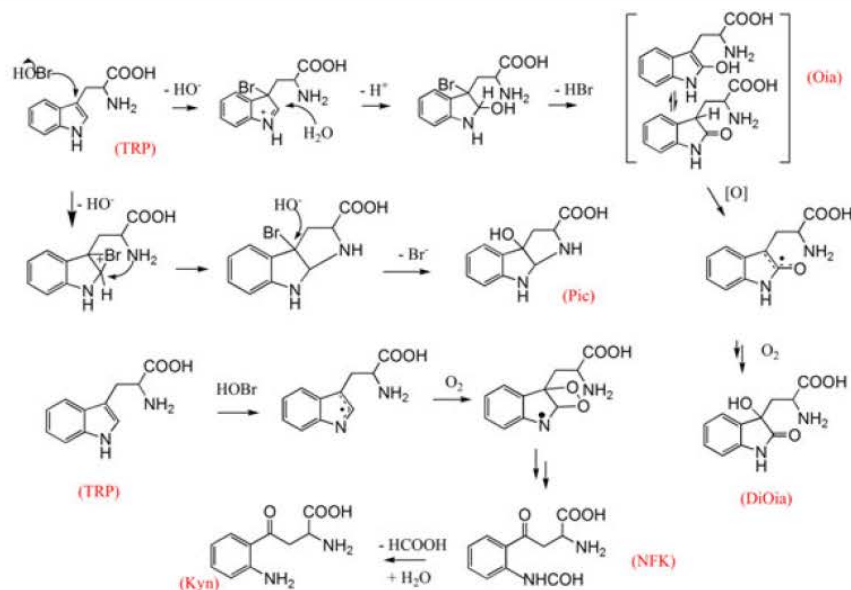


Figure 9. Proposed mechanism for tryptophan oxidation by HOBr. DiOia, diindolylalanine; HOBr, hypobromous acid; Kyn, kynurenine; NFK, N-fomylkynurenine; Oia, oxindolylalanine; Pic, 1,2,3,3a,8,8a-hexahydro-3a-hydroxypyrrrole[2,3-b]-indole-2-carboxylic acid.

References

- Widder EA. Bioluminescence in the ocean: origins of biological, chemical, and ecological diversity. *Science* 2010;328:704–8.
- Wijk Van RV, Van Wijk EP, Wiegant FA, Ives J. Free radicals and low-level photon emission in human pathogenesis: state of the art. *Indian J Exp Biol* 2008;46:273–309.
- Schwabl HH, Klima H. Spontaneous ultraweak photon emission from biological systems and the endogenous light field. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd* 2005;12:84–9.
- Xun S, Jingdong T, Zhaonan Z, Xinyuan L. Chemiluminescence study on the peroxidation of linoleic acid initiated by the reaction of ferrous iron with hydrogen peroxide. *Biophys Chem* 1991;40:161–7.
- Puntarulo S, Cederbaum AL. Comparison of the ability of ferric complexes to catalyze microsomal chemiluminescence, lipid peroxidation, and hydroxyl radical generation. *Arch Biochem Biophys* 1988;264:482–91.
- Zgliczyński JM, Olszowska E, Olszowski S, Stelmazyńska T, Kwasnowska E. A possible origin of chemiluminescence in phagocytosing neutrophils. Myeloperoxidase-mediated chlorination of proteins and tryptophan. *Int J Biochem* 1985;17:393–7.
- Watts BP Jr, Barnard M, Turrens JF. Peroxynitrite-dependent chemiluminescence of amino acids, proteins, and intact cells. *Arch Biochem Biophys* 1995;317:324–30.
- Baker N, Greenway GM, Wheatley RA, Wiles C. A chemiluminescence nanosensor to monitor lipid peroxidation. *Analyst* 2007;132:104–6.
- Vladimirov YA, Proskumina EV. Free radicals and cell chemiluminescence. *Biochemistry (Mosc)* 2009;74:1545–66.
- Allen RC. Environ. Role of oxygen in phagocyte microbicidal action. *Health Perspect* 1994;102:201–8.
- Mayeno AN, Curran AJ, Roberts RL, Foote CS. Eosinophils preferentially use bromide to generate halogenating agents. *J Biol Chem* 1989;264:5660–8.
- Rees MD, McNiven TN, Davies MJ. Degradation of extracellular matrix and its components by hypobromous acid. *Biochem J* 2007;401:587–96.
- Thomson E, Brennan S, Senthilmohan R, Gangell CL, Chapman AL, Sly PD, et al. Identifying peroxidases and their oxidants in the early pathology of cystic fibrosis. *Free Radic Biol Med* 2010;49:1354–60.
- Schuller-Levis GB, Park E. Taurine: new implications for an old amino acid. *FEMS Microbiol Lett* 2000;226:195–220.
- Weiss SJ, Klein R, Slivka A, Wei M. Chlorination of taurine by human neutrophils. Evidence for hypochlorous acid generation. *Clin J Invest* 1982;70:598–607.
- Yazdanbakhsh M, Eckmann CM, Roos D. Killing of schistosomes by taurine chloramine and taurine bromamine. *Am J Trop Med Hyg* 1987;37:106–10.
- Marcinkiewicz J. Taurine bromamine (TauBr) its role in immunity and new perspectives for clinical use. *J Biomed Sci* 2010;17:Suppl 1:S3.
- Ximenes VF, Fonseca LM, Almeida AC. Taurine bromamine: a potent oxidant of tryptophan residues in albumin. *Arch Biochem Biophys* 2011;507:315–22.
- Tokunaga S, Kanayama A, Miyamoto Y. Modification of IkappaBalpha by taurine Bromamine inhibits tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappaB activation. *Inflamm Res* 2007;56:479–86.
- Thomas EL, Bozeman PM, Jefferson MM, King CC. Oxidation of bromide by the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. Formation of bromamines. *J Biol Chem* 1995;270:2906–13.
- Salminen H, Heinonen M. Plant phenolics affect oxidation of tryptophan. *J Agric Food Chem* 2008;56:7472–81.
- Stewart DJ, Napolitano MJ, Bakhmutova-Albert EV, Margerum DW. Kinetics and mechanisms of chlorine dioxide oxidation of tryptophan. *Inorg Chem* 2008;47:1639–47.
- Nguyen NT, Wrona MZ, Dryhurst G. Electrochemical oxidation of tryptophan. *J Electroanal Chem Interfac* 1986;199:101–26.
- Gottardi W, Nagl M. Chemical properties of N-chlorotaurine sodium, a key compound in the human defence system. *Arch Pharm (Weinheim)* 2002;335:411–21.
- Silva SO, Ximenes V F, Catalani LH, Campa A. Myeloperoxidase-catalyzed oxidation of melatonin by activated neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279:657–62.
- Aspée A, Lissi EA. Chemiluminescence associated with amino acid oxidation mediated by hypochlorous acid. *Luminescence* 2002;17:158–64.
- Pollet E, Martinez A, Metha B, Watts BP, Turrens JF. Role of tryptophan oxidation in peroxynitrite-dependent protein chemiluminescence. *Arch Biochem Biophys* 1998;349:74–8.
- Alarcon E, Henriquez C, Aspée A, Lissi EA. Chemiluminescence associated with singlet oxygen reactions with amino acids, peptides and proteins. *Photochem Photobiol* 2007;83:475–80.
- Ximenes VF, Paino IMM, Faria-Oliveira de OMM, Fonseca da LM, Brunetti IL. Indole ring oxidation by activated leukocytes prevents the production of hypochlorous acid. *Braz J Med Biol Res* 2005;38:1575–83.



Effects of oxidation of lysozyme by hypohalous acids and haloamines on enzymatic activity and aggregation

Maicon S. Petrônio, Valdecir F. Ximenes*

Departamento de Química, Faculdade de Ciências, Unesp - Univ Estadual Paulista, Bauru, SP, Brazil

Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unesp - Univ Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 April 2012

Received in revised form 14 June 2012

Accepted 19 June 2012

Available online 27 June 2012

Keywords:

Amyloid fibril

Lysozyme activity

Hypobromous acid

Hypochlorous acid

Taurine monobromamine

Taurine dibromamine

ABSTRACT

Hen egg white lysozyme (HEL), an antibacterial enzyme, is a prototype protein for studying the physical and chemical events that underlie the formation of amyloid fibril aggregates. Here, we studied alterations in enzymatic activity and aggregation provoked by oxidation of HEL by hypochlorous acid (HOCl), hypobromous acid (HOBr), taurine chloramine (Tau-NHCl), taurine monobromamine (Tau-NHBr), and taurine dibromamine (Tau-NBr₂). Addition of only 4-fold molar excess of Tau-NHBr or Tau-NBr₂ to HEL caused complete depletion of its intrinsic fluorescence, whereas HOCl and HOBr caused 40%–50% bleaching. Tau-NHCl was unable to oxidize lysozyme. The selective effect of bromamines on tryptophan residues had a direct effect on enzymatic activity; bromamines were about two-fold more effective as inhibitors of lysozyme than the acid precursors. The oxidation of HEL by HOCl and HOBr was more effective regarding the aggregation of the protein, which was evidenced by increased turbidity, Rayleigh scattering, and anisotropy. The aggregates presented spectroscopic properties that suggested the formation of amyloid fibrils, as measured by the thioflavin assay. In conclusion, the capacity of Tau-NHBr and Tau-NBr₂ as inhibitors of the bactericidal activity of HEL could represent a role in the exacerbation of pulmonary infection, since leukocytes are rich sources of both taurine and HOBr. Moreover, the oxidation of HEL by just a small excess of hypohalous acids, a condition that could be found in inflammatory sites, may represent a new pathway for initiation of aggregation.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Lysozyme, discovered by Alexander Fleming in 1922, is an antimicrobial enzyme that hydrolyzes the β -1,4 glycosidic linkages between *N*-acetylmuramic acid and *N*-acetylglucosamine that occur in the peptidoglycan cell wall structure of Gram-positive and Gram-negative pathogens [1]. In addition to its antimicrobial properties, lysozyme is also involved in modulating the inflammatory response. Accordingly, lysozyme inhibitors have an immuno-enhancing effect, which is directly proportional to their inhibitory activity on lysozyme in mice, an effect that has been explained by taking into account the modulation of the immune response and through activation of non-specific suppression mechanisms [2]. The level of lysozyme in sputum is significantly decreased in COPD patients and could contribute to bacterial persistence in these patients [3]. In canine models of septic shock, lysozyme that is released from leukocytes plays a role in myocardial depression and arterial vasodilation through the generation of hydrogen peroxide [4].

Lysozyme is a prototype protein for studying the physical and chemical events that underlie the formation of amyloid fibril aggregates,

a phenomenon associated with degenerative conditions, such as prion diseases, type II diabetes, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease [5,6]. Lysozyme is an amyloidogenic protein that can be in vitro converted into amyloid fibrils when submitted to high temperature [7], changes in pH [8], presence of surfactants [9], etc. The use of lysozyme for studying the formation of amyloid fibrils is justified, since several proteins are able to aggregate in vitro into fibrils similar to those found in amyloid diseases [10], and the formation of amyloid fibrils is a property common to many natural polypeptide chains under appropriate conditions [11].

Hypochlorous (HOCl) and hypobromous acids (HOBr) are antimicrobial oxidants produced by innate immune cells, including neutrophils and eosinophils [12]. The process is initiated by activation of the transmembrane NADPH oxidase enzymatic complex. NADPH oxidase catalyzes the reduction of molecular oxygen to superoxide anion radical, which dismutates to hydrogen peroxide and HOCl or HOBr through myeloperoxidase (MPO)-catalyzed oxidation of chloride or bromide, respectively [13,14]. In eosinophils, a defense cell usually associated with helminthic infections and various inflammatory and allergic diseases, the equivalent of MPO is eosinophil peroxidase (EPO), which oxidizes bromide to HOBr, but is unable to oxidize chloride [15]. Leukocytes are rich in taurine [16], a sulfur-containing amino acid that has many physiological functions, including neuromodulatory and immunoregulatory roles [17]. Taurine reacts with HOCl [18] and HOBr

* Corresponding author at: Departamento de Química, Faculdade de Ciências de Bauru, Universidade Estadual Paulista, CEP 17033-360, Brazil. Tel.: +55 14 3103 6088; fax: +55 14 3103 6099.

E-mail address: vfximenes@fci.unesp.br (V.F. Ximenes).

[19] leading to the haloamines taurine chloramine (Tau-NHCl) and taurine bromamine (Tau-NHBr), which has higher oxidant capacity than Tau-NHCl.

The uncontrolled production of HOCl and HOBr has been implicated in the initiation and progression of many degenerative and inflammatory diseases [20–22]. Moreover, the oxidation of lysozyme by HOCl provokes the loss of enzymatic activity and unfolding [23]. This last alteration could have implications in the initiation of aggregate formation, which cumulates in amyloid fibrils; indeed, a correlation was demonstrated between fibrillogenesis of lysozyme and the redox composition of the medium represented by the concentration of cysteine and cystine [24].

Considering the relevance of tryptophan residues in the active site of lysozyme [25], the evidence that this amino acid is essential for the stability of apomyoglobin avoiding its aggregation and amyloid-like fibril formation [26], and our recent finding that Tau-NHBr showed selectivity in oxidizing tryptophan residues in albumin [27], here we studied the alterations in enzymatic activity and aggregation propensity of lysozyme subjected to oxidation by HOCl, HOBr, Tau-NHCl, Tau-NHBr, and TauNBr₂.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and solutions

Hen egg white lysozyme, thioflavin T, taurine, sodium chloride, sodium bromide, 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid), 8-anilino-1-naphthalenesulfonate magnesium salt (ANS), 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), sodium dodecyl sulfate (SDS), *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698 lyophilized cells, guanidine-hydrochloride, and trifluoroacetic acid were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Hypochlorous acid (HOCl) was prepared by diluting a 5% concentrated solution, and the concentration was determined spectrophotometrically after dilution in 0.01 M NaOH at pH 12 ($\epsilon_{292\text{ nm}} = 350\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). HOCl was prepared daily in 10 mM sodium phosphate buffer at pH 7.0 to give a stock solution of 100 mM. HOBr was synthesized by combining 100 mM HOCl and 200 mM NaBr in 10 mM sodium phosphate buffer at pH 7.0 [28]. Lysozyme was dissolved in 10 mM phosphate buffer at pH 7.0 to give a 1 mM stock solution and stored at 4 °C. Accurate protein concentration was determined by measuring its absorbance at 280 nm on a Perkin Elmer Lambda 35 UV-visible spectrophotometer (Shelton, CT, USA). The molar extinction coefficient of lysozyme at 280 nm is $43,824\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ [29]. ANS stock solution (3 mM) was prepared in 10 mM sodium phosphate buffer at pH 7.0 and stored at 4 °C.

2.2. Preparation of chloramine and bromamine

Working solutions of Tau-NHCl were prepared immediately prior to use by the addition of 5 mM HOCl to 50 mM taurine in 10 mM phosphate buffer at pH 7.0. The concentration of Tau-NHCl was determined spectrophotometrically ($\epsilon_{252\text{ nm}} = 429\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) [30]. Taurine dibromamine (Tau-NBr₂) was prepared immediately prior to use by adding 5 mM HOBr to 2.5 mM taurine in 10 mM phosphate buffer at pH 7.0. Tau-NHBr was prepared by the addition of 5 mM HOBr to 500 mM taurine in 10 mM phosphate buffer at pH 7.0. The concentrations of Tau-NBr₂ and Tau-NHBr were determined spectrophotometrically ($\epsilon_{241\text{ nm}} = 2713\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ and $\epsilon_{288\text{ nm}} = 430\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, respectively) [30]. The production of Tau-NHCl, Tau-NHBr, and Tau-NBr₂ was analyzed using a Hewlett Packard 8452 Diode Array spectrophotometer (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

2.3. Tryptophan fluorescence

The fluorescence spectra which were uncorrected for lamp and phototube response were obtained using a Perkin Elmer LS 55 spectrofluorimeter (Shelton, CT, USA) adjusted as follows: excitation at 295 nm and emission scanning between 310 and 500 nm, slit width

of 5.0 nm for both excitation and emission wavelengths, 3 mL quartz cuvette with a 10 mm path length, and a magnetic stirrer. The reaction mixtures contained 5 μM lysozyme and 20 μM oxidants in 10 mM sodium phosphate buffer at pH 7.0. The fluorescence measurements were performed 5 min after the addition of oxidants. For kinetic studies, the reactions were triggered by adding the oxidants, and the excitation and emission wavelengths were set at 295 and 344 nm, respectively.

2.4. ANS fluorescence

ANS fluorescence measurements were made on a Perkin Elmer LS 55 spectrofluorimeter adjusted as follows: excitation at 378 nm and emission scanning between 410 and 600 nm, slit width of 5.0 nm for both excitation and emission wavelengths, 3 mL quartz cuvette with a 10 mm path length, and a magnetic stirrer. The reaction mixtures contained 5 μM lysozyme and 20 μM oxidants in 10 mM sodium phosphate buffer at pH 7.0. After oxidation, 100 μM methionine was added for scavenging residual oxidants and incubated for an additional 5 min at room temperature. Next, 90 μM ANS was added and incubated for 30 min before measurement. For experiments at pH 9.2, the reaction conditions were 50 μM lysozyme and 200 μM oxidants in 10 mM sodium phosphate buffer at pH 7.0. Then, the reaction mixtures were 10-fold diluted in 0.1 M glycine buffer at pH 9.2 and 90 μM ANS was added [31].

2.5. Rayleigh scattering

The elastic scattering of light, an indication of protein aggregation, was measured at 90° geometry on a Perkin Elmer LS 55 spectrofluorimeter adjusted as follows: excitation at 280 nm and emission scanning between 270 and 300 nm, slit width of 5.0 nm for both excitation and emission wavelengths, a 3 mL quartz cuvette with a 10 mm path length, and a magnetic stirrer [32]. The reaction mixtures contained 50 μM lysozyme and 200 μM oxidants in 10 mM sodium phosphate buffer at pH 7.0. Then, the reaction mixtures were 10-fold diluted in 0.1 M glycine buffer at pH 9.2 for the measurements.

2.6. Fluorescence anisotropy

The anisotropy of lysozyme was measured using a Perkin Elmer LS 55 spectrofluorimeter at a constant wavelength (λ_{ex} 378 nm, λ_{em} 485 nm), a slit width of 5.0 nm for both excitation and emission wavelengths, a 3 mL quartz cuvette with a 10 mm path length, and a magnetic stirrer. An integration time of 10 s was used to obtain a satisfactory signal-to-noise ratio. The anisotropy $r = (I_{\text{VV}} - I_{\text{VH}})/(I_{\text{VV}} + 2 I_{\text{VH}})$, where I_{VV} and I_{VH} are fluorescence intensities measured using the parallel and perpendicular geometry of the polarizers, respectively, and the perpendicular components were corrected using the respective G-factors. The reaction mixtures contained 50 μM lysozyme and 500 μM oxidants in 10 mM sodium phosphate buffer at pH 7.0. After oxidation, 1 mM methionine was added to scavenge residual oxidants and incubated for an additional 5 min at room temperature. Next, the reaction mixtures were diluted in 0.1 M glycine buffer at pH 9.2, 90 μM ANS was added, and the reactions incubated for 30 min before measurement.

2.7. Thioflavin T assay

Lysozyme (50 μM) was incubated with 200 μM oxidants in 10 mM sodium phosphate buffer at pH 7.0 for 30 min at 25 °C with gentle agitation. After oxidation, 1 mM methionine was added to scavenge residual oxidants, and the reactions were incubated for an additional 5 min at room temperature. The reaction mixture was 20-fold diluted in 0.1 M glycine buffer at pH 9.2 containing 10 μM thioflavin and incubated for 15 min. The fluorescence was measured on a Spectramax M2 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) adjusted as follows: excitation at 440 nm and emission scanning between 450 and 600 nm [33]. For experiments with SDS (300 μM), the

anionic surfactant was added after oxidation and incubated for an additional 15 min before the addition of 10 μM thioflavin.

2.8. Determination of carbonyl group content

Lysozyme (50 μM) was incubated with 200 μM oxidants in 10 mM sodium phosphate buffer at pH 7.0 for 30 min at 25 °C with gentle agitation. Next, 1 mM methionine was added to scavenge residual oxidants, and the reaction was incubated for an additional 5 min. The formation of protein carbonyl groups produced by oxidation with haloamines or hypohalous acids was analyzed as previously described [34] with minor modifications. Briefly, the reaction mixture containing oxidized lysozyme (0.5 mL) was added to 0.5 mL DNPH (10 mM in 2 M HCl) and was incubated for 1 h at room temperature being vortex at 10 min intervals. The protein was then precipitated with 0.5 mL cold TCA (final concentration: 30% w/v) by incubation in an ice bath for 30 min. The solution was subjected to centrifugation at 11,000 rpm for 10 min, and the supernatant was discarded. The precipitated protein was washed three times with 1 mL of an ethanol:ethyl acetate mixture (1:1 v/v). The precipitated protein was then dissolved in 0.5 mL 6 M guanidine hydrochloride (prepared in 20 mM potassium phosphate at pH 2.3) and incubated at 37 °C for 1 h. Next, the reaction mixture was centrifuged at 11,000 rpm for 10 min, and the carbonyl group content was determined spectrophotometrically ($\epsilon_{370\text{ nm}} = 22,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) and expressed as nmol/mg protein.

2.9. Lysozyme activity

Lysozyme activity was determined by measuring the rate of loss of turbidity of a suspension of *M. lysodeikticus*. The reaction mixtures contained 5 μM lysozyme and 20 μM oxidants in 10 mM sodium phosphate buffer at pH 7.0. After oxidation, 100 μM methionine was added for scavenging residual oxidants and incubated for an additional 5 min at room temperature. A 50 μL aliquot of the reaction mixture was added to a 2950 μL suspension of *M. lysodeikticus* (0.01% w/v in 66 mM potassium phosphate buffer at pH 6.24) in a quartz cuvette with a magnetic stirrer at 25 °C [35]. The rate of absorbance decay was measured at 450 nm and the relative enzymatic activity measured as $\Delta A/\text{min}$ in the linear part of the curve and taking the control as reference.

3. Results

In this study, we compared alterations in the structure and function of lysozyme when submitted to oxidation by hypohalous acids, HOCl and HOBr, and their haloamines, Tau-NHCl and Tau-NHBr. These haloamines were prepared by reacting the acids with a 100-fold and 10-fold excess of taurine to ensure complete conversion of HOBr to Tau-NHBr and HOCl to Tau-NHCl, respectively [30]. Due to the oxidant features of Tau-NHBr, we also prepared and studied Tau-NBr₂ as an oxidant. In this case, the stoichiometry used was 1:1 (HOBr:taurine). The UV-vis spectra of Tau-NHCl (UV-vis band centered at 252 nm), Tau-NHBr (UV-vis band centered at 288 nm), and Tau-NBr₂ (UV-vis band centered at 241 nm) confirmed the formation of these oxidants [30] (data not shown).

Initially we focused on the intrinsic fluorescence of lysozyme, which is mainly attributed to the six tryptophan residues in lysozyme. The addition of a 4-fold molar excess of Tau-NHBr or Tau-NBr₂ to 5 μM lysozyme caused an almost complete depletion of the fluorescence band within 5 min, which is an indication of bleaching of tryptophan residues. On the other hand, HOCl and HOBr provoked only 40%–50% fluorescence bleaching (Fig. 1a and b). A significant difference was also found regarding the rate of oxidation, since the reactions with Tau-NHBr and Tau-NBr₂ were slower compared to the instantaneous depletion of tryptophan caused by HOBr and HOCl (Fig. 1c). The addition of Tau-NHCl caused only a small and statistically insignificant decrease in fluorescence, which was different from that seen with Tau-NHBr.

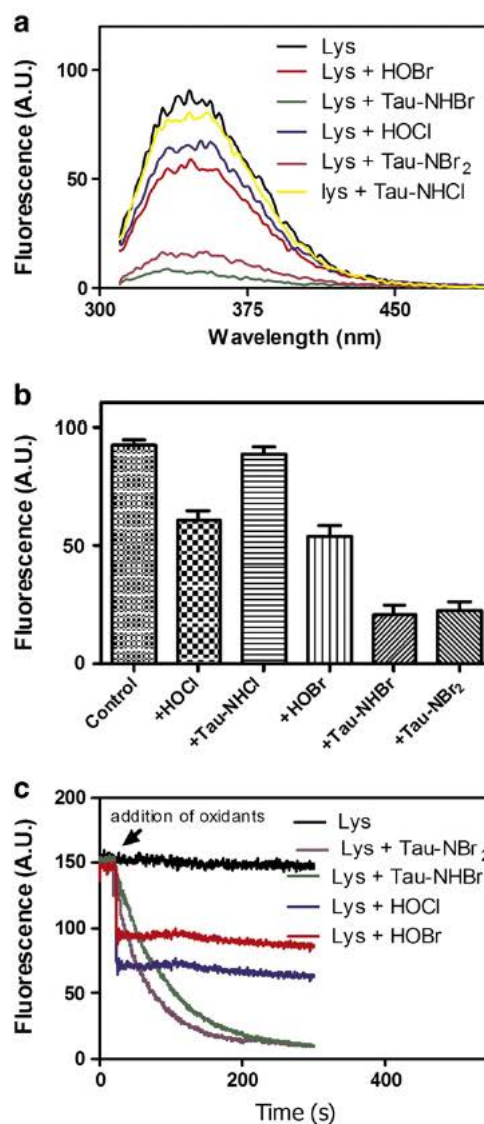


Fig. 1. Depletion of tryptophan emission band in lysozyme: a) the reaction mixtures consisted of 5 μM lysozyme and 20 μM oxidants in 0.01 M phosphate buffer, pH 7.0 at 25 °C. The spectra were taken 5 min after addition of the oxidants (λ_{ex} 295 nm/ λ_{em} 344 nm); b) relative efficiency of oxidation; c) rate of oxidation.

The higher efficacy of the haloamines as oxidants of tryptophan residues in lysozyme did not correspond with the generation of carbonyl groups when the protein was subjected to oxidation. Of note, protein carbonylation is a chemical modification that can be provoked by reactive oxygen species [36]. For hypohalous acids, the generation of haloamines in the side chains of amino acids, such as lysine and arginine, is a well-known pathway for formation of carbonyl groups [37]. The results in Fig. 2 show that Tau-NBr₂ was as effective as HOBr and more effective than Tau-NHBr in the generation of carbonyl groups. As expected, Tau-NHCl was a poor oxidant.

The differential features of Tau-NHBr and Tau-NBr₂ compared to HOBr and HOCl were verified by monitoring the oxidation of lysozyme by UV-vis absorption. The results in Fig. 3a and b show that the addition of haloamines provoked a decrease in the band centered at 280 nm, whereas the acids provoked an increase in the baseline due to the development of turbidity in the reaction medium.

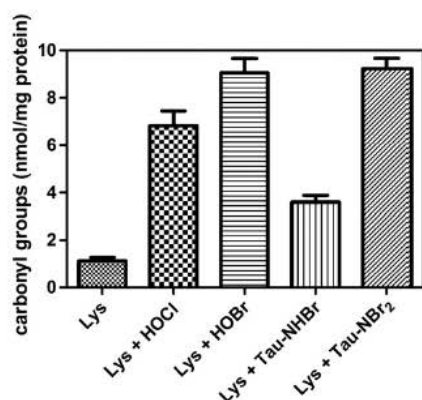


Fig. 2. Production of carbonyl groups in lysozyme: the reaction mixtures consisted of 50 μ M lysozyme and 200 μ M oxidants in 0.01 M phosphate buffer, pH 7.0 at 25 $^{\circ}$ C. Carbonyl groups were measured as DNPH hydrozone derivatives and expressed as nmol/mg protein.

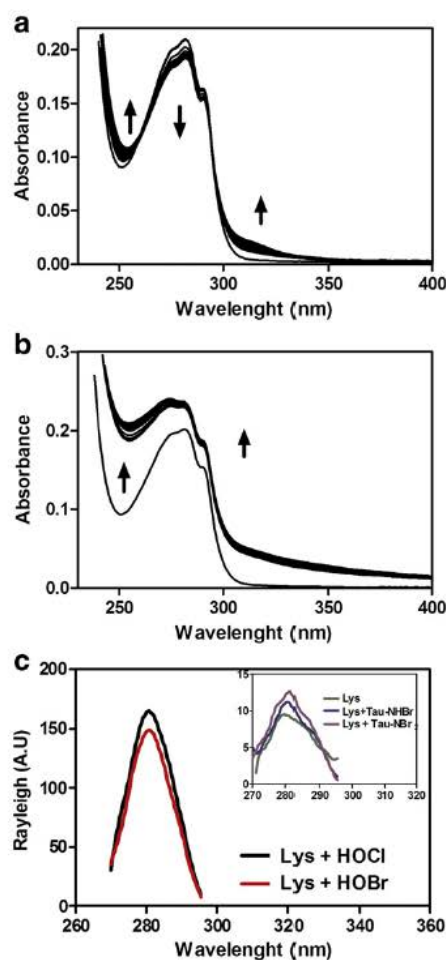


Fig. 3. Depletion of UV-vis intrinsic band of lysozyme and Rayleigh scattering: a) oxidation of lysozyme by Tau-NHBr; b) oxidation of lysozyme by HOBr. The scans were recorded at 1 min intervals; c) Rayleigh light scattering of lysozyme after oxidation. The reaction mixtures consisted of 5 μ M lysozyme and 20 μ M oxidants in 10 mM phosphate buffer, pH 7.0 at 25 $^{\circ}$ C.

The turbidity of the reaction medium, an indication of lysozyme aggregation, was confirmed by measuring the Rayleigh scattering at 90 $^{\circ}$ at the maximum of the elastic peaks of excitation light at 280 nm. The data depicted in Fig. 3c show that the oxidation by HOCl and HOBr provoked a significant alteration in the structure of the protein leading to aggregates. Despite their higher efficacy in the depletion of tryptophan in the protein, turbidity was not observed using Tau-NHBr or Tau-NBr₂ as oxidants (inset at Fig. 3c). This characteristic was observed using 4-fold and higher excess of oxidants. However, we chose to use a 4-fold excess in further experiments to avoid precipitation of the protein.

The differential properties of the oxidants were also studied in the context of unfolding and exposition of hydrophobic sites of the protein. These studies were performed using ANS as fluorescent probe, which is not fluorescent in hydrophilic medium, but has increased quantum yield when binding to buried hydrophobic sites in proteins. Increased fluorescence of ANS probes has been linked to protein unfolding [38]. In these experiments, the amino acid methionine was added after the oxidation reaction to remove excess oxidant that could oxidize the fluorescent probe. As seen in Fig. 4, native and oxidized lysozymes were poorly sensitive to ANS with only a small increase occurring after oxidation. The effect of ANS was better visualized by increasing the pH to 9.2, an experimental condition that has been used to study

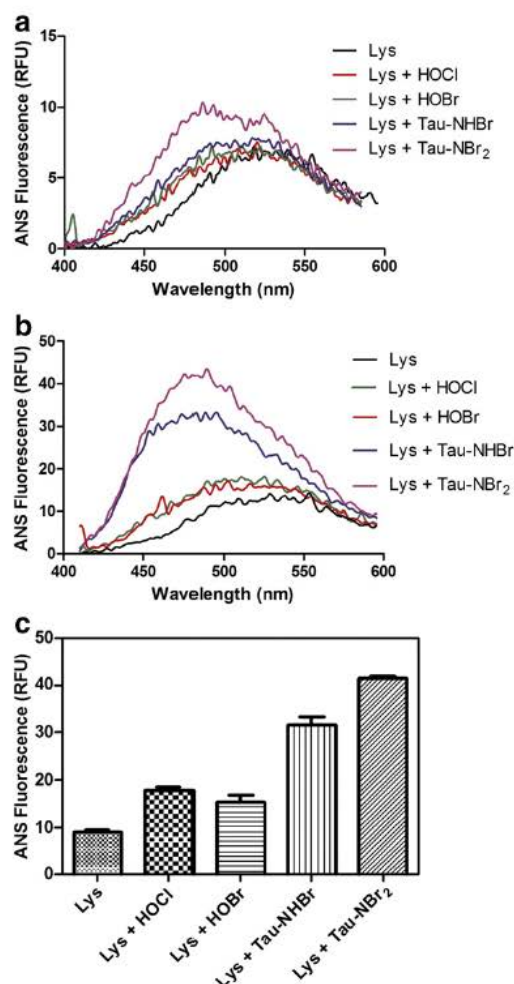


Fig. 4. Increase in the lysozyme ANS fluorescence provoked by oxidation: a) measurement at pH 7.0; b) measurement at pH 9.2. The reaction mixtures consisted of 5 μ M lysozyme and 20 μ M oxidants and 90 μ M ANS; c) effect of ANS at pH 9.2 on oxidized lysozyme.

lysozyme aggregation [31]. A significant difference was obtained between the acids and the haloamines, with the oxidation by Tau-NBr₂ being more effective in promoting increased ANS fluorescence. Besides the increase in the quantum yield, oxidation by haloamines provoked a blue shift in the fluorescence band, which is generally attributed to the development of a more hydrophobic environment for binding of ANS [38].

Considering that the rotational motion could be restricted due to an increase in the size of the protein as a result of aggregation [39], the effect of oxidation upon lysozyme was also studied by fluorescence anisotropy measurements. Since the intrinsic tryptophan fluorescence of the protein was depleted by oxidation, the measurement of anisotropy was made using ANS fluorescence. The results in Fig. 5 confirmed the previous light scattering experiments; the oxidation by HOCl and HOBr was significantly more effective at promoting the aggregation of lysozyme.

The effect of oxidation on the formation of amyloid fibrils in lysozyme was also evaluated. Lysozyme was induced to aggregate into amyloid fibrils by incubation with SDS at pH 9.2, and this structural change was evaluated by thioflavin T assay [33], which has been widely used to detect the formation of amyloid fibrils. This probe is not fluorescent in aqueous solution but has high affinity for amyloid fibrils, and once bound, its fluorescence quantum yield is significantly increased. Prior oxidation of lysozyme also caused an increase in the fluorescence of thioflavin, which is indicative of amyloid fibril aggregation. The effect was more intense using HOCl and followed by HOBr (Fig. 6). Addition of SDS after oxidation revealed that the molecular alterations in lysozyme caused by bromamines have an inhibitory effect on the formation of fibrillar structures induced by SDS (Fig. 7).

The effect of the oxidants on the glucosidase activity of lysozyme was also evaluated. In these experiments, after oxidation with the different oxidants, lysozyme was incubated with *M. lysodeikticus*, and lysozyme activity was measured by the rate of absorbance decay at 450 nm, a consequence of hydrolyses of the β -1,4 glycosidic linkages between the *N*-acetylmuramic acid and *N*-acetylglucosamine in the bacterial wall. The results in Fig. 8 show the effect of oxidation on the kinetic profile of hydrolysis of glycosidic linkages. Again, a significant difference among the oxidants was obtained, with Tau-NHBr and Tau-NBr₂ being more effective as inhibitors of enzymatic activity than the acid precursors.

4. Discussion

Oxidative damage in proteins is involved in a number of inflammatory and degenerative disorders [40]. Among the amino acid residues in proteins that are susceptible to oxidation by hypohalous acids are cysteine, methionine, tyrosine, and tryptophan [41]. In this context, the evidence that tryptophan oxidation is a biomarker for protein damage has led to

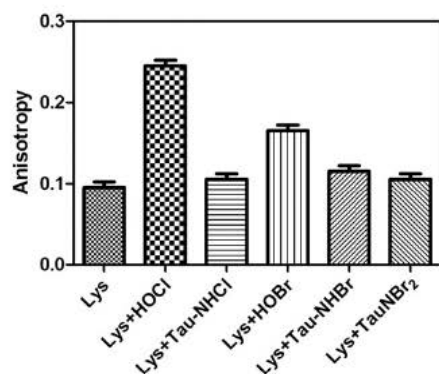


Fig. 5. Increase in the lysozyme-ANS anisotropy provoked by oxidation. The reaction mixtures consisted of 5 μ M lysozyme, 20 μ M oxidants, and 90 μ M ANS at pH 9.2.

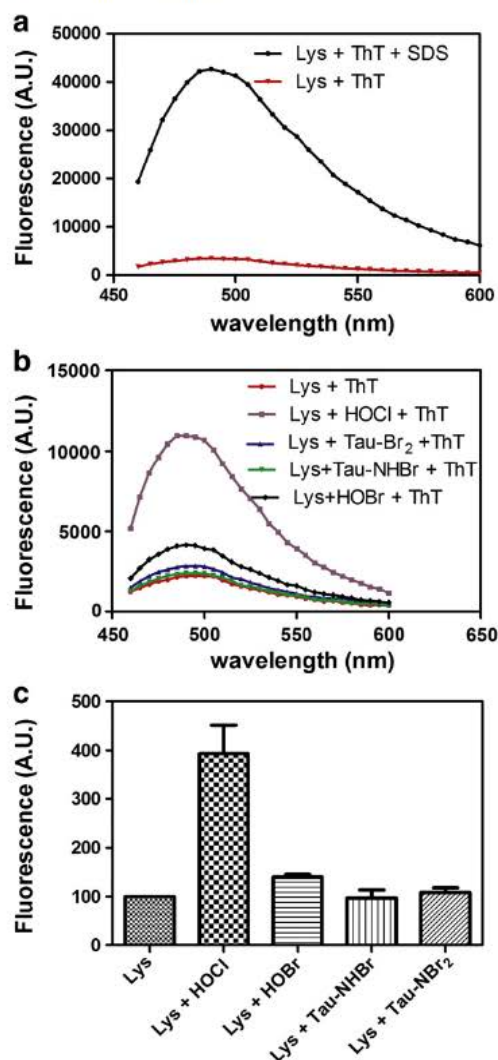


Fig. 6. Fluorescence emission spectra of thioflavin T: a) effect of SDS on lysozyme at pH 9.2; b, c) effect of oxidation of lysozyme on thioflavin T fluorescence at pH 9.2.

the development of immunological methods to assess the alteration of tryptophan in proteins [42]. Some endogenous oxidants have a degree of selectivity regarding the oxidation of tryptophan in proteins. This is the case with hypothiocyanous acid (HOSCN), which is produced by the oxidation of thiocyanate anion (SCN^-), through MPO and EPO catalyses [43]. Accordingly, we demonstrated that Tau-NHBr has a degree of selectivity for tryptophan in albumin [27]. Here, we obtained evidence that tryptophan residues in lysozyme are also preferentially oxidized by Tau-NHBr. Moreover, Tau-NBr₂ was also effective at oxidizing lysozyme. This is relevant since Tau-NBr₂ is produced without an excess of taurine and can be easily produced in inflammatory sites where neutrophils or eosinophils, sources of both HOBr and taurine, are present [14–16]. Additional evidence of the preference for bromamines by tryptophan residues was the partial inversion tendency regarding the oxidation of amino acid residues to carbonyl products. The formation of carbonyl products in proteins is linked to the oxidation of amino groups, at which hypohalous acids are effective [37]. Hence, some of the oxidants are depleted by these reactions, which could explain the lower efficacy in the oxidation of tryptophan residues in proteins. Associated to the lower efficacy, the depletion of tryptophan residues was faster using the acids, which is also an indication of lower selectivity compared to the bromamines.

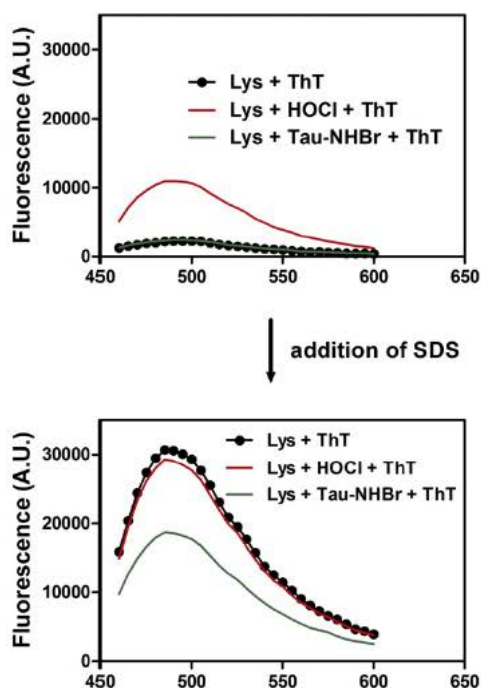


Fig. 7. Effect of SDS on fluorescence emission spectra of thioflavin T. Lysozyme was oxidized at pH 7.0 and 10-fold diluted in glycine buffer at pH 9.2 with 300 μ M SDS.

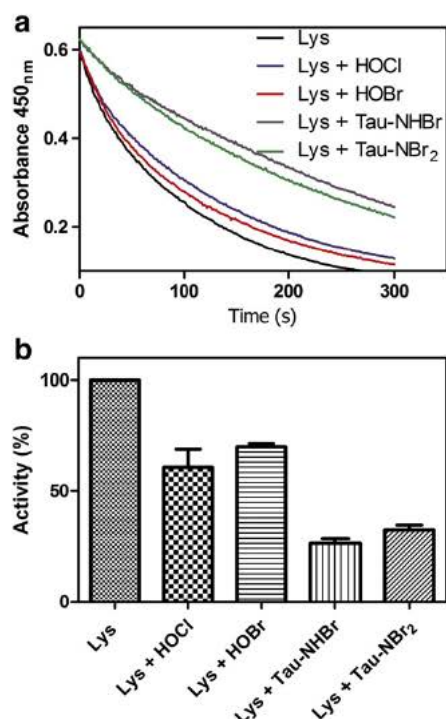


Fig. 8. Loss of lysozyme enzymatic activity provoked by oxidation: a) time profile of β -1,4 glycosidic linkages hydrolyzed in *Micrococcus lysodeikticus* in the absence and presence of oxidants; b) relative loss of enzymatic activity. The reaction mixtures consisted of 5 μ M lysozyme and 20 μ M oxidants in 0.01 M phosphate buffer, pH 7.4 at 25 $^{\circ}$ C.

The difference between hypohalous acid and bromamines also had consequences on the structure of oxidized lysozyme. The acids, but not the haloamines, provoked an intense aggregation of the protein, which was evidenced by the development of turbidity, Rayleigh scattering, and anisotropy measurements. Using 10-fold excess, visible floccus was observed and also provoked the precipitation of the protein, which made spectroscopic studies difficult. For this reason, we maintained the 4-fold excess for comparison between oxidants.

Aggregates produced by the oxidation of lysozyme presented spectroscopic properties that suggested the formation of amyloid fibrils, as measured by the thioflavin assay. As expected from previous experiments, oxidation using the acids was more effective at inducing amyloid fibril formation. Therefore, why is the preferential oxidation of tryptophan by the bromamines less effective in the formation of protein aggregates? A possible explanation lies in the necessity of this amino acid for protein–protein interactions. Indeed, as a hydrophobic amino acid able to form aromatic π -interactions, tryptophan is the predominant residue (21%) in hot spots sites that promote protein–protein association [44]. This property of tryptophan was suggested to be involved in the inhibitory effect that cyclodextrin develops upon the formation of SDS-induced amyloid aggregates of lysozyme. By capping this amino acid, cyclodextrin precludes the interaction between tryptophan residues, thereby preventing the interaction of some hydrophobic regions of lysozyme responsible for aggregation [33]. By depleting the tryptophan residues in lysozyme with higher efficacy, the bromamines could partially impede its aggregation. Corroborant with that, oxidation with bromamines, but not with the acid precursors, decreased the formation of SDS-induced fibril amyloids of lysozyme.

The oxidation by bromamines also produced strong differences regarding ANS fluorescence emission. As is well established, ANS binds to nonpolar microenvironments in proteins, and as such, the fluorescence intensity and blue-shifting of the spectrum are indications of protein unfolding and exposition of surface hydrophobicity [38]. Here, we found that lysozyme oxidized at pH 7.0 was insensitive to the addition of ANS. Indeed, native lysozyme was less sensitive to ANS, a feature that has been correlated with fact that the hydrophobic groups are hidden inside the native enzyme, which has a folded and compact structure [9]. On the other hand, the proteins oxidized by bromamines at pH 9.2 revealed a significant increase in the ANS fluorescence, an effect that was not observed for the oxidation by the acid precursors. This difference has some similarity with the unfolding process of lysozyme mediated by increasing the pH [45]. At pH 12.75, lysozyme assumes an intermediate molten globular state with high affinity for ANS. However, at pH 13.2, with the protein in a completely unfold state, its affinity for ANS is decreased [43]. Hence, the lower ANS fluorescence for lysozyme oxidized with the acids could be related to a higher degree of unfolding compared to the milder oxidation provoked by the bromamines.

As stated previously, lysozyme plays a role in immunomodulation [2–4]. The level of lysozyme in sputum is significantly decreased in COPD patients and can contribute to bacterial persistence in these patients [3]. If we accept the fact that neutrophils and eosinophils play an important role in pulmonary diseases like COPD and asthma [46,47], then Tau-NHBr and Tau-NBr₂ may be generated in the lungs. Hence, the inhibition of lysozyme by this oxidant could represent a pathway for the progression of these diseases. Our findings that Tau-NHBr and Tau-NBr₂ were significantly more effective than HOCl and HOBr as inhibitors of lysozyme enzymatic activity could have high biomedical significance.

The capacity of the bromamines as more effective inhibitors of lysozyme activity than the acid precursors is also an additional confirmation of their selectivity for tryptophan residues. In agreement, the solvent-accessible tryptophan residues Trp62, Trp63, and Trp123 in lysozyme are involved in binding to its oligosaccharide substrates [48]. The oxidation of lysozyme with 2-nitro-4-carboxyphenylsulfenyl

chloride, which provoked the conversion of Trp108 to a 2-thioaryl-derivative provoked the loss of 90% of the enzymatic activity [49]. The oxidation of lysozyme by *N*-bromo-succinimide, which oxidizes tryptophan residues to the oxindole derivative, provoked a 97% loss of its enzymatic activity [50]. The oxidation of Trp62 by ozone leading to its *N*-formylkynurenine derivative also inactivated the enzyme [25]. Of note, the formation of *N*-formylkynurenine during oxidation of lysozyme by ozone provoked a characteristic UV–vis band centered at 322 nm [25]. This band was also visible in our studies using the bromamines but not the acid precursors.

In summary, we have demonstrated that oxidation by hypohalous acid and bromamines could represent a new pathway for altering the biological properties and functions of lysozyme. The capacities of Tau-NHBr and particularly Tau-NBr₂ as inhibitors of lysozyme's bactericidal activity may represent a novel route for exacerbation of pulmonary infection, since leukocytes are rich sources of both taurine and HOBr. From another point of view, the oxidation of lysozyme by a small excess of oxidants, a condition that could also be found in inflammatory sites, may represent a new pathway for the initiation of protein aggregation and amyloid fibril formation. However additional experiments must be performed to further characterize the formation of amyloid fibrils.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) and from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- [1] T. Nakatsuji, R.L. Gallo, Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas, *J. Invest. Dermatol.* 132 (2012) 887.
- [2] S. Valisena, P.E. Varaldo, R. Fontana, Lysozyme inhibitors enhance immune response in mice, *New Microbiol.* 19 (1996) 25–30.
- [3] G.I. Parameswaran, S. Sethi, T.F. Murphy, Effects of bacterial infection on airway antimicrobial peptides and proteins in COPD, *Chest* 140 (2011) 611–617.
- [4] S.N. Mink, H. Jacobs, Zhao-Qin Cheng, K. Kasian, L.E. Santos-Martinez, R.B. Light, Lysozyme, a mediator of sepsis that intrinsically generates hydrogen peroxide to cause cardiovascular dysfunction, *Am. J. Physiol.* 297 (2009) 930–948.
- [5] G. Merlini, V. Bellotti, Lysozyme: a paradigmatic molecule for the investigation of protein structure, function and misfolding, *Clin. Chim. Acta* 357 (2005) 168–172.
- [6] M. Belli, M. Ramazzotti, F. Chiti, Prediction of amyloid aggregation in vivo, *EMBO Rep.* 12 (2011) 657–663.
- [7] L.N. Amaudov, R. de Vries, Thermally induced fibrillar aggregation of hen egg white lysozyme, *Biophys. J.* 88 (2005) 515–526.
- [8] R. Mishra, D. Sjölander, P. Hammarström, Spectroscopic characterization of diverse amyloid fibrils in vitro by the fluorescent dye Nile red, *Mol. Biosyst.* 4 (2011) 1232–1240.
- [9] Y.T. Hung, M.S. Lin, W.Y. Chen, S.S. Wang, Investigating the effects of sodium dodecyl sulfate on the aggregative behavior of hen egg-white lysozyme at acidic pH, *Colloids Surf. B* 81 (2010) 141–151.
- [10] C.M. Dobson, The structural basis of protein folding and its links with human disease, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 356 (2001) 133–145.
- [11] F. Chiti, P. Webster, N. Taddei, A. Clark, M. Stefani, G. Ramponi, C.M. Dobson, Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofibrils and fibrils, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 3590–3594.
- [12] Z. Prokopowicz, J. Marcinkiewicz, D.R. Katz, B.M. Chain, Neutrophil myeloperoxidase: soldier and statesman, *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 60 (2012) 43–54.
- [13] D.C. Dale, L. Boxer, W.C. Liles, The phagocytes: neutrophils and monocytes, *Blood* 112 (2008) 935–945.
- [14] P. Behe, A.W. Segal, The function of the NADPH oxidase of phagocytes, and its relationship to other NOXs, *Biochem. Soc. Trans.* 35 (2007) 1100–1103.
- [15] S.J. Weiss, S.T. Test, C.M. Eckmann, D. Roos, S. Regiani, Brominating oxidants generated by human eosinophils, *Science* 234 (1986) 200–203.
- [16] G.B. Schuller-Levis, E. Park, Taurine and its chloramine: modulators of immunity, *Neurochem. Res.* 29 (2004) 117–126.
- [17] W. Abebe, M.S. Mozaffari, Role of taurine in the vasculature: an overview of experimental and human studies, *Am. J. Cardiovasc. Dis.* 1 (2011) 293–311.
- [18] S.J. Weiss, R. Klein, A. Slivka, M. Wei, Chlorination of taurine by human neutrophils. Evidence for hypochlorous acid generation, *J. Clin. Invest.* 70 (1982) 598–607.
- [19] J. Marcinkiewicz, Taurine bromamine (TauBr) — its role in immunity and new perspectives for clinical use, *J. Biomed. Sci.* 17 (Suppl. 1) (2010) S3.
- [20] N. Güngör, A.M. Knaapen, A. Munia, M. Peluso, G.R. Haenen, R.K. Chiu, R.W. Godschalk, F.J. van Schooten, Genotoxic effects of neutrophils and hypochlorous acid, *Mutagenesis* 25 (2010) 149–154.
- [21] S.E. Gomez-Mejiba, Z. Zhai, M.S. Gimenez, M.T. Ashby, J. Chilakapati, K. Kitchin, R.P. Mason, D.C. Ramirez, Myeloperoxidase-induced genomic DNA-centered radicals, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 20062–20071.
- [22] C. Nussold, M. Kollroser, H. Köfeler, G. Rechberger, H. Reicher, A. Ullen, E. Bernhart, S. Walti, I. Kratzer, A. Hermetter, H. Hackl, Z. Trajanoski, A. Hrzenjak, E. Malle, W. Sattler, Hypochlorite modification of sphingomyelin generates chlorinated lipid species that induce apoptosis and proteome alterations in dopaminergic PC12 neurons in vitro, *Free Radic. Biol. Med.* 48 (2010) 1588–1600.
- [23] C.L. Hawkins, M.J. Davies, Inactivation of protease inhibitors and lysozyme by hypochlorous acid: role of side-chain oxidation and protein unfolding in loss of biological function, *Chem. Res. Toxicol.* 18 (2005) 1600–1610.
- [24] S.S. Wang, K.N. Liu, C.H. Wu, J.K. Lai, Investigating the influences of redox buffer compositions on the amyloid fibrillogenesis of hen egg-white lysozyme, *Biochim. Biophys. Acta* 1794 (2009) 1663–1672.
- [25] M. Kuroda, F. Sakiyama, K. Narita, Oxidation of tryptophan in lysozyme by ozone in aqueous solution, *J. Biochem.* 78 (1975) 641–651.
- [26] I. Sirangelo, C. Malmo, M. Casillo, A. Mezzogiomo, M. Papa, G. Irace, Tryptophanyl substitutions in apomyoglobin determines protein aggregation and amyloid-like fibril formation at physiological pH, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 45887–45891.
- [27] V.F. Ximenes, L.M. da Fonseca, A.C. de Almeida, Taurine bromamine: a potent oxidant of tryptophan residues in albumin, *Arch. Biochem. Biophys.* 507 (2011) 315–322.
- [28] S. Tokunaga, A. Kanayama, Y. Miyamoto, Modification of IκBα by taurine bromamine inhibits tumor necrosis factor α-induced NF-κB activation, *Inflamm. Res.* 56 (2007) 479–486.
- [29] C.N. Pace, F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley, T. Gray, How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein, *Protein Sci.* 4 (1995) 2411–2423.
- [30] E.L. Thomas, P.M. Bozeman, M.M. Jefferson, C.C. King, Oxidation of bromide by the human leukocyte enzymes myeloperoxidase eosinophil peroxidase formation of bromamines, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 2906–2913.
- [31] N. Jain, M. Bhattacharya, S. Mukhopadhyay, Kinetics of surfactant-induced aggregation of lysozyme studied by fluorescence spectroscopy, *J. Fluoresc.* 21 (2011) 615–625.
- [32] V. Militello, V. Vetri, M. Leone, Conformational changes involved in thermal aggregation processes of bovine serum albumin, *Biophys. Chem.* 105 (2003) 133–141.
- [33] A.A. Moosavi-Movahedi, P. Pirzadeh, S. Hashemnia, S. Ahmadiana, B. Hemmateenejad, M. Amania, A.A. Saboury, F. Ahmadd, M. Shamsipur, G.H. Hakimelahi, Fu-Yuan Tsai, H.H. Alijanvand, R. Yousefi, Fibril formation of lysozyme upon interaction with sodium dodecyl sulfate at pH 9.2, *Colloids Surf. B* 60 (2007) 55–61.
- [34] J.M. Fagan, B.G. Slezcka, I. Sohar, Quantitation of oxidative damage to tissue proteins, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31 (1999) 751–757.
- [35] D. Shugar, The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme, *Biochim. Biophys. Acta* 8 (1952) 302–309.
- [36] J. Yuichiro, M.C. Suzuki, D.A. Butterfield, Protein carbonylation, *Antioxid. Redox Signal.* 12 (2010) 323–325.
- [37] J. Himmelfarb, E. McMonagle, E. McMenamin, Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure, *Kidney Int.* 58 (2000) 2571–2578.
- [38] A. Hawe, M. Sutter, W. Jiskoot, Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization, *Pharm. Res.* 25 (2008) 1487–1499.
- [39] J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Third ed. Springer, New York, 2006.
- [40] A.G. Garcia, R. Rodriguez-Rocha, N. Madayiputhi, A. Pappa, M.J. Panayiotidis, R. Franco, Biomarkers of protein oxidation in human disease, *Curr. Mol. Med.* (2012) (Epub ahead of print).
- [41] A.J. Szuchman-Sapir, D.J. Pattison, M.J. Davies, Witting PK site-specific hypochlorous acid-induced oxidation of recombinant human myoglobin affects specific amino acid residues and the rate of cytochrome b5-mediated heme reduction, *Free Radic. Biol. Med.* 48 (2010) 35–46.
- [42] M. Ehrenschaft, S.O. Silva, I. Perdivara, P. Bilski, R.H. Sik, C.F. Chignell, K.B. Tomer, R.P. Mason, Immunological detection of N-formylkynurenine in oxidized proteins, *Free Radic. Biol. Med.* 46 (2009) 1260–1266.
- [43] C.L. Hawkins, D.I. Pattison, N.R. Stanley, M.J. Davies, Tryptophan residues are targets in hypochlorous acid-mediated protein oxidation, *Biochem. J.* 416 (2008) 441–452.
- [44] A.A. Bogan, K.S. Thorn, Anatomy of hot spots in protein interfaces, *J. Mol. Biol.* 280 (1998) 1–9.
- [45] M. Hameed, B. Ahmad, K.M. Fazili, K. Andrabi, R.H. Khan, Different molten globule-like folding intermediates of hen egg white lysozyme induced by high pH and tertiary butanol, *J. Biochem.* 141 (2007) 573–583.
- [46] M. Bafadhel, S. McKenna, S. Terry, V. Mistry, M. Pancholi, P. Venge, D.A. Lomas, M.R. Barer, S.L. Johnston, I.D. Pavord, C.E. Brightling, Blood eosinophils to direct corticosteroid treatment of exacerbations of COPD: a randomized placebo controlled trial, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* (2012) (Epub ahead of print).
- [47] T.G. Uhm, B.S. Kim, I.Y. Chung, Eosinophil development, regulation of eosinophil-specific genes, and role of eosinophils in the pathogenesis of asthma, *Allergy Asthma Immunol. Res.* 4 (2012) 68–79.
- [48] K.L. Wierzbowski, Intramolecular electron transfer between tryptophan radical and tyrosine in oligoproline-bridged model peptides and hen egg-white lysozyme, *Acta Biochim. Pol.* 44 (1997) 627–644.
- [49] E. Bocchi, F.M. Veronese, A. Fontana, C.A. Fenassi, Studies on the function of tryptophan-108 on lysozyme, *Acta Vitaminol. Enzymol.* 29 (1975) 266–269.
- [50] R. Cassels, C.M. Dobson, F.M. Poulsen, R.J. Williams, Study of the tryptophan residues of lysozyme using ¹H nuclear magnetic resonance, *Eur. J. Biochem.* 92 (1978) 81–97.