

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA**

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE E *SCAVENGER* DA TAURINA EM  
CONCENTRAÇÕES FISIOLÓGICAS CONTRA ESPÉCIES REATIVAS  
DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO**

**Mestrando: Max William Soares Oliveira**

**Orientador: Prof. Dr. Fábio Klamt**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em Ciências  
Biológicas: Bioquímica, como requisito  
para obtenção do grau de mestre em  
bioquímica.

Porto Alegre, 2008

## **AGRADECIMENTOS**

Aos amigos e colegas do laboratório

Ao CNPq

## ÍNDICE

<b>PARTE I</b> .....	<b>4</b>
RESUMO .....	5
ABSTRACT .....	6
LISTA DE ABREVIATURAS .....	7
LISTA DE FIGURAS .....	8
APRESENTAÇÃO .....	9
INTRODUÇÃO.....	10
1. Taurina: Aspectos gerais .....	10
1.2 Taurina como antioxidante/scavenger.....	14
OBJETIVOS .....	25
1. Objetivos gerais: .....	25
2. Objetivos específicos:.....	25
<b>PARTE II</b> .....	<b>26</b>
CAPÍTULO 1 – ARTIGO CIENTÍFICO .....	27
CAPÍTULO 2 – RESULTADOS PRELIMINARES .....	57
<b>PARTE III</b> .....	<b>64</b>
DISCUSSÃO .....	65
CONCLUSÕES .....	74
PERSPECTIVAS .....	75
REFERÊNCIAS .....	77
ANEXOS.....	90

## **PARTE I**

## RESUMO

A taurina (ácido 2-aminoetanosulfônico) é um  $\beta$ -aminoácido não utilizado para a síntese protéica, encontrada livremente no líquido intracelular e um dos aminoácidos livres mais abundantes nos leucócitos, cérebro, músculo esquelético, retina e coração, tendo um papel essencial em diversos processos biológicos. As propriedades antioxidantes da taurina já foram estudadas e testadas, no entanto, a maior parte dos estudos feitos até hoje utilizou concentrações menores do que as fisiológicas. O objetivo deste estudo é investigar as propriedades antioxidantes e de *scavenger* das concentrações fisiológicas de taurina (*i.e.*: 1, 15, 30 e 60 mM) contra diversas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, utilizando diferentes técnicas *in vitro*. Nós achamos diferentes reatividades da taurina contra diferentes oxidantes testados. Nenhuma reatividade significativa entre taurina e peróxido de hidrogênio foi encontrada. Por outro lado, a taurina reagiu de forma significativa com óxido nítrico e superóxido. Da mesma forma, a taurina foi capaz de impedir a perda da atividade da superóxido dismutase (CuZnSOD) – um alvo descrito do ONOO<sup>-</sup> – causada por peroxinitrito *in vitro*. Além disso, a taurina pode agir como *scavenger* do radical peroxil e diminuir o dano *ex vivo* causado pelo tert-butilhidroperóxido em fatias de fígado de rato. Os dados deste trabalho demonstram que a taurina, em concentrações fisiológicas, pode ser um eficiente *scavenger* de diferentes espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, sugerindo um possível papel nas funções celulares e mitocondrial.

## ABSTRACT

Taurine antioxidant properties have already been studied and tested, however most part of the studies used lower concentrations than physiological. This study was undertaken to investigate the scavenging and antioxidant activities of physiological concentrations of taurine (*i.e.*: 1, 15, 30 and 60 mM) against several reactive oxygen and nitrogen species, using different *in vitro* assays. We found different reactivity of taurine against different oxidants. No significant reactivity between taurine and hydrogen peroxide was found. Instead, taurine exhibited a significant reactivity with nitric oxide and superoxide. Also, taurine was able to restore superoxide dismutase activity loss caused by peroxynitrite *in vitro*. In addition, taurine can scavenge peroxy radical and decrease the *ex vivo* damage caused by tert-butylhydroperoxide in rat liver slices. The aforementioned experimental data showed that taurine, at physiological concentrations, efficiently scavenge different reactive oxygen species and reactive nitrogen species, suggesting that these properties could be pivotal for the maintenance of cellular and mitochondrial functions.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- NPS: Nitroprussiato de sódio
- ROO<sup>•</sup>: Radical peroxil
- ONOO<sup>-</sup>: Peroxinitrito
- NO<sup>•</sup>: Óxido nítrico
- O<sub>2</sub><sup>•-</sup>: Radical ânion superóxido
- SOD: Superóxido dismutase
- NOS: Óxido nítrico sintase
- iNOS: Óxido nítrico sintase induzível
- ERO: Espécies reativas de oxigênio
- ERN: Espécies reativas de nitrogênio
- t-BHP: tert-butilhidroperóxido
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrogênio
- AAPH: 2,2'-Azobis (2-aminopropano) dihidroclorato
- DTNB: 5,5- ácido ditiobis-2 nitrobenzóico
- <sup>•</sup>OH: Radical hidroxil
- DNA: Ácido desoxiribonucléico
- HOCl: Ácido hipocloroso
- LDH: Lactato desidrogenase
- EPR: Ressonância eletrônica paramagnética
- DMPO: 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido
- DHR: Dihidrorodamina 123
- SIN-1: 3-morfolino-sidnomina
- GABA: ácido γ-aminobutírico
- PKC: Proteína cinase C
- PKA: Proteína cinase A
- TauT: Transportador de taurina da membrana plasmática

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estrutura molecular e estrutura atômica da taurina.....11
- Figura 2:** A inter-relação do óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ), superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) e dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2^\bullet$ ).....17
- Figura 3:** Vias de formação de ERO, vias enzimáticas de eliminação de ERO, processo de peroxidação lipídica, papel da glutathiona (GSH) e outros antioxidantes (Vitamina E, Vitamina C, ácido lipóico) no gerenciamento do estresse oxidativo.....19
- Figura 4:** Figura ilustrativa de um possível transportador mitocondrial de taurina.....75



## APRESENTAÇÃO

Esta dissertação constitui-se de:

**Item I** – Introdução: Breve fundamentação que originou o trabalho.

**Item II** – Objetivos: Os objetivos gerais que orientaram esta dissertação.

**Item III** – Artigo científico.

**Item IV** – Resultados preliminares.

**Item V** – Discussão: São apresentados os comentários gerais sobre os resultados obtidos neste trabalho.

**Item VI** – Conclusões: São apresentadas as conclusões sobre os resultados obtidos nesse trabalho.

**Item VII** – Perspectivas: São apresentadas algumas idéias de projetos futuros nessa mesma linha de pesquisa.

**Item VIII** – Referências bibliográficas.

**Item IX** – Anexos.

## INTRODUÇÃO

### 1. Taurina: Aspectos gerais

A taurina (ácido 2-aminoetanosulfônico) foi primeiramente descoberta e isolada pelos pesquisadores austríacos Friedrich Tiedemanne e Leopold Gmelin em 1827 (Birdsall, 1998) ao ser encontrada na bile do boi em altas concentrações. Seu nome originou-se do nome em latim da espécie *Bos taurus*, onde foi descoberta.

Durante muito tempo a taurina foi considerada um nutriente não-essencial para os humanos. Sua importância na nutrição humana passou a ser considerada relevante somente em 1975 quando foi observado que bebês prematuros alimentados por nutrição parenteral total não conseguiam manter os níveis plasmáticos e urinários normais de taurina, ao contrário de bebês alimentados com leite materno (Chesney, 1988). O estudo do leite materno indicou grandes quantidades de taurina, sendo o segundo aminoácido livre mais abundante, atrás apenas do glutamato (Agostoni et al. 2000), revelando assim uma necessidade deste  $\beta$ -aminoácido para neonatos.

Sua deficiência está associada com diversos processos patológicos, incluindo cardiomiopatia, degeneração da retina e retardo no crescimento, especialmente se esta privação ocorre em fase de desenvolvimento.

Os mamíferos em desenvolvimento necessitam de taurina obtida da dieta, uma vez que existe uma baixa atividade das enzimas necessárias para a síntese deste  $\beta$ -aminoácido a partir de outros aminoácidos sulfurados – como metionina e cisteína – na infância. Já no adulto, o cérebro ainda necessita de um aporte exógeno por manter uma baixa atividade enzimática para síntese (Chesney, 1988). Por esta razão, a taurina

passou a ser considerada condicionalmente essencial em fase de desenvolvimento humano, principalmente para o sistema nervoso, rins e retina.

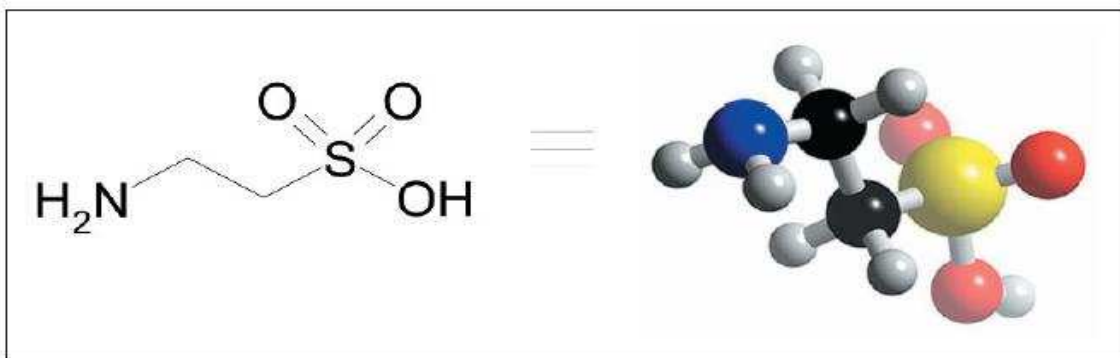


Figura 1: Estrutura molecular (esquerda) e estrutura atômica (direita) da taurina.

Retirado de Szymansky (2008).

A taurina é um  $\beta$ -aminoácido não utilizado para a síntese protéica, encontrada livremente no líquido intracelular e um dos aminoácidos livres mais abundantes nos leucócitos, cérebro, músculo esquelético, retina e coração, tendo um papel essencial em diversos processos biológicos como no desenvolvimento do sistema nervoso central e da retina, modulação de cálcio, estabilização da membrana, reprodução e imunidade (Schuller-Levis & Park, 2003). Nos  $\beta$ -aminoácidos, o grupamento amino está ligado ao carbono  $\beta$  ( $C^\beta$ ) e não ao carbono  $\alpha$ , sendo que a taurina contém um grupamento sulfônico ( $-SO_3$ ) ao invés do grupamento carboxílico ( $COOH$ ) (Figura 1).

De fato, a taurina pode ser achada em altas concentrações em algas e no reino animal, incluindo insetos e artrópodes, no entanto, está normalmente ausente ou presente em traços em bactérias e no reino vegetal. Sua distribuição é ubíqua e pode ser encontrada em altas concentrações nas células de mamíferos (10-80 mM) (Huxtable, 1992), no entanto, suas concentrações no plasma são bem modestas (10-100  $\mu$ M). Os níveis de taurina no coração (25-30 mM) e pulmão (11-17 mM) são maiores do que no

fígado (10 mM), mas os maiores níveis estão nos neutrófilos e na retina, onde a concentração citosólica é 50 e 70 mM, respectivamente (Green et al. 1991; Sturman,1993). Enquanto a conjugação dos sais biliares talvez seja sua função mais bem descrita, ela conta apenas como uma pequena porção do reservatório corporal total em humanos.

As concentrações mais altas de taurina ocorrem no cérebro em desenvolvimento, na época em que a concentração de outros aminoácidos livres tende a ser baixa. Com o desenvolvimento, as concentrações de taurina diminuem, com os níveis adulto sendo aproximadamente um terço dos neonatos (Huxtable, 1992). Este padrão foi observado em humanos, macacos, ratos, coelhos, camundongos e em insetos.

A taurina é obtida tanto diretamente, por uma dieta rica em frutos do mar e derivados de carne, quanto indiretamente, pela sua biossíntese a partir dos aminoácidos precursores metionina e cisteína no fígado (Huxtable, 1992). Este processo bioquímico envolve duas enzimas diferentes: A primeira, cisteína dioxigenase, promove a oxidação da cisteína a cisteína ácido sulfínico na qual é descarboxilada pela enzima cisteína ácido sulfínico descarboxilase – a enzima controle dessa via – para produzir hipotaurina. Finalmente, hipotaurina é oxidada a taurina (Bouckenooghe et al. 2006). A expressão das enzimas cisteína dioxigenase e cisteína ácido sulfínico descarboxilase acontece principalmente no fígado, no entanto, essas duas enzimas já foram identificadas em tecido extra-hepático, como no rim, astrócitos e testículos; indicando pontos alternativos de síntese de taurina (Nakamura et al. 2006; Ide et al. 2002).

A capacidade de biossíntese de taurina varia entre as espécies, comparados com ratos, por exemplo, homens, primatas e felinos exibem atividades in vitro muito baixas de cisteína ácido sulfínico descarboxilase – enzima considerada passo limitante da síntese de taurina a partir de cisteína. A taurina precisa ser suplementada na dieta dos

gatos domésticos, uma vez que a falta desse nutriente em gatos os leva à cegueira (Rana & Sanders, 1986). Como a taurina não é encontrada em vegetais, a quantidade de taurina excretada na urina de vegetarianos é baixa quando comparada a onívoros (em torno de 60% menor), assim como seus níveis plasmáticos por causa de uma maior reabsorção renal de taurina. Contrariamente, quando a quantidade de taurina advinda da dieta é grande, a subsequente excreção urinária também é grande.

A natureza zwitteriônica da taurina confere a ela uma alta solubilidade em água e baixa lipofilicidade. Conseqüentemente, comparada com aminoácidos carboxílicos, sua difusão através de membranas lipofílicas é lenta (Huxtable, 1992). Por esse motivo, a captação de taurina é feita por um sistema transportador dependente de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  na membrana celular, o transportador de taurina (TauT), por transporte secundário ativo. Este transportador tem uma alta afinidade/especificidade por taurina, e a captação de uma molécula de taurina via TauT envolve 2  $\text{Na}^+$  e 1  $\text{Cl}^-$ , podendo ser regulado por espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (Voss et al. 2004). O TauT possui diversos resíduos de serina e treonina voltados para o citosol que são alvos potenciais para a fosforilação mediada por proteína cinase A e C. Esse transportador é modulado por fosforilação de proteína cinase C (PKC), diminuindo o transporte de taurina, e por proteína cinase A (PKA), diminuindo ou aumentando o transporte, dependendo do tecido estudado (Han et al. 2006).

Muitos trabalhos têm demonstrado que a taurina exerce diversas funções citoprotetoras e de vital importância para o organismo (Bouckenooghe et al. 2006; Cozzi, 1995; Sturman, 1993 ). No entanto, o mecanismo de ação da taurina ainda precisa ser melhor investigado, principalmente o papel da taurina como uma possível molécula antioxidante nos sistemas biológicos.

## 1.2 Taurina como antioxidante/*scavenger*<sup>1</sup>

As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO/ERN) são produzidas naturalmente em nosso organismo, através de processos metabólicos oxidativos e, muitas vezes, são de extrema utilidade, como nas situações em que há necessidade de ativação do sistema imunológico (por exemplo, na utilização do peróxido de hidrogênio pelos macrófagos para destruir bactérias e outros elementos estranhos); na desintoxicação de drogas; e na produção do fator relaxante derivado do endotélio (Schneider & Oliveira, 2004). Este fator, o óxido nítrico (NO<sup>\*</sup>), é extremamente importante nos processos que desencadeiam o relaxamento dos vasos sanguíneos (Ignarro et al. 1999). Espécies reativas de oxigênio são produzidas durante o metabolismo aeróbico, principalmente via redução parcial do O<sub>2</sub> na cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, através de exposição à radiação ou por componentes químicos do ambiente (como poluição). Por causa de sua alta reatividade, podem causar diversos tipos de danos celulares. A constante produção dessas espécies criou a necessidade de uma adaptação e/ou mecanismo de defesa celular para minimizar os efeitos deletérios mediados por elas.

Diferentes tecidos apresentam diferentes quantidades dessas defesas, que são tanto enzimáticas – como a superóxido dismutase (SOD); que catalisa a dismutação do ânion superóxido a peróxido de hidrogênio e a catalase (CAT); que promove a catálise do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) até água – quanto não-enzimáticas – como ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno (precursor de vitamina A) e grupos fenóis de plantas (flavonóides).

---

<sup>1</sup> Uma molécula *scavenger* é toda substância química capaz de atenuar ou dissipar os efeitos tóxicos de outra molécula. Referida como uma substância capaz de eliminar as impurezas de uma mistura.

Um desequilíbrio entre a produção de ERO/ERN e sua eliminação pelos sistemas antioxidantes favorecendo a superprodução dessas espécies é chamado de estresse oxidativo e estresse nitrosativo (Klatt & Lamas, 2000; Ridnour et al. 2005). Esta superprodução é o mecanismo comum por trás de muitas neuropatologias, responsabilizando-se por danos a lipídios, proteínas e DNA. Por causa disso, o estresse oxidativo e nitrosativo tem sido implicado numa grande variedade de doenças humanas assim como no processo de envelhecimento (Valko et al. 2007).

A mitocôndria é a organela responsável pela produção de energia celular, tornando-se a principal fonte de produção dessas espécies e seu conseqüente alvo de dano (Boveris & Navarro, 2008). A integridade das funções mitocondriais é essencial à vida celular, porque elas são a maquinaria celular que nos permite a utilização de oxigênio, além de estarem envolvidas em muitos aspectos da estabilidade celular. Distúrbios da função mitocondrial levam à deficiência das funções celulares, expressas como doenças, deficiências ou morte celular (Zhang & Qi, 2008; Gao et al. 2008). O processo de produção dessas espécies é iniciado quando os elétrons vazam da cadeia transportadora de elétrons e reduzem o oxigênio molecular originando o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) que é prontamente dismutado pela enzima superóxido dismutase (SOD) a  $H_2O_2$ , que por sua vez é transformado em água pela enzima catalase (CAT) ou pela glutathione peroxidase (GPx). No entanto, alguns metais como o ferro e o cobre também podem reagir com o  $H_2O_2$  pela reação de Fenton e formar um radical de maior poder oxidante, chamado hidroxil ( $\bullet OH$ ), causando danos diretamente ao DNA. Esse mesmo radical pode atacar um hidroperóxido de membrana iniciando a cascata de peroxidação lipídica, propagada pelo radical peroxil ( $ROO^{\bullet}$ ), que também pode atacar o DNA causando mutagênese (Lim et al. 2004) e deve ser interrompida por algum antioxidante (ver figura 3; pág. 19).

As mitocôndrias também são capazes de produzir  $\text{NO}^\bullet$  através da isoforma mitocondrial da enzima NOS - óxido nítrico sintase - (Haynes et al. 2004), podendo formar espécies de maior poder danoso, como o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), pela sua reação com o superóxido (Figura 2). Esta ERN é um poderoso agente nitrante, que inativa sítios críticos para o funcionamento enzimático, formando um aduto imunodetectável nos resíduos de tirosina, a 3-nitrotirosina, além de danificar proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, por ação direta ou geração de outras espécies reativas. A formação de 3-nitrotirosina resulta da decomposição homolítica do  $\text{ONOO}^-$  que gera dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2^\bullet$ ) e radical hidroxil ( $^\bullet\text{OH}$ ), porém essa reação tem um pequeno papel *in vivo*, uma vez que o  $\text{ONOO}^-$  reage rapidamente com dióxido de carbono, resultando no radical carbonato ( $\text{CO}_3^{\bullet-}$ ). Esse radical é mais seletivo e mais tóxico do que o radical  $^\bullet\text{OH}$ , no entanto, irá iniciar muitas das reações danificadoras normalmente atribuídas ao  $^\bullet\text{OH}$  e é talvez um oxidante biológico mais relevante (Pacher et al. 2007).

Por serem as organelas mais redox-ativas do corpo, elas são mais facilmente afetadas pelo estresse oxidativo e nitrosativo. Normalmente, durante o metabolismo mitocondrial basal, essas espécies são freqüentemente neutralizadas pelas defesas antioxidantes. Contudo, sob estados patológicos os mecanismos antioxidantes são incapazes de combater a excessiva formação de ERO/ERN e elas são depletadas. Toda essa produção de ERO/ERN converte a mitocôndria em uma organela alvo do dano oxidativo, o que acaba influenciando na sua eficácia, amplificando e perpetuando o estresse oxidativo. O resultado destes processos é a inflamação celular, danificação de pontos vitais e até mesmo morte celular. As ERO/ERN podem iniciar/induzir um processo de envelhecimento evocando uma rápida senescência e conseqüente morte prematura das células por apoptose. O declínio das funções mitocondriais e produção de



energia resultando em maior estresse oxidativo e dano celular tem um papel significativo no envelhecimento e doenças degenerativas (Mandelker, 2008).

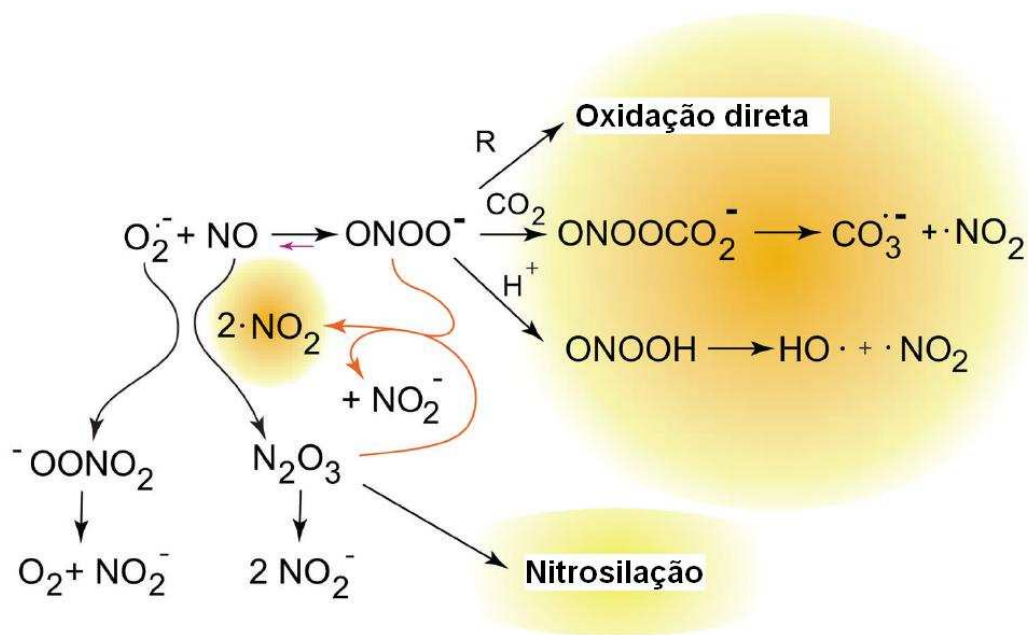


Figura 2: A inter-relação do óxido nítrico ( $NO\cdot$ ), superóxido ( $O_2\cdot^-$ ), peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) e dióxido de nitrogênio ( $NO_2\cdot$ ). Quando óxido nítrico e superóxido estão ambos presentes, eles podem reagir com dióxido de nitrogênio para formar  $N_2O_3$  e peroxinitrato. Esse último decompõe-se para originar nitrito e oxigênio, enquanto  $N_2O_3$  pode reagir com tióis, formando nitrosotióis ou com o ânion hidróxido para originar nitrito. Adaptado de Pacher et al. (2007).

As concentrações mitocondriais de taurina ainda não foram descritas, porém suas altas concentrações celulares e suas propriedades sugerem-na uma função antioxidante e de *scavenger*, provavelmente protegendo esta organela do estresse oxidativo. Estudos recentes com ratos *knockout*<sup>2</sup> para o transportador de taurina da membrana plasmática (TauT) demonstraram aberrações estruturais na mitocôndria, sugerindo uma possível correlação entre o transportador celular da membrana de taurina

<sup>2</sup> Um rato *knockout* é um rato modificado por engenharia genética para que um ou mais de seus genes estejam inativados mediante uma técnica chamada “gene *knockout*”.

e a mitocôndria (Schuller-Levis & Park, 2003). Estudos recentes do nosso grupo de pesquisa demonstraram que em células cultivadas, a captação de taurina radioativa do meio de cultura se acumula preferencialmente na fração mitocondrial (Klamt & Shacter, 2005), sugerindo a existência de um transportador mitocondrial de taurina ainda não descrito. Curiosamente, em animais que não possuem as rotas de biossíntese para este aminoácido, como os felinos, uma dieta deficiente em taurina leva ao desenvolvimento de cardiomiopatias, que são uma das principais manifestações clínicas das encefalomiopatias mitocondriais humanas.

A taurina é um osmólito orgânico utilizado pelas células na regulação do volume celular para se adaptar a um desbalanço osmótico (Tappaz, 2004). Outras pesquisas demonstram que a taurina pode proteger o coração do dano de reperfusão induzido por neutrófilos e estresse oxidativo porque a atividade respiratória dos neutrófilos é significativamente reduzida na presença de taurina. Esse efeito protetor da taurina é sugerido que seja mediado por suas propriedades antioxidantes. Através da sua habilidade de neutralizar o ácido hipocloroso (HOCl), uma substância oxidante potente, a taurina é capaz de atenuar o dano ao DNA causado por compostos aromáticos de amina *in vitro* (Kozumbo et al. 1992). Por causa da estrutura única da taurina, contendo um ácido sulfônico ao invés de um ácido carboxílico, ela não forma um aldeído a partir de um ácido hipocloroso, formando ao invés disso um composto de cloroamina relativamente estável (taurina-cloramina) (TnCl). Portanto, a taurina é um antioxidante que especificamente medeia a concentração do íon cloro e do ácido hipocloroso e protege o corpo dos efeitos potencialmente tóxicos da liberação de aldeído. Outras propriedades antioxidantes da taurina têm sido sugeridas, mas seu possível efeito protetor a um estresse oxidativo em sistemas biológicos precisa ainda ser mais profundamente investigado.

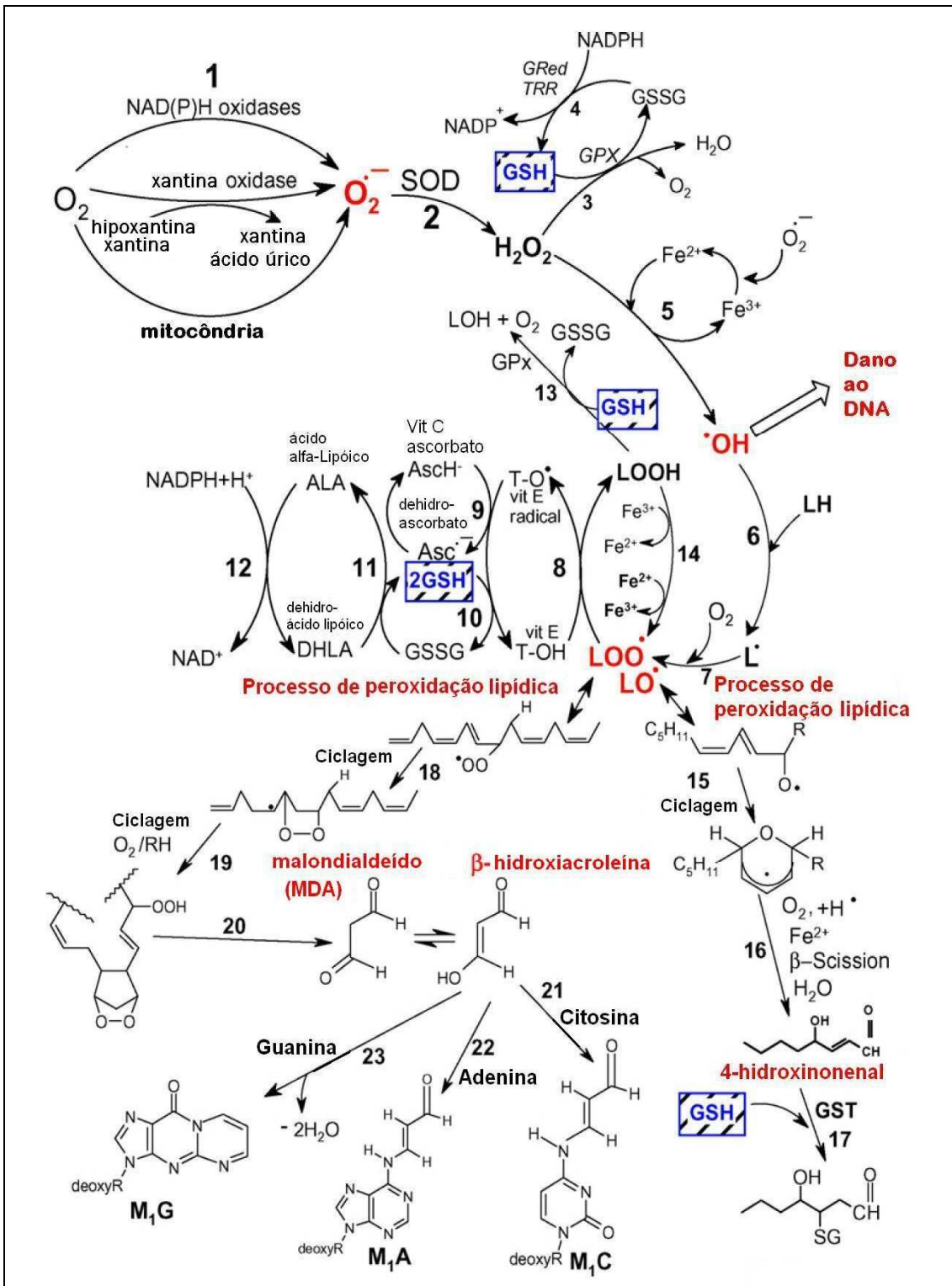


Figura 3: Vias de formação de ERO, vias enzimáticas de eliminação de ERO, processo de peroxidação lipídica, papel da glutatona (GSH) e outros antioxidantes (Vitamina E, Vitamina C, ácido lipóico) no gerenciamento do estresse oxidativo. Adaptado de Valko (2007).

Tadolini et al. (1995), demonstraram que a hipotaurina (um precursor da taurina), em concentrações fisiológicas, pode inibir a peroxidação lipídica, por agir como *scavenger* de  $\cdot\text{OH}$ , também inibindo a auto-oxidação do  $\text{Fe}_2^+$  que leva à formação de ferro perferril, mas não afeta a produção de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  enquanto a taurina (em concentrações até 10 mM) não teve nenhum efeito no sistema experimental estudado. No entanto, a taurina pode modular os níveis de peroxidação lipídica regulando os íons  $\text{Ca}_2^+$  pois eles estão envolvidos na patogênese do dano celular mediada por radicais de oxigênio (Braughter, 2005).

Taurina e hipotaurina (ambas em concentrações até 25 mM) em retina isolada de sapo, também interferem com uma reação *fenton-like*<sup>3</sup> que causa a formação dos radicais alcoxil, um dos iniciadores do processo de peroxidação lipídica (Pasantes-Morales & Cruz, 1985). Já Arouma et al (1988), afirmaram que parece improvável que a verdadeira função da taurina *in vivo* seja agir como uma molécula antioxidante, porque de acordo com os procedimentos experimentais deles a taurina parece não ter reagido com  $\text{H}_2\text{O}_2$  (até a concentração de 14,40 mM) ou  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (até 1,5 mM), em um sistema que utilizou o sistema xantina/xantina oxidase como doador desse radical. Além do mais, a taurina parece ser um pobre *scavenger* de  $\cdot\text{OH}$ , sendo a hipotaurina mais eficiente. Corroborando com este fato, concentrações de taurina até 2 mM não foram capazes de proteger a  $\alpha$ -antiproteínase contra inativação a partir de  $\text{HOCl}$  (Arouma et al. 1988).

Outros estudos mostraram que a taurina sozinha não protege os lipídios de ERO da oxidação, mas em conjugação com o retinol ela aumenta a atividade antioxidante dessa mesma molécula (Keys & Zimmerman, 1999). O sinergismo antioxidante da taurina com o retinol pode explicar a proteção da taurina *in vivo* contra

---

<sup>3</sup> Reação que exhibe as mesmas características da reação de Fenton.

oxidação induzida pela luz (e suas altas concentrações na retina, ~60 mM). A adição de 5 mM de taurina a um meio de incubação de lentes contendo glicose reduziu o vazamento de LDH (um indicativo de viabilidade celular) enquanto uma técnica de EPR usando 5,5-dimethyl-1-pirolone-N-oxide (DMPO) mostrou uma redução na amplitude do sinal do superóxido, mas não no sinal do radical hidroxil, quando a taurina foi adicionada à solução teste. Além disso, o poder *scavenger* da taurina contra o superóxido foi maior do que o poder *scavenger* contra o radical hidroxil. Portanto, eles concluíram que a taurina pode ter um papel muito importante no sistema antioxidante da retina, assim como nas lentes (Kilic et al. 1999).

Em concentrações até 20 mM, a taurina pode inibir a geração de ERO induzidas por homocisteína e o desbalanço na regulação de cálcio, que pode gerar ERO em mitocôndria de miocárdio, embora não tenha tido nenhum efeito na geração de superóxido (Chang et al. 2004). Acima de 30 mM, a taurina reduziu suavemente a oxidação da DHR mediada pela formação de ONOO<sup>-</sup> derivada de SIN-1 em culturas de células PC12, além de induzir proliferação celular (Mehta & Dawson, 2001).

Efeitos deletérios da produção de ERO durante a maturação do oócito podem afetar o desenvolvimento embrionário de búfalos (Blondin et al. 1997). Alguns estudos *in vitro* de cultura de embrião demonstraram que a suplementação de taurina ao meio de cultura (com concentrações de até 3 mM) é benéfica para o desenvolvimento do embrião. Efeitos positivos similares da taurina no desenvolvimento embrionário também têm sido reportados para diferentes espécies, incluindo ratos (Dumoulin et al. 1992), porcos (Reed et al. 1992), vacas (Fujitani et al. 1997; Guyader-Joly et al. 1998), coelhos (Li et al. 1993) e Hamsters (Bavister & McKiernan, 1993). Ao contrário, Devreker & Hardy (1997) mostraram que a suplementação de meios com 5 mM de taurina não teve nenhum efeito significativo no desenvolvimento embrionário.

Similarmente, Choi et al. (1998) também não acharam nenhum efeito com concentrações variando de 0,01 a 10 mM no desenvolvimento embrionário de ratos tratados com meio de cultura.

Clinicamente, a taurina tem sido usada no tratamento de uma grande variedade de condições, incluindo doenças cardiovasculares, hipercolesterolemia, epilepsia, doenças hepáticas, doença de Alzheimer, alcoolismo e outras desordens degenerativas (Sturman, 1993). Também é adicionada a fórmulas alimentícias de bebês prematuros, assim como suplementada para neonatos mantidos durante muito tempo em nutrição parenteral total, restabelecendo seus níveis normais de taurina (Chesney, 1988).

Da mesma forma, doses de suplementação são consumidas por atletas, por acreditar-se que ela aumenta o desempenho físico, sendo vendido em academias e sites especializados. No entanto, grande parte dos estudos com humanos utiliza preparados líquidos contendo uma combinação de vários aminoácidos (Ratamess et al. 2007; Hoffman et al. 2008), dificultando um possível entendimento da relação entre a suplementação de taurina e o exercício físico (um conhecido fator estressante para o organismo).

A liberação de taurina pelo músculo esquelético durante o exercício também é descrita na literatura, possivelmente para regular a maior osmolaridade da fibra muscular que ocorre pela produção de subprodutos metabólicos (Cuisinier et al. 2002). Essa liberação pode ser desencadeada pelo aumento do estresse oxidativo induzido pelo exercício e pelo aumento da atividade de fosfolipase A<sub>2</sub> (Ortenblad et al. 2003). Considerando alguns estudos que alegam um efeito da taurina na melhora da produção de força muscular (Bakker & Berg, 2002), a perda de taurina pelo músculo esquelético poderia significativamente afetar o desempenho muscular.

A taurina e suas possíveis funções antioxidantes também podem ser úteis em transplante de órgãos, nos quais preservações hipotérmicas de longo prazo são de crucial importância. Órgãos tais como o coração, o fígado e rim são altamente sensíveis ao dano de isquemia/reperfusão, no qual a produção de ERO e a ativação das células imunológicas ocorrem (Schemmer et al. 2005). Oriyanhan et al. (2005) demonstraram que a suplementação de taurina em uma solução cardioplégica<sup>4</sup> diminuiu os danos de isquemia/reperfusão por suprimirem o estresse oxidativo e apoptose, melhorando na recuperação das funções do tecido cardíaco após preservação hipotérmica prolongada.

Além disso, em casos de síndrome compartimental<sup>5</sup> induzidas por isquemia/reperfusão em músculos de patas de coelho, um tratamento com taurina 1g/kg diminuiu a formação de edema muscular em 16% e a liberação de LDH em 36%, assim como a concentração plasmática de MDA e dienos conjugados também diminuiu em 38% e 28% respectivamente. Enquanto no músculo esquelético, foi observada uma diminuição de 22% e 30% desses mesmos aspectos.

Este mesmo grupo avaliou a capacidade antioxidante da taurina, mostrando que em estudos *in vitro* a taurina diminuiu o conteúdo de malondialdeído (MDA) em um modelo experimental de fatias de músculo incubadas com ácido hipocloroso de maneira dose dependente, mas não encontrou nenhuma mudança dos parâmetros de estresse oxidativo quando as fatias foram incubadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou xantina/xantina

---

<sup>4</sup> Soluções cardioplégicas, são as soluções empregadas com finalidade de promover a parada cardíaca controlada do coração. A parada cardíaca induzida por solução cardioplégica pode acontecer por hiperpolarização, despolarização ou com bloqueadores da bomba de cálcio.

<sup>5</sup> Síndrome compartimental é uma complicação que se desenvolve nos músculos quando sua perfusão sanguínea não é adequada. Caracterizada pela parestesia, dor contínua, hipoestesia, edema e enrijecimento da região acometida. Suas principais causas podem ser a constrição de membros por aparelho gessado e/ou curativo, além de um possível aumento de substâncias no compartimento muscular causado por um edema ou hemorragia.

oxidase. Desta forma, concluindo que o tratamento com taurina atenuou o dano induzido por estresse oxidativo, sugerindo que a aplicação clínica de suplementação de taurina pode ser uma nova estratégia para o tratamento e prevenção desta síndrome (Wang et al. 2005).

Na falta de um estudo que avalie se as concentrações fisiológicas de taurina têm realmente um papel como antioxidante contra as ERO/ERN mais relevantes, e dada a controvérsia existente na literatura científica sobre esse assunto, nosso trabalho procurou gerar conhecimento sobre esta linha de pesquisa, testando primeiramente os efeitos *in vitro* da taurina contra estas espécies (CAPITULO 1), para posterior análise destes efeitos em sistemas *ex vivo*, assim como na proteção de organelas - como a mitocôndria (CAPITULO 2). A relevância deste estudo baseia-se no uso da taurina, cada vez mais freqüente, na alimentação e terapêutica de humanos. Desta forma, estudos que evidenciem e esclareçam a verdadeira função deste nutriente são de extrema importância.



## OBJETIVOS

### 1 - Objetivos gerais:

Nosso objetivo é estudar as propriedades antioxidantes e de *scavenger* das concentrações fisiológicas de taurina contra as diversas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio *in vitro* e também verificar se a taurina é capaz de prevenir o dano induzido por estresse oxidativo em fatias de fígado de rato, elucidando seu possível papel controverso como uma molécula antioxidante, assim como propondo uma possível função *in vivo* de proteção mitocondrial e celular.

### 2 - Objetivos específicos:

**I** - Verificar se concentrações fisiológicas de taurina possuem reatividade com peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ );

**II** - Verificar se concentrações fisiológicas de taurina possuem reatividade com doadores de óxido nítrico ( $NO^*$ );

**III** - Verificar se concentrações fisiológicas de taurina possuem reatividade com doadores de ânion superóxido ( $O_2^{*-}$ );

**IV** - Verificar se concentrações fisiológicas de taurina possuem reatividade com doadores de radical peroxil ( $ROO^*$ );

**V** - Verificar se concentrações fisiológicas de taurina possuem reatividade reage com peroxinitrito ( $ONOO^-$ );

**VI** - Verificar se há proteção da taurina em fatias de fígado de rato mediante estresse oxidativo causado por t-BHP;

**VII** – Analisar as propriedades antioxidantes da taurina na mitocôndria.

## **PARTE II**

## **CAPÍTULO 1 – ARTIGO CIENTÍFICO**

### **SCAVENGING AND ANTIOXIDANT POTENTIAL OF PHYSIOLOGICAL TAURINE CONCENTRATIONS AGAINST DIFFERENT REACTIVE OXYGEN/NITROGEN SPECIES**

Oliveira, M.W.S.; Minotto, J.B.; de Oliveira, M.R.; Zanotto-Filho, A.; Behr, G.A.;

Rocha, R.F.; Moreira, J.C.F.; Klamt, F.

Artigo em análise no periódico *Amino acids*

# **SCAVENGING AND ANTIOXIDANT POTENTIAL OF PHYSIOLOGICAL TAURINE CONCENTRATIONS AGAINST DIFFERENT REACTIVE OXYGEN/NITROGEN SPECIES**

Oliveira, M.W.S.; Minotto, J.B.; de Oliveira, M.R.; Zanotto-Filho, A.; Behr, G.A.;  
Rocha, R.F.; Moreira, J.C.F.; Klamt, F\*.

*Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica –  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) / Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul (UFRGS), RS, Brasil.*

\*Corresponding author: Prof. Fábio Klamt, Departamento de Bioquímica,  
ICBS/UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2600 - Anexo, Porto Alegre, RS 90035-003,  
Brazil. Tel.: +55 51 3308-5577; FAX: + 55 51 3308-5535; E-mail address:  
[00025267@ufrgs.br](mailto:00025267@ufrgs.br) (F. Klamt)

## Abstract

Several studies have been already conducted about the antioxidant properties of taurine. However, those studies have used lower concentrations of this  $\beta$ -amino acid than physiological ones. This study investigates the scavenging and antioxidant properties of physiological taurine concentrations against many reactive species. No chemistry between taurine and hydrogen peroxide was found. Instead, taurine exhibited significant scavenging potential against peroxy radical, nitric oxide, and superoxide donors. This study evaluates if taurine is able to minimize the *in vitro* CuZn-Superoxide Dismutase damage induced by peroxynitrite. Taurine prevents the formation of nitrotyrosine adduct as well as the decrease in superoxide dismutase activity caused by peroxynitrite. In addition, taurine prevented the *ex vivo* damage caused by tert-butylhydroperoxide in rat liver slices. This experimental data show that taurine, at physiological concentrations, efficiently scavenges many reactive oxygen and nitrogen species, suggesting that these properties are pivotal for the maintenance of cellular functions.

**Keywords:** *taurine, scavenger, antioxidant, reactive oxygen species, reactive nitrogen species.*

*List of abbreviations*

*SNP: Sodium Nitroprusside;*

*PBS: Phosphate buffer saline;*

*ROO: Peroxyl radical;*

*ONOO: Peroxynitrite;*

*NO: Nitric Oxide;*

*O<sub>2</sub><sup>-</sup>: anion Superoxide;*

*SOD: Superoxide dismutase;*

*NOS: Nitric oxide synthase;*

*ROS: Reactive oxygen species;*

*RNS: Reactive nitrogen species;*

*t-BHP: tert-Butylhydroperoxide;*

*H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Hydrogen peroxide;*

*AAPH: 2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine)dihydrochloride;*

*NBT: Nitro Blue Tetrazolium;*

*MDA: Malondialdehyde;*

*MPO: Myeloperoxidase;*

*DTNB: 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid);*

*TnCl: taurine chloramines;*

*TEMED: N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylene-diamine*

## Introduction

Taurine (2-aminoethanesulfonic acid), a sulfur-containing  $\beta$ -amino acid, is found in all animal cells at millimolar concentrations whereas concentrations in plasma and extracellular fluids are much lower, typically ranging from 10 to 100  $\mu$ M (Schuller-Levis and Park 2003). Although not incorporated into proteins, intracellular concentration of taurine reaches up to 80 mM, depending on the tissue. Taurine levels in heart (25 – 30 mM), brain (30 – 40 mM), and lung (11 – 17mM) are higher than in liver (around 10 mM). However the highest levels of taurine are found in neutrophil, where the cytosolic concentration is 50 mM, and in retina (50 – 70 mM) (Green et al. 1991; Sturman 1993; Massieu et al. 2004).

Several biological functions have been attributed to taurine such as bile acid conjugation, maintenance of calcium homeostasis, osmoregulation and membrane stabilization (Huxtable 1992). Studies have presented that especially high taurine concentrations are found in tissues with high oxidative activity (like retina, nerves, kidney and heart); while lower concentrations are found in tissues with primary glycolytic activity (Hansen et al. 2006). ). Despite the fact that taurine is a very stable molecule and difficult to oxidize, these data suggest that the high concentrations of taurine in these cell types could exert a physiologic scavenging potential against reactive species generated by oxidative metabolism.

Various *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated that taurine has cytoprotective effects. Even though the current mechanism(s) underlying the several protective effects of taurine are not well known, these actions are often attributed to an antioxidant activity (Schaffer et al. 2003; Pasantes-Morales et al. 1985; Gordon et al. 1986; Laidlaw et al. 1989; Milei et al. 1992; Nakamori et al. 1993; Raschke et al. 1995). Taurine is

known to react and detoxify hypochlorous acid (HOCl) generated by activated neutrophils from myeloperoxidase (MPO), hydrogen peroxide and chloride during the oxidative burst (Cunningham et al. 1998). This protective function involves the formation of stable taurine chloramine (TnCl), and it is believed to be the reason for the high levels of taurine (50 mM) found in neutrophils. Moreover, taurine can inhibit the formation of the apaf-1/caspase-9 apoptosome complex, inhibiting the apoptosis mediated by mitochondria (Takatani et al. 2004). In spite of that, it was previously demonstrated that TnCl is a potent inducer of programmed cell death in cancer cells (Klamt and Shacter 2005).

Previous studies which searched for the free radical scavenging potential of taurine have observed minimal direct chemical scavenging actions against many oxygen-derived radicals (Aruoma et al. 1988; Shi et al. 1997). One factor that is often not adequately addressed in the assessment of the antioxidant role of taurine is its aforementioned high intracellular concentrations in certain types of cell. For example, the scavenging potential of taurine against a  $\cdot\text{OH}$ -generating system was previously investigated, and demonstrated to be ineffective, but the highest concentration used in those studies was 10 mM (Tardolini et al. 1995). Thus, it is unknown whether or not the relative low oxidant chemistry of taurine has biological relevance in cells that contain high concentrations of it. The objective of the present study is to examine the *in vitro* properties of physiological taurine concentrations against different oxidants. It also intends to determine whether taurine could protect cells from t-BHP toxicity in rat liver slices, clarifying some possible *in vivo* antioxidant properties of this  $\beta$ -amino acid.



## **Materials and methods**

### **Chemicals reagents and solutions**

Taurine was purchased from FLUKA (USA) and CuZnSOD from bovine erythrocytes was acquired from Roche (USA). 2,2'-Azobis(2-methylpropionamide)dihydrochloride (AAPH) and 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox<sup>®</sup>) were purchased from Aldrich Chemical (Milwaukee, WI, USA). Folin–Ciocalteu reagent was obtained from Merck (Germany). All other reagents were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Taurine solutions were prepared daily in ultra-pure Milli-Q water or in specific buffer. All experiments were carried out using 1, 15, 30 and 60 mM of taurine or  $\beta$ -alanine (used as a  $\beta$ -amino acid control). Trolox<sup>®</sup> 1mM, a synthetic analog of vitamin E, was used as a standard antioxidant. Protein content was measured by Lowry method using bovine serum albumin as standard (Lowry et al. 1951).

### **Animals**

Adult, male Wistar rats were obtained from Central Animal House of our Department. They were caged in group of five with free access to food and water and were maintained on a 12-h light–dark cycle (lights on 7:00 am), at a room temperature of  $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . All experimental procedures were carried out in accordance with the National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals and with the approval of Ethics Committee from Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

## ***In vitro* scavenging potential assays**

### *Hydrogen Peroxide*

To assess the *in vitro* reactivity of taurine against hydrogen peroxide, different taurine concentrations were incubated with 1 mM hydrogen peroxide for one hour. Later, the remaining concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was determined. Hydrogen peroxide was titrated and kept protected from light to avoid early decomposition ( $\Sigma_{240\text{ nm}} = 43.6\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (Claibone 1985).

### *Peroxyl Radical*

The *in vitro* scavenging activity of taurine against peroxy radicals was estimated by the total reactive antioxidant potential (TRAP) as previously described (Lissi et al. 1992; 1995). Briefly, the reaction mixture (3,7 mL) containing AAPH (10 mM) and luminol (4 mM) in 0.1 M glycine buffer (pH 8.6) was incubated at room temperature for 2 h. The thermal decomposition of water-soluble azobis (2-amidinopropane hydrochloride) produces peroxy radicals (ROO•) at a known steady rate. Peroxy radical reacts with luminol yielding chemiluminescence (CL). The addition of 300  $\mu\text{L}$  of different taurine concentrations decreases the CL proportionally to its antioxidant potential. The TRAP profile was obtained by measuring the CL emission in a liquid scintillation counter (Wallac 1409) as counts per minute (CPM). The CL intensity was monitored for 50 min after the addition of taurine. The areas under the curve of the chemiluminescence traces were used to statistically compare the scavenging potential of taurine against ROO• as compared to the control traces. The “induction time” can be associated to the time required to consume the active antioxidants present in the sample.

### *Nitric Oxide*

*In vitro* generation of nitric oxide (NO<sup>•</sup>) was achieved by the decomposition of 20mM sodium nitroprusside (SNP) in PBS buffer (pH 7,4) as described (Kumar et al. 2006) with modifications for a 96-wells microplate. Different concentrations of taurine were incubated with SNP for one hour at 37°C. After, 20μL of Griess reagent was added, and the remained nitrite was spectrophotometrically determined at 540 nm. As nitrite is the only stable final product of the autoxidation of NO<sup>•</sup> in aqueous solution (Miranda et al, 2001; Awad et al., 1993; Ignarro et al. 1993), only nitrite was measured by Griess reaction (Griess 1879). The results were expressed in % of generated nitrite, using sodium nitrite as standard.

### *Superoxide Anion Radical*

Scavenging activity of taurine against superoxide anion was assessed in two different assays. First, it was quantified the inhibition of superoxide-dependent adrenaline auto-oxidation to adrenochrome by different taurine concentrations in a spectrophotometer at 480 nm, as previously described (Misra et al, 1972). The results are expressed in absorbance/time (seconds). The area under the curve of the graph was used for statistical analysis, and compared against the control values. Five units of CuZnSOD (E.C.: 1. 15. 1. 1) were used to give assay specificity. Superoxide scavenger activity was also spectrophotometrically determined by monitoring superoxide-dependent NBT reduction to the blue chromogen formazan at 560 nm in the presence of different taurine concentrations (Silva et al. 2007). After, 0.1 mM NBT and 0.02 units/mL Xanthine Oxidase (XO) (E.C.: 1. 1. 3. 22) were added to a solution of Tris-HCl (50 mM) at pH

7.4, containing 0.012 mM Tween 20 and 1 mM EDTA. This mixture was warmed at 37°C. Then, a 10-fold concentrated taurine solution was added to reach a final volume of 200  $\mu$ L, and NBT reduction was monitored for 1h with a 2-minute interval in a 96-wells microplate reader (Molecular Devices). The rate of superoxide formation was expressed in % superoxide formation.

*In vitro ONOO-mediated CuZnSOD 3-nitrotyrosine formation and decrease in enzyme activity*

Peroxynitrite solutions were prepared from acidified hydrogen peroxide and sodium nitrite as described previously (Saha et al. 1998), and its concentration was determined using the extinction coefficient at 302 nm ( $\Sigma_{302\text{ nm}} = 1670\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Samples consisted of CuZnSOD (2 units) mixed with different taurine concentrations. Nitration was carried out by incubating samples with 100  $\mu$ M of peroxynitrite for 1h, and determined by *Dot-Bot* analysis using anti-nitrotyrosine antibody. Samples were applied to a nitrocellulose membrane. After blocking the membrane with 5% albumin, it was incubated overnight with rabbit anti-nitrotyrosine antibody (1:2000) (BD Biosciences, CA, USA), followed by horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:10000) (DakoCytomation, USA). Dots were visualized by chemiluminescence using ECL kit from NEM (Boston, MA, USA). Densitometric analysis of dots were performed using ImageJ 1.36b software (National Institutes of Health, USA). SOD activity was assessed in 10% native polyacrilamide gel stained with 4-nitroblue tetrazolium (NBT). The bands were revealed through the reduction of NBT (0,2 mg/mL) by superoxide produced by the photochemical reduction of riboflavin (2,8  $\mu$ M) with N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylene-diamine (TEMED, 28 mM), modified from previous studies (Beauchamp et al. 1971). A

calibration curve was obtained by measuring *in gel* activities of different concentrations of CuZnSOD (Fig. 5b).

## **Ex vivo assay**

### *Sample Preparation*

The antioxidant activity of taurine was also evaluated *ex vivo*, using t-BHP (tert-butylhydroperoxide) as an oxidant. Rat liver slices were preincubated with different concentrations of taurine, for 30 min, at 37°C. Those preincubations occurred under a carbogenic mixture (95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>) in a shaking water bath in a medium of oxygen-balanced Krebs-Ringer phosphate buffer (pH 7.4) with 10 mM glucose. After preincubation, t-BHP (1mM) was added. Subsequently, rat liver slices were removed, and homogenized with PBS (pH 7.4), and stored at -80°C until further analysis.

### *Protein Sulphydryl Level*

To analyze oxidative alterations in proteins induced by t-BHP, the remained levels of reduced protein thiol (-SH) in samples were measured. A sample aliquot was diluted in 0.1% SDS and 10 mM 5,5-dithiobis 2 nitrobenzoic acid (DTNB). Ethanol was added to yield the intense yellowish color produced by the reaction between the sulphydryl (-SH) groups and DTNB. After 20 min, sulphydryl levels were spectrophotometrically determined at 412 nm (Ellman 1959). Results are expressed as mol SH/mg protein.

### *Thiobarbituric Acid-Reactive Species (TBARS)*

As an index of lipid peroxidation, a TBARS formation was detected through a hot and acid reaction. This is widely adopted as a method for measuring lipid oxidation, as previously described (Draper et al. 1990). The homogenates of rat liver slices were mixed with 0.6 mL of 10% trichloroacetic acid (TCA) and 0.5 mL of 0.67% thiobarbituric acid, and then heated in boiling water for 25 min. TBARS were spectrophotometrically determined at 532 nm. Results are expressed as nmol MDA equivalents/mg protein.

### *Statistical Analysis*

Results are expressed in means  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M.); *p* values were considered significant when *p* < 0.05. Differences in all experimental groups were analyzed by one-way ANOVA followed by the post hoc Tukey's test.

## **Results**

### **Scavenging potential of taurine against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ROO<sup>•</sup>, NO<sup>•</sup> and O<sub>2</sub><sup>•-</sup>**

In order to address the possible antioxidant role of physiological taurine concentrations, it was decided to investigate the *in vitro* scavenging potential of taurine against different reactive species. In all experiments, trolox<sup>®</sup> (1 mM) – a standard antioxidant – and  $\beta$ -alanine (at the same concentrations of taurine) – a  $\beta$ -amino acid control – were used. Fig. 1 shows that there is no significant reactivity between taurine and 1mM hydrogen peroxide at any concentration tested.  $\beta$ -alanine had no reactivity with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as well (data

not shown). In spite of that, 15, 30 and 60 mM of taurine were able to quench peroxy radical generated by AAPH decomposition, decreasing the peroxy-mediated luminol chemiluminescence (Fig. 2).  $\beta$ -alanine had no detected reactivity against peroxy radical (data not shown). Trolox<sup>®</sup> was used as negative control. Taurine was also able to decrease nitrite formation from the decomposition of nitric oxide, being as effective as trolox<sup>®</sup> (1 mM) for scavenging NO<sup>•</sup> (Fig. 3). Moreover, using two different assays, scavenging activity of taurine against O<sub>2</sub><sup>•-</sup> donors was found in the concentrations of 30 and 60mM (Fig. 4). CuZnSOD was used to give assay specificity (see materials and methods section).

### **Reactivity against peroxynitrite**

Since O<sub>2</sub><sup>•-</sup> and NO<sup>•</sup> are precursors for the endogenous synthesis of ONOO<sup>•</sup> in the cells, and CuZnSOD is a well-known target of peroxynitrite, it was evaluated if taurine was able to prevent CuZnSOD damage by ONOO<sup>•</sup>. It was found that exposure of high taurine concentrations are able to decrease the *in vitro* formation of 3-nitrotyrosine adducts in CuZnSOD enzyme mediated by ONOO<sup>•</sup> (Fig. 5a). In addition, as shown in Fig. 5b, 60 mM of taurine was capable of reversing CuZnSOD inactivation mediated by peroxynitrite as well. Taurine alone had no directly effect over CuZnSOD activity.

### **Taurine *ex vivo* status against t-BHP**

To test if physiological concentrations of taurine could prevent oxidative damage in a mammalian tissue system, rat liver slices were preincubated with taurine, and then exposed to *tert*-butylhydroperoxide (t-BHP). Two oxidative parameters were analyzed; t-BHP-induced lipid peroxidation and protein sulfhydryl oxidation (Fig. 6). All taurine

doses inhibited the t-BHP-induced lipid peroxidation (Fig. 6a). Likewise, all taurine concentrations prevented the decrease in protein sulfhydryl levels induced by t-BHP (Fig. 6b).

## Discussion

Despite the ubiquitous distribution and several reviews discussing the action of taurine in physiological and pathological processes, no consensus on its antioxidant role in mammalian systems has been reached, and the overall function of taurine is still being discussed. Moreover, none of the works have evaluated the effective concentration of taurine physiologically achieved in cells with high oxidative metabolism. The objective of this study was to determine if taurine in physiological concentrations is able to act as an antioxidant or scavenger molecule. The novel findings presented here are that taurine, at physiologic concentrations over 15 mM, acts as a good *in vitro* scavenger of reactive oxygen (named peroxy radical and anion superoxide) and nitrogen (nitric oxide and peroxynitrite) species. The data support the hypothesis of taurine acting as an important intracellular ROS/RNS scavenger and antioxidant.

Hydrogen peroxide is a reactive oxygen specie and a signaling molecule, which can be produced in almost all tissues. It can cross cell membranes and react with iron to form more harmful species such as  $\cdot\text{OH}$  (Halliwell and Gutteridge 2007). In the present experimental model,  $\text{H}_2\text{O}_2$  incubation with different taurine concentrations did not show any reactivity, suggesting a low interaction between these molecules, as seen previously (Arouma et al. 1988). However, those incubations happened at lower concentrations of taurine (up to 1 mM). A more detailed analysis of the data presented here support a higher specific scavenging activity of taurine. The undetected reactivity against  $\text{H}_2\text{O}_2$  and



the abovementioned high concentration of taurine in pro-inflammatory cells (*e.g.*: neutrophils) should allow enough H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> flux for hypochlorous acid (HOCl) synthesis by MPO, during oxidative burst.

In spite of this permissive environment for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, taurine showed efficient reactivity against nitric oxide, being effective from 15 mM to 60 mM. Nitric oxide is physiologically produced by NOS activity in many tissues, and also in mitochondria (Bustamante et al. 2007). NO<sup>•</sup> exerts several effects in biological systems (*e.g.*: regulation of vascular smooth muscle tone; platelets aggregation) (Ignarro 2002), and it can modulate the activity of the mitochondrial electron transport chain by the inhibition of cytochrome c oxidase (Antunes et al. 2007). It also reacts with superoxide anion to generate peroxynitrite or other radicals, damaging the mitochondria. The taurine reaction with this radical may be important *in vivo* to avoid S-nitrosylation modification in enzymes, like glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (G3PDH), and to damage iron-sulphur proteins in mitochondria (Halliwell and Gutteridge 2007). In addition, the mitochondrial electron transport chain is the main site of ROS production since it is where oxygen is reduced to H<sub>2</sub>O. In this path, electrons leak from the chain and reduce partially molecular O<sub>2</sub> yielding superoxide radical. Superoxide is a non-difusing radical with short half-life. Yet, it can cause cellular damage by itself or yield more reactive radicals. Taurine concentrations above 15 mM may prevent superoxide production generated by this system. These data suggest taurine has a vital importance in mitochondrial metabolism. Moreover, taurine did not influence the basal *steady state* generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub><sup>•-</sup> by mitochondrial electron transport chain initiated by succinic acid, but prevented the ROS formation by homocysteine (Chang et al. 2004).

Other system that generates a superoxide flux (XA/XO) was also used here to demonstrate the scavenging ability of taurine. The effectiveness of taurine suggests that

it can act as a redox buffer for superoxide radicals, especially in sites of high production (like mitochondria), as postulated by other authors (Hansen et al. 2006).  $\beta$ -alanine did not exhibit the same pattern, showing effectiveness only at 60 mM (data not shown), but this concentration is unreachable *in vivo* (Kontro 1983). The evidence of taurine reaction against  $\text{NO}\cdot$  and  $\text{O}_2\cdot^-$  led us to hypothesize whether taurine could react with peroxynitrite, the reactive nitrogen specie generated by these two radicals *in vivo*. Peroxynitrite is a potent damage agent of  $-\text{SH}$  groups, lipids and DNA, causing nitration of tyrosine residues and inactivation of proteins (Halliwell and Gutteridge 2007). In this experimental model, purified CuZnSOD was incubated with peroxynitrite, and it was found that taurine concentrations higher than 30 mM avoided the ONOO $^-$ -mediated 3-nitrotyrosine adduct formation, and prevented the decrease in enzyme activity. Both experiments suggest that in tissues with high taurine concentration it could act as a peroxynitrite scavenger, preventing the nitration and inactivation of enzymes.

This is probably a wider effect of taurine against protein damage by reactive nitrogen species, since it was found protection in  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase from rat brain that was inactivated by a  $\text{NO}\cdot$  donor (data not shown). Other study has also demonstrated a protective effect of taurine against peroxynitrite-induced  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase inactivation (Nokak-Toker et al. 2005). Taurine reactivity with  $\text{NO}\cdot$  donor (sodium nitroprusside) has been shown previously (Mehta and Dawson 2001).

This further investigation evaluated the total reactive antioxidant potential against peroxy radical. The free radical generator AAPH is an azo compound that undergoes thermal decomposition to yield a molecular nitrogen and two carbon radicals ( $\text{R}\cdot$ ), which rapidly react with oxygen to give peroxy radicals ( $\text{ROO}\cdot$ ) (Krasowska et al. 2000). It was observed that taurine can maintain its antioxidant potential for the full

time of the assay without losing it. Furthermore, the analysis of the effect of taurine on the kinetics of peroxy radical production by AAPH shows that 60 mM of taurine is able to block it completely (Fig. 2b).  $\beta$ -alanine was again ineffective in the same taurine concentrations tested (data not shown). It was interesting to observe that this *in vitro* system is considered a good assay to replicate the *in vivo* chain reaction caused by this radical, once the major chain propagator of lipid peroxidation is the peroxy radical (Lim et al. 2004; Gardner et al. 1989).

Lipid peroxidation is a free radical chain reaction of polyunsaturated fatty acids initiated by both enzymatic and non-enzymatic processes within cellular membranes (Halliwell and Gutteridge, 2007). Lipoperoxy radicals are efficient in damaging DNA, capable of inducing both strand breaks and base modifications (Lim et al. 2003; 2005). Traditionally, lipid peroxidation is quantified by measuring malondialdehyde (MDA), which is formed by the degradation products of polyunsaturated fatty acids hydroperoxides (Esterbauer et al. 1991). The main source of MDA in biological samples is the peroxidation of polyunsaturated fatty acids with two or more methylene-interrupted double bonds. MDA is able to impair several physiological mechanisms of the human body through its ability to react with molecules such as DNA and proteins (Del Rio et al. 2005). In rat liver slices preincubated with different taurine concentrations, it was assessed if taurine was capable to protect them against lipid peroxidation induced by tertbutylhydroperoxide (t-BHP), since a great ability *in vitro* to scavenge peroxy radical was noted (Fig. 2). This radical is formed *in vivo* by lipoperoxidation of membranes. The  $L^{\cdot}$  (alkyl) radical resulting from lipid oxidation caused mainly by  $ONOO^{\cdot}$  or  $\cdot OH$  reacts with molecular  $O_2$  to yield  $LOO^{\cdot}$ . The present data show that taurine was able to inhibit t-BHP-induced damage to lipids in liver slices in a non concentration-dependent manner. It was also evaluated the levels of sulfhydryl

groups, which are a good indicator of redox balance in cell (Ying 2007; Berndt et al. 2007). It is well established that oxidative stress is known to deplete thiol groups (-SH) from many cellular antioxidants like glutathione and other cysteine-containing molecules. Unaltered sulfhydryl groups are crucial for the catalytic and structural functions of many proteins (Kim et al. 2000). Fig. 6b shows that pretreatment with taurine was efficient in sparing sulfhydryl groups as well as protecting the total sulfhydryl pool from oxidation. Trolox® – a vitamin E analogue - was used as an antioxidant control and reversed the induced oxidative damage in both experiments as well.

Despite the antioxidant role of taurine remains controversial among other researches, the present *in vitro* and *ex vivo* data suggest that taurine could participate in the cellular protection against oxidative stress by protecting from lipid peroxidation and sparing sulfhydryl groups from oxidation. From these *in vitro* studies, it seems plausible that taurine, in its physiological concentrations, could act as an efficient antioxidant buffer against many cellular insults, including oxidative damage. Ongoing studies of this research group are investigating the antioxidant role of taurine in mitochondria, where it can have its most important function.

## Acknowledgments

We thank Michael Andrades for critical discussions and the CNPq, FINEP (IBN – Net), CAPES, PROPESQ/UFRGS and FAPERGS funds.

## Figure Captions

Fig. 1: Scavenging activity of taurine against hydrogen peroxide. Different taurine concentrations were incubated with 1 mM hydrogen peroxide for 1 h and the remaining H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was determined as described in “Materials & Methods” section. Data are mean ± S.E.M performed in triplicate (n=3). \*Means statistically different from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone ( $p < 0.001$ ).

Fig. 2: Scavenging activity of taurine against a peroxy radical donor. Different taurine concentrations were incubated with AAPH and the remaining ROO• was determined as described in “Materials & Methods” section. Results are presented as a) the kinetics of the thermal decomposition of AAPH alone and with co-incubation with taurine, and b) the area under curve from data shown in graph a. Data are mean ± S.E.M performed in triplicate (n=6). \*Means statistically different from peroxy donor alone ( $p < 0.001$ ).

Fig. 3: Scavenging activity of taurine against a nitric oxide donor. Different taurine concentrations were incubated for 1 h with 20 mM sodium nitroprusside (SNP) and the remaining nitrite was determined by Griess reaction as described in “Materials & Methods” section. Data are mean ± S.E.M performed in quintuplicate (n=4). \*Means statistically different from NO• donor alone ( $p < 0.001$ ).

Fig. 4: Scavenging activity of taurine against anion superoxide donors. a) Kinetics of superoxide-dependent adrenaline auto-oxidation to adrenochrome and the effect of different taurine concentrations. b) Area under curve from data shown in graph a. Data are mean  $\pm$  S.E.M = performed in quintuplicate (n=5). \*Means statistically different from adrenaline auto-oxidation alone ( $p < 0.001$ ). c) Effect of different taurine concentrations on superoxide-mediated NBT reduction in xanthine/xanthine oxidase system. Data are mean  $\pm$  S.E.M performed in quadruplicate (n=3). \*Means statistically different from X/XO system alone ( $p < 0.01$ ).

Fig. 5: Scavenging activity of taurine against peroxynitrite. a) Representative dot-blot showing the preventive effect of taurine in the formation of 3-nitrotyrosine groups in CuZnSOD by peroxynitrite. On the right side, densitometric analysis of the data. Data are mean  $\pm$  S.E.M performed in triplicate. (n=3) \*Means statistically different from induced control ( $p < 0.01$ ). b) Calibration curve of SOD (upper figure). Preventive effect of taurine on the decrease in CuZnSOD activity induced by peroxynitrite (lower figure). On the right side, densitometric analysis of the data. Data are mean  $\pm$  S.E.M. (n=5). \*Means statistically different from induced control ( $p < 0.001$ ).

Fig. 6: Taurine is able to prevent oxidative stress mediated by t-BHP in liver slices. a) Quantification of lipid peroxidation assessed by TBARS. b) Total sulfhydryl content. Data are mean  $\pm$  S.E.M performed in quintuplicate (n=3) \*Means statistically different from induced control ( $p < 0.05$ ). #Means statistically different from control ( $p < 0.001$ ).

## References

- Antunes F, Boveris A, Cadenas E (2007) On the biologic role of the reaction of NO with oxidized cytochrome c oxidase. *Antioxid Redox Signal* 9:1569-1579.
- Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J (1988) The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors. *Biochem J* 256:251-5
- Awad HH, Stanbury DM (1993) Autoxidation of NO• in aqueous solution. *Int J Chem Kinet* 25:375-381.
- Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Bioch* 44:276-287.
- Berndt C, Lillig CH, Holmgren A (2007) Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems: implications for diseases in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:H1227-36
- Bustamante J, Czerniczyniec A, Lores-Arnaiz S (2007) Brain nitric oxide synthases and mitochondrial function. *Front Biosci* 12:1034-1040.
- Chang L, Zhao J, Xu J, Jiang W, Tang CS, Qi YF (2004) Effects of taurine and homocysteine on calcium homeostasis and hydrogen peroxide and superoxide anions in rat myocardial mitochondria. *Clinical Experimen Pharmacol Physiol* 31:237-243.
- Claiborne, A (1985) Catalase activity. In: Greenwald, RA (ed) *Handbook of methods for oxygen research*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 283-284.
- Cunningham C, Tipton KF, Dixon HBF (1998) Conversion of taurine into N-chlorotaurine (taurine chloramine) and sulphoacetaldehyde in response to oxidative stress. *Biochem J* 330:939-945.
- Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N (2005) A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 15:316-28
- Draper HH, Hadley M (1990) Malondialdehyde Determination as Index of Lipid Peroxidation. *Meth Enzymol* 186:421-431.
- Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82:70-7.
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11:81-128

Gardner HW (1989) Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Radical Biol Med* 7:65-86.

Gordon RE, Shaked AA, Solano DF (1986) Taurine protects hamster bronchioles from acute NO<sub>2</sub>-induced alterations. A histologic, ultrastructural, and freeze-fracture study. *Am J Pathol* 125:585-600

Green TR, Fellman JH, Eicher AL, Pratt KL (1991) Antioxidant role and subcellular localisation of hypotaurine and taurine in human neutrophils. *Biochim biophys Acta* 1073:91-97.

Griess P (1879) Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky and Benedikt "Ueber einige azoverbindungen". *Chem Ber* 12:426-428.

Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) The chemistry of free radicals and related 'reactive species'. In: Halliwell B, Gutteridge JMC (eds) *Free radicals in biology and medicine*. 4th edn. Oxford press, New York.

Hansen SH, Andersen ML, Birkedal H, Cornett C, Wibrand F (2006) The importance role of taurine in oxidative metabolism. *Adv Exp Med Biol* 583:129-135.

Huxtable R J (1992) Physiological actions of taurine. *Physiol Rev* 72:101-63.

Ignarro LJ (2002) Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. *J Physiol Pharmacol* 53:503-514.

Ignarro LJ, Fukuto JM, Griscavage JM, Rogers NE, Byrns RE (1993) Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: Comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proc Natl Acad Sci* 90:8103-8107.

Kim JR, Yoon HW, Kwon KS, Lee SR, Rhee SG (2000) Identification of proteins containing cysteine residues that are sensitive to oxidation by hydrogen peroxide at neutral pH. *Anal Biochem* 283:214-221.

Klamt F, Shacter E (2005) Taurine chloramine, an oxidant derived from neutrophils, induces apoptosis in human B lymphoma cells through mitochondrial damage. *J Biol Chem* 280:21346-21352.

Kocak-Toker N, Giris M, Tülübas F, Uysal M, Aykac-Toker G (2005) Peroxynitrite induced decrease in Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity is restored by taurine. *World J Gastroenterol* 11:3554-7

Kontro P (1983) beta-Alanine uptake by mouse brain slices. *Neuroscience* 8:153-9

Krasowska A, Rosiak D, Szkapiak K, Lukaszewicz M (2000) Chemiluminescence detection of peroxy radicals and comparison of antioxidant activity of phenolic compounds. *Curr Topics In Bioph* 24:89-95

Kumar RS, Sivakumar T, Sunderam RS, Gupta M, Mazumdar UK, Gomathi P, Rajeshwar Y, Saravanan S, Kumar MS, Murugesh K, Kumar KA (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of Bauhinia



racemosa L. stem bark. *Braz J Med Biol Res* 38:1015-1024

Laidlaw SA, Dietrich MF, Lamtenzan MP, Vargas HI, Block JB, Kopple JD (1989) Antimutagenic effects of taurine in a bacterial assay system. *Cancer Res* 49:6600-4

Lim P, Sadre-Bazzaz K, Shurter J, Sarasin A, Termini J (2003) DNA damage and mutations induced by arachidonic acid peroxidation. *Biochemistry* 42:15036-15044.

Lim P, Wuenschell GE, Holland V, Lee DH, Pfeifer GP, Rodriguez H, Termini J (2004) Peroxyl radical mediated oxidative DNA base damage: implications for lipid peroxidation induced mutagenesis. *Biochemistry* 43:15339-48.

Lissi E, Salim-Hanna M, Pascual C, Del castillo MD (1992) Luminol luminescence induced by 2,2'-azobis(2-amidinopropane) thermolysis. *Free Rad Res Comms* 17:299-311.

Lissi E, Salim-Hanna M, Pascual C, Del Castillo MD (1995) Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radic Biol Med* 18:153-158.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.

Massieu L, Montiel T, Robles G, Quesada O (2004) Brain amino acids during hyponatremia in vivo: clinical observations and experimental studies. *Neurochem Res* 29:73-81.

Mehta TR, Dawson Jr R (2001) Taurine is a weak scavenger of peroxynitrite and does not attenuate sodium nitroprusside toxicity to cell in cultures. *Amino Acids* 20:419-433.

Milei J, Ferreira R, Llesuy S, Forcada P, Covarrubias J, Boveris A (1992) Reduction of reperfusion injury with preoperative rapid intravenous infusion of taurine during myocardial revascularization. *Am Heart J* 123:339-45

Miranda KM, Espey MG, Wink DA (2001) A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric oxide: biology and medicine* 1: 62-71.

Misra HP, Fridovich I (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 10:3170-3175.

Nakamori K, Koyama I, Nakamura T, Nemoto M, Yoshida T, Umeda M, Inoue K (1992) Quantitative evaluation of the effectiveness of taurine in protecting the ocular surface against oxidant. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 41:335-8

Pasantes-Morales H, Cruz C (1985) Taurine and hypotaurine inhibit light-induced lipid

peroxidation and protect rod outer segment structure. *Brain Res* 330:154-7.

Raschke P, Massoudy P, Becker BF (1995) Taurine protects the heart from neutrophil-induced reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 19:461-71

Saha A, Goldstein S, Cabelli D, Czapski G (1998) Determination of optimal conditions for synthesis of peroxynitrite by mixing acidified hydrogen peroxide with nitrite. *Free Radic Biol Med* 24:653-659.

Shaffer S, Azuma J, Takahashi K, Mozaffari M (2003) Why is taurine cytoprotective? *Adv Exp Med Biol* 526: 307-321.

Shi X, Flynn DC, Porter DW, Leonard SS, Vallyathan V, Castranova V (1997) Efficacy of taurine based compounds as hydroxyl radical scavengers in silica induced peroxidation. *Ann Clin Lab Sci.* 27:365-74

Shuller-Levis GB, Park E (2003) Taurine: new implications for an old amino acid. *FEMS Microbiol Lett* 226:195-202.

Silva EG, Behr GA, Zanotto-Filho A, Lorenzi R, Pasquali MAB, Ravazolo LG, Silva FA, Bassani VL, Henriques AT, Reginatto FH, Dal-Pizzol F, Moreira JCF (2007) Antioxidant activities and free radical scavenging potential of *Bauhinia microstachya* (RADDI) Macbr. (Caesalpinaceae) extracts linked to their polyphenol content. *Biological Pharmaceutical Bulletin* 30:25-30.

Sturman JA (1993) Taurine in development. *Physiol Rev* 73:119-147.

Tadolini B, Pintus G, Pinna GG, Bennardini F, Franconi F (1995) Effects of taurine and hypotaurine on lipid peroxidation. *Biochem Biophys Res Commun* 232:820-826.

Takatani T, Takahashi K, Uozumi Y, Matsuda T, Schaffer SW, Azuma J (2004) Taurine inhibits apoptosis by preventing the formation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C949-953.

Ying J, Clavreul N, Sethuraman M, Adachi T, Cohen RA (2007) Thiol oxidation in signaling and response to stress: detection and quantification of physiological and pathophysiological thiol

Figure 1

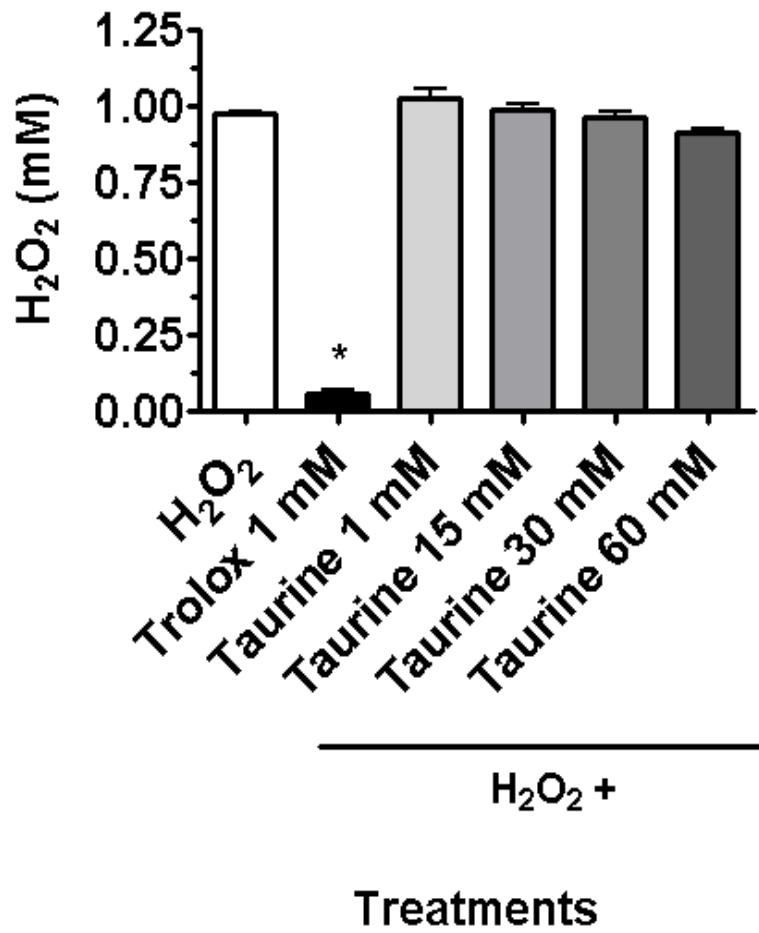


Figure 2

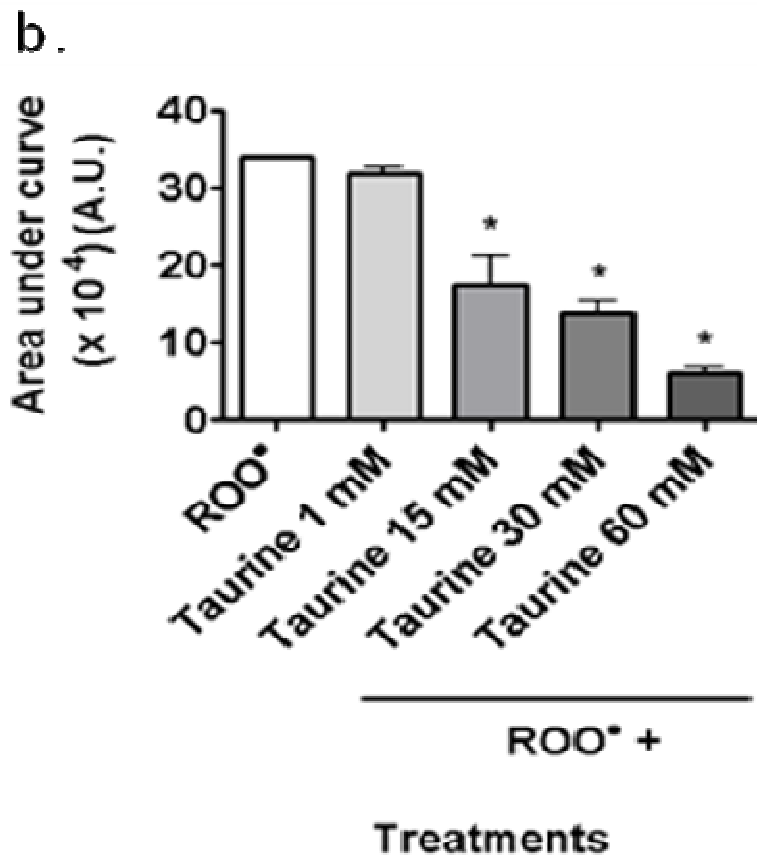
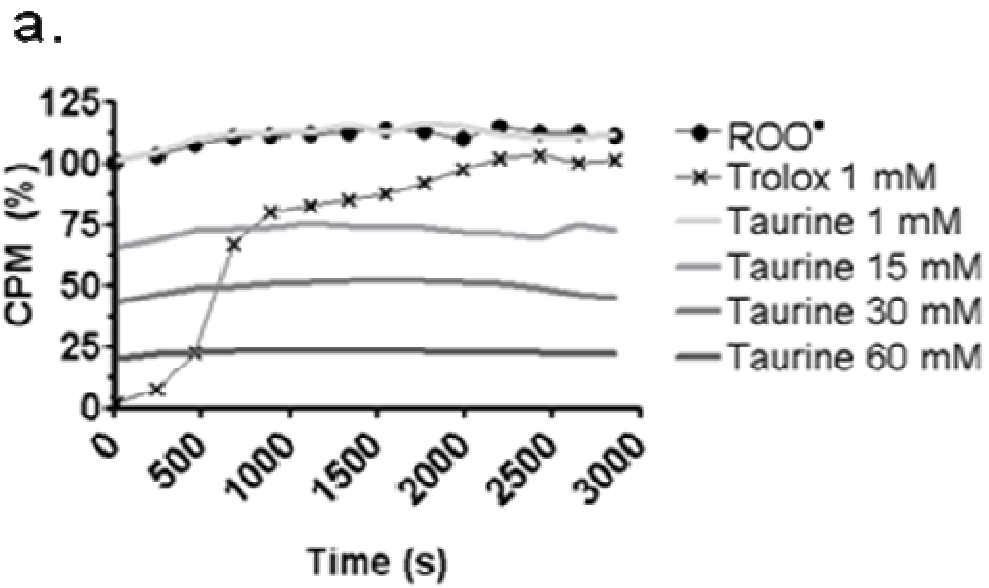


Figure 3

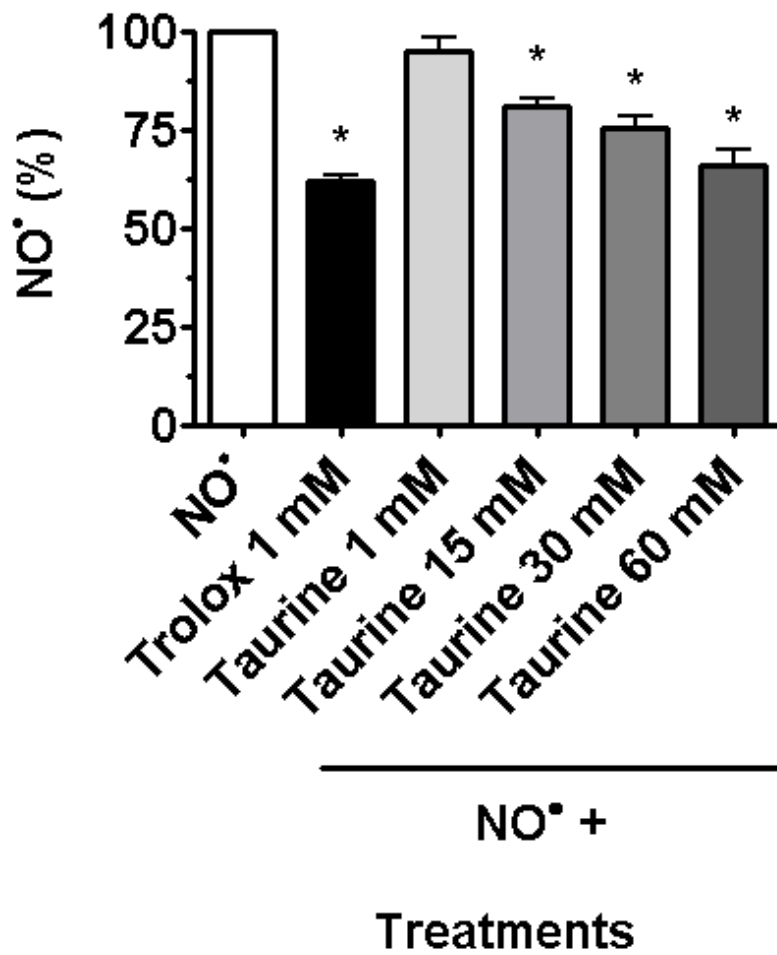
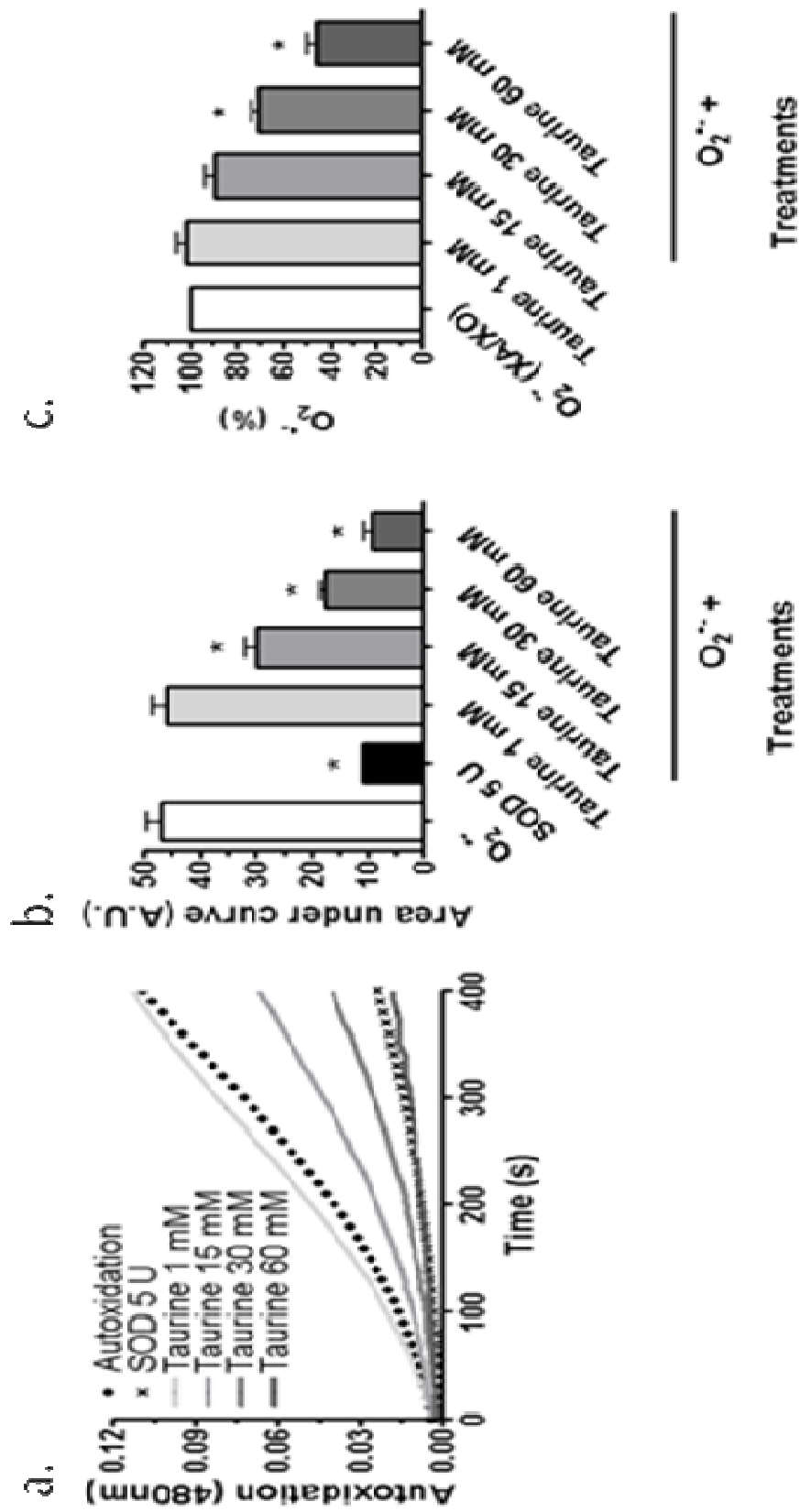


Figure 4



**Figure 5**

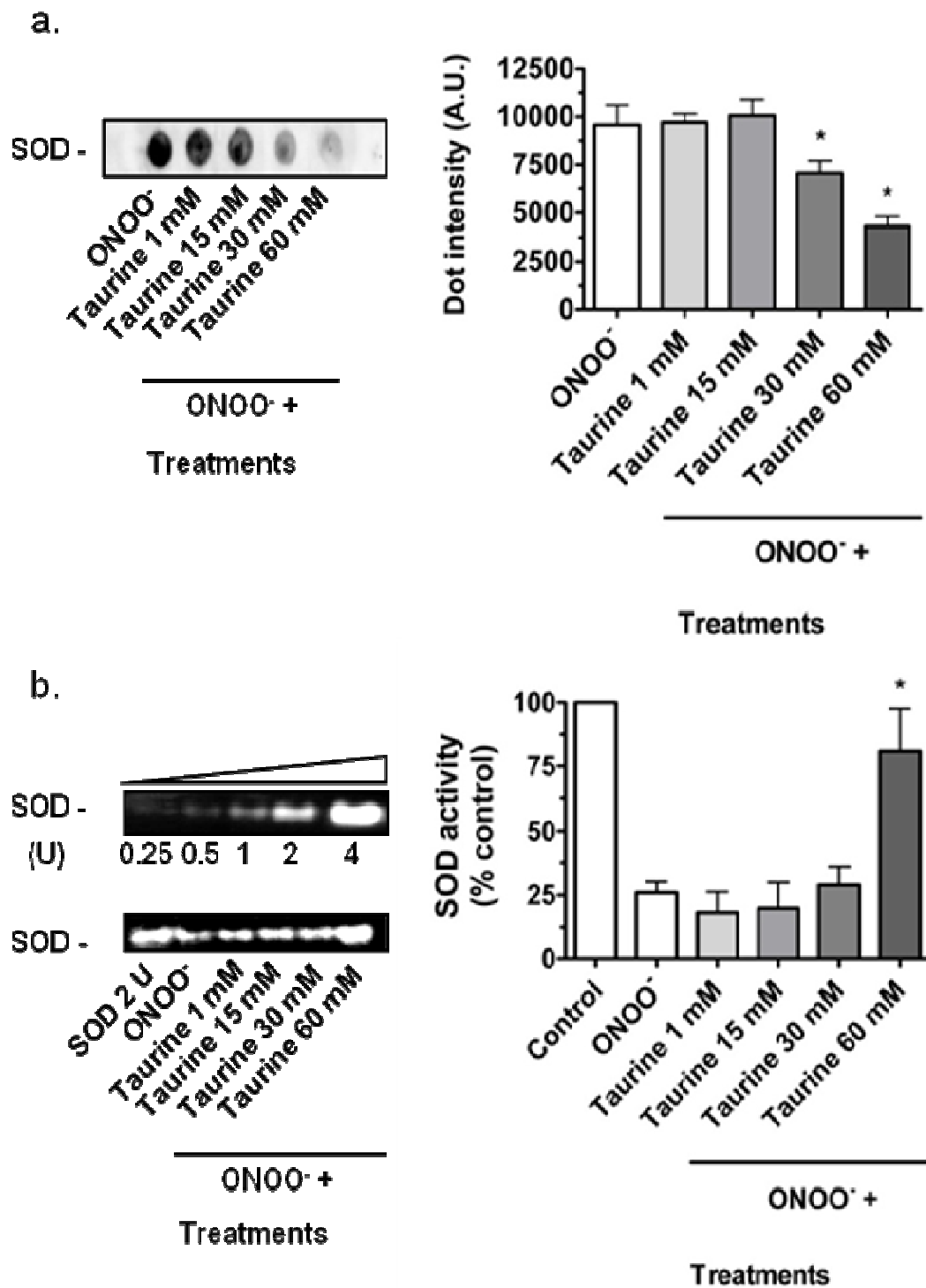
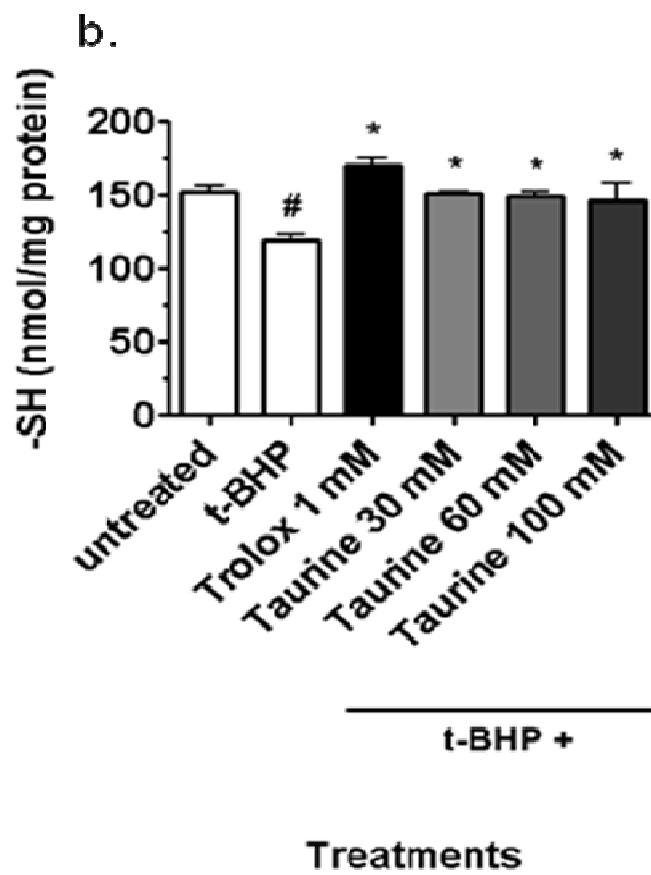
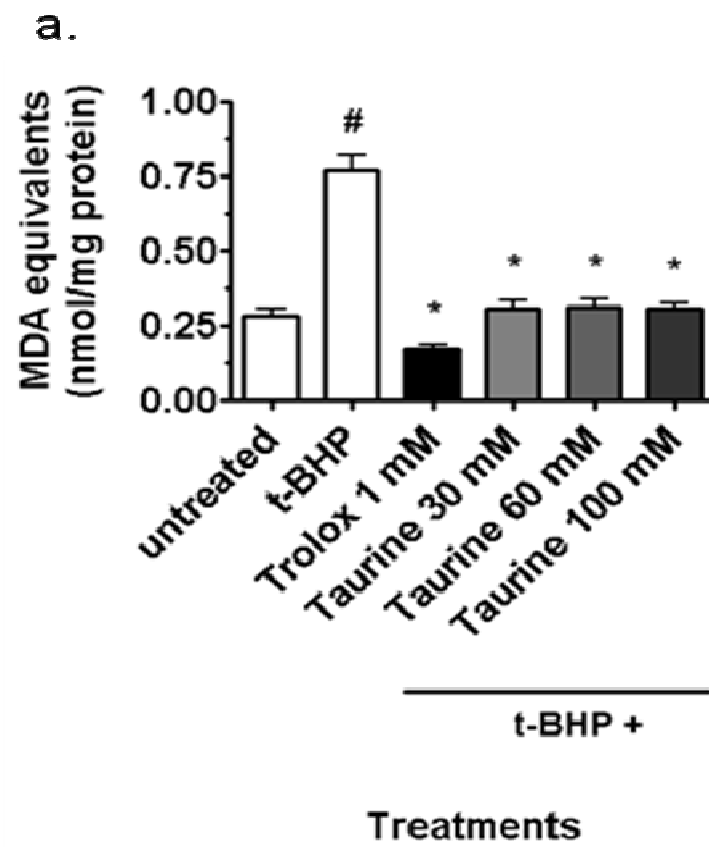


Figure 6





## **CAPÍTULO 2 – RESULTADOS PRELIMINARES**

### **TAURINE AT PHYSIOLOGICAL CONCENTRATIONS ACTS AS AN ANTIOXIDANT BUFFER IN MITOCHONDRIA**

Oliveira, M.W.S.; Minotto, J.B.; de Oliveira, M.R.; Zanotto-Filho, A.; Behr, G.A.; Rocha, R.F.; Moreira,  
J.C.F.; Klamt, F.

Os resultados apresentados neste capítulo foram obtidos durante o mestrado e serão concluídos com a realização de mais experimentos para a elaboração do artigo final, ao qual serão acrescentados o resumo, a introdução, os resultados finais, a discussão e as referências bibliográficas.

## TAURINE AT PHYSIOLOGICAL CONCENTRATIONS ACTS AS AN ANTIOXIDANT BUFFER IN MITOCHONDRIA

### **Objectives**

The aim of the present study was to investigate the possible *in vivo* antioxidant properties of physiological taurine concentrations in mitochondria.

### **Materials and methods**

*Mitochondria isolation:* Mitochondria from fresh rat liver were isolated as described by Narita. Briefly, liver of Wistar rats suspended in ice-cold isolation buffer A (220 mM mannitol, 70 mM sucrose, 5 mM HEPES (pH 7.4), 5 mM EGTA, and 0.5 mg/mL fatty-acid free albumin) was gently homogenized with a glass-homogenizer and centrifuged at 2000g for 10 min at 0°C. Approximately three-quarter of the supernatant was further centrifuged at 10000g for 10 min at 0°C in a new tube. The fluffy layer of the pellet was removed by gently shaking with buffer A and the firmly packed sediment was resuspended in the same buffer without BSA and centrifuged at 10000g for 10 min at 0°C. Mitochondria pellet was resuspended in 500µL. An aliquot of 200µg was divided into groups and treated with different taurine concentrations. Subsequently, the groups were induced by 1mM peroxynitrite. Mitochondria protein was determined by the Bradford method using bovine serum albumin as standard.

*TRAP assay:* The scavenging activity of isolated mitochondria was estimated by the total reactive antioxidant potential (TRAP) as previously described (Lissi et al. 1992; 1995). Briefly, the reaction mixture (3,8 mL) containing AAPH (10 mM) and luminol (4 mM) in 0.1 M glycine buffer (pH 8.6) was incubated at room temperature for 2 h. The addition of 200 µg of isolated mitochondria from different tissues decreases the CL proportionally to its antioxidant potential.

*ONOO<sup>-</sup>-mediated MnSOD 3-nitrotyrosine formation and decrease in enzyme activity:* Peroxynitrite solutions were prepared from acidified hydrogen peroxide and sodium nitrite as described previously (Saha et al. 1998) and the concentration was determined using the extinction coefficient at 302 nm ( $\epsilon_{302 \text{ nm}} = 1670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Sample consisted of isolated mitochondria from liver, brain and heart. Nitration was carried out by incubating samples with 1 mM of peroxynitrite for 1h and determined by Dot-Bot analysis using anti-nitrotyrosine antibody. Samples were applied to nitrocellulose membrane. After blocking with 5% albumin, membranes were incubated overnight with rabbit anti-nitrotyrosine antibody (1:2000) (BD Biosciences, CA, USA), followed by horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:10000) (DakoCytomation, USA). Dots were visualized by chemiluminescence using ECL kit from NEM (Boston, MA, USA). Densitometric analysis of dots were performed using ImageJ 1.36b (National Institutes of Health, USA) software. SOD activity was assessed in native 10% polyacrilamide gel stained with 4-nitroblue tetrazolium (NBT). The bands were revealed through the reduction of NBT (0,2 mg/mL) by superoxide produced by the photochemical reduction of riboflavin (2,8 µM) with N,N,N',N'- Tetramethyl-ethylene-diamine (TEMED, 28 mM), modified from (Beauchamp et al. 1971).

## Discussion

Previous results of our research group demonstrated the *in vitro* scavenger/antioxidant potential of physiological taurine concentrations against different reactive oxygen/nitrogen species. The great ability of taurine to react with these species suggested a protective function of taurine *in vivo*, acting as a buffer for these different reactive oxygen/nitrogen species mainly in mitochondria, where the most part of these reactive species are generated.

Our further investigation was to elucidate if taurine could protect isolated mitochondria of liver, brain and heart from these reactive species. The evidence of the *in vitro* taurine reaction against  $\text{NO}^\bullet$  and  $\text{O}_2^{\bullet-}$  led us to hypothesize whether taurine could react with peroxynitrite, the reactive nitrogen specie generated by this two radicals *in vivo*. Peroxynitrite is potent agent of damage of  $-\text{SH}$  groups, lipids and DNA, causing nitration of tyrosine residues and inactivation of proteins. In our experimental model, isolated mitochondria was incubated with peroxynitrite, and we found that taurine is able to avoid the  $\text{ONOO}^-$ -mediated 3-nitrotyrosine adduct formation (figure 1a) and prevent the decrease in enzyme activity (figure 1b). Both experiments suggest that, in mitochondria, taurine could act as a peroxynitrite scavenger, preventing the nitration and inactivation of enzymes.

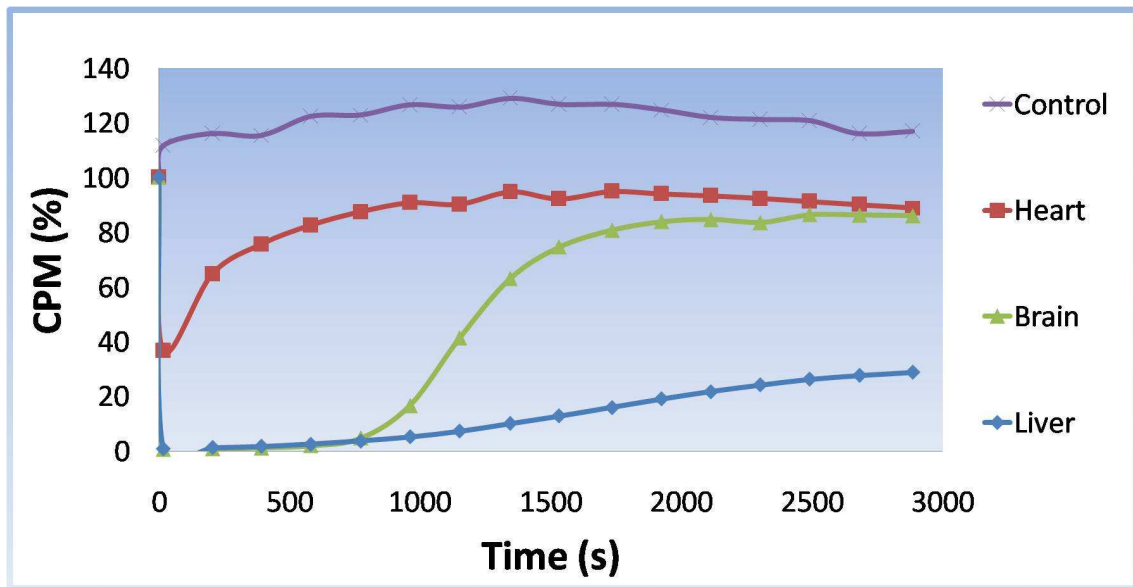
The protective role of taurine in mitochondria could indicate its probable function in the maintenance of homeostasis against reactive species, acting as a protecting buffer for oxidative damage in mitochondria.

## **Legend**

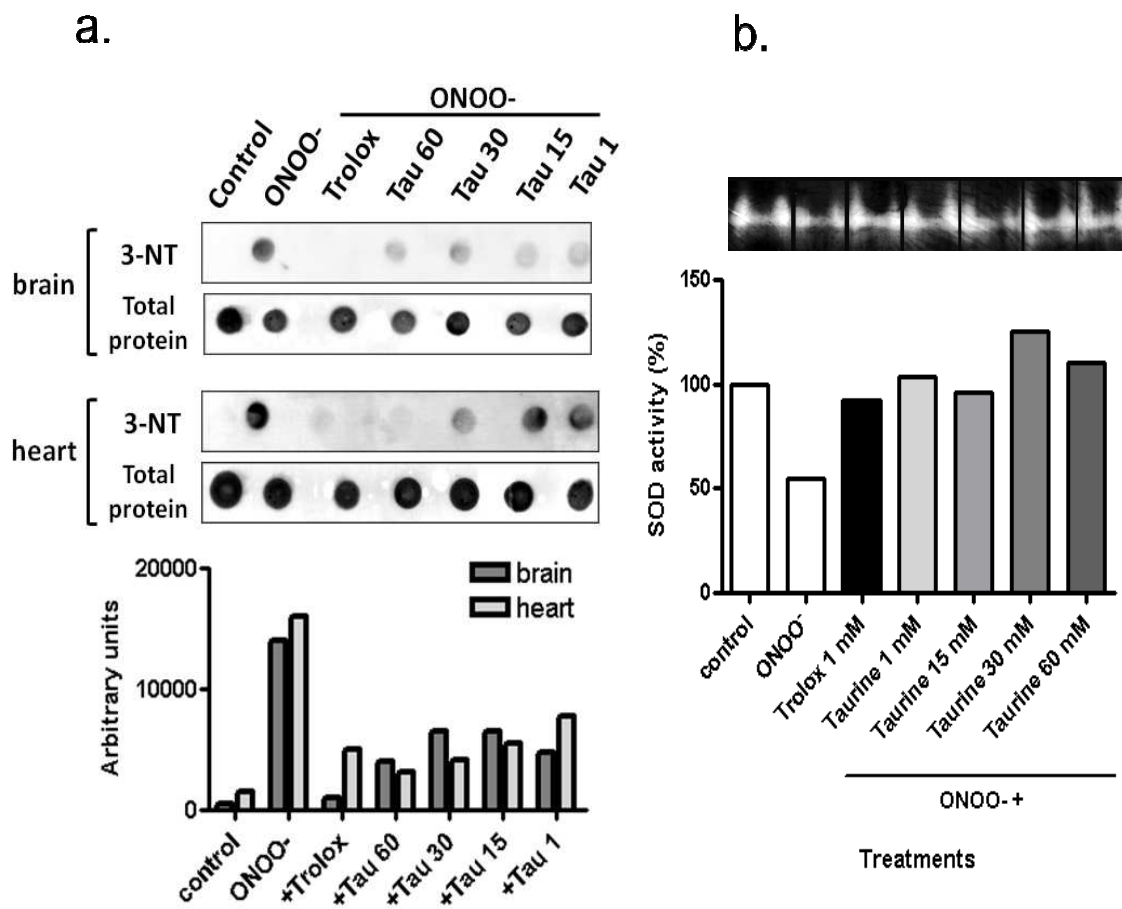
**Figure 1.** TRAP assay of isolated mitochondria from liver, brain and heart. This data was used as a classification of the different antioxidant profile of isolated mitochondria for further padronization of peroxynitrite induced damage.

**Figure 2.** Scavenging activity of taurine against peroxynitrite. **a)** Representative dot-blot showing the preventive effect of taurine in the formation of 3-nitrotyrosine groups mediated by peroxynitrite in brain and heart isolated mitochondria. **b)** Taurine protection against MnSOD nitration and inactivation

**Figure 1**



**Figure 2**



### **PARTE III**



## DISCUSSÃO

O papel antioxidante da taurina ainda é muito controverso na literatura, no entanto, as concentrações utilizadas na maioria dos estudos não alcançam as altas concentrações fisiológicas encontradas nos mamíferos (10 – 80 mM). Por esta razão, pouca ou nenhuma reatividade contra espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio tinham sido evidenciadas para este  $\beta$ -aminoácido até o presente momento.

Com o objetivo de elucidar o papel antioxidante e de *scavenger* da taurina contra estas espécies reativas de oxigênio -  $O_2^{\bullet}$ ,  $H_2O_2$  e  $ROO^{\bullet}$  - e de nitrogênio -  $NO^{\bullet}$  e  $ONOO^-$  - como também evidenciar se o pré-tratamento com taurina é capaz de proteger tecidos *ex vivo*, em um modelo experimental de fatias de fígado de rato - diferentes concentrações fisiológicas de taurina foram utilizadas nesse estudo (1, 15, 30, 60 mM), assim como dose de suplementação (100 mM).

Nosso trabalho demonstra que as concentrações de taurina a partir de 15 mM (quantidade facilmente encontrada nos diversos tecidos de mamíferos) possuem uma ação antioxidante e de *scavenger in vitro* contra a maioria das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio aqui estudadas. Esta atividade antioxidante parece ser específica para a molécula da taurina, já que os mesmo efeitos não foram observados para a  $\beta$ -alanina (dados não demonstrados).

De fato, não foi encontrada reatividade somente contra o  $H_2O_2$ , corroborando com os dados obtidos por Wang et al. (1995); porém, a não reatividade destes dois compostos representa uma maior eficiência na produção de ácido hipocloroso em células pró-inflamatórias, que contêm grande concentração de taurina

(como os neutrófilos<sup>6</sup>), pois essas células necessitam do fluxo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para produzir ácido hipocloroso pela enzima mieloperoxidase, sendo um importante mecanismo de defesa do nosso sistema imunológico.

Contudo, Cozzi et al (1995) verificaram a habilidade de proteção da taurina contra o dano induzido por mitomicina-C<sup>7</sup> e peróxido de hidrogênio em células de ovário de Hamsters chineses cultivadas *in vitro*, propondo que a taurina possivelmente reage com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nessas condições experimentais.

Segundo Galijasevic et al. (2003) o sistema MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> modula a produção de NO<sup>•</sup> pela enzima iNOS. Desta forma, a enzima mieloperoxidase estimula a atividade catalítica da iNOS prevenindo o feedback de inibição causado pelo NO<sup>•</sup>. Essa molécula – uma espécie reativa de nitrogênio – possui importante função sinalizadora, de regulação da musculatura lisa e inibição da agregação plaquetária, assim como compete com o oxigênio pela enzima citocromo c oxidase na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial.

Embora seja evidenciado que o NO<sup>•</sup> potencialmente exerça efeitos tóxicos, a maioria desses efeitos são mais prováveis de serem mediados pelos seus produtos de oxidação do que pela molécula de NO<sup>•</sup> em si. Portanto, NO<sup>•</sup> não ataca diretamente o DNA, como era inicialmente acreditado, mas ao contrário, esse efeito depende de sua conversão em espécies de nitrogênio com maior poder de oxidação (Wink et al. 1991).

O NO<sup>•</sup> afeta o transporte de neurotransmissores em diferentes áreas cerebrais, como por exemplo, evocando a liberação de acetilcolina, monoaminas, ácido

---

<sup>6</sup> A taurina está presente em grandes concentrações nos neutrófilos (~50 mM) porque ela reage com o forte oxidante ácido hipocloroso formando taurina-cloramina, matando as células preferencialmente por apoptose e conseqüentemente diminuindo sua toxicidade para o ambiente celular.

<sup>7</sup> A mitomicina-C é um agente alquilante e potente inibidor da proliferação de fibroblastos.

$\gamma$ -aminobutírico (GABA) e glutamato (Prast & Philippu, 2001). Por outro lado, efeitos inibitórios foram observados para a dopamina (Guevara-Guzman et al. 1994), GABA (Getting et al., 1996) e na liberação de glutamato (Kamisaki et al. 1995), novamente um sinal dos complexos mecanismos mediados por  $\text{NO}^\bullet$ .

Saransaari & Oja (2007) mostraram que o  $\text{NO}^\bullet$  está envolvido na liberação de taurina em células-tronco de cérebro de rato em condições normais e isquêmicas. A liberação substancial de taurina no desenvolvimento das células-tronco cerebrais provocadas por doadores de  $\text{NO}^\bullet$  pode representar um sinal dos importantes mecanismos contra a excitotoxicidade que protege as células-tronco cerebrais de condições de dano celular.

Como demonstrado em nosso trabalho, concentrações de taurina a partir de 15 mM conseguem ser eficientes *scavenger* de óxido nítrico, possivelmente modulando diversos processos celulares ligados a esta molécula. Além disso, as relações encontradas nesse estudo servem de base para explicar por que as concentrações extracelulares de taurina são tão baixas (10-100  $\mu\text{M}$ ), diferentemente das concentrações intracelulares já mencionadas anteriormente, uma vez que a reação da taurina com o  $\text{NO}^\bullet$  na corrente sanguínea poderia interferir na importante função dessa molécula como vasodilatadora da musculatura lisa.

O principal local de formação de ERO é a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. Na rota de redução do oxigênio molecular a água, alguns elétrons vazam deste caminho e reduzem o oxigênio molecular, dando origem ao radical superóxido, que pode, por si só, danificar moléculas ou formar espécies mais reativas. Superóxido existe naturalmente como um pequeno ânion ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) que tem maior probabilidade de entregar seus elétrons do que aceitar um segundo elétron de outra molécula biológica. Portanto, seu potencial redutor fica em torno de -0.1V em concentrações fisiológicas de

oxigênio. Superóxido é um oxidante forte quando acoplado com proteínas, oxidando diretamente grupamentos químicos carregados positivamente, tais como os centros de ferro/enxofre. A destruição dos centros de ferro/enxofre na mitocôndria tem sido bem descritas em ratos *knockout* para SOD (Li et al. 2005; Morten et al. 2006). Aconitase é outra proteína ferro/enxofre que é particularmente suscetível à inativação por superóxido (Hausladen & Fridovich, 2004).

Dois estudos experimentais foram utilizados para a verificação da reatividade da taurina contra o radical  $O_2^{\bullet-}$ . No primeiro sistema, a geração *in vitro* de  $O_2^{\bullet-}$  era feita através do sistema xantina/xantina oxidase, sendo que a taurina exibiu reatividade em concentrações a partir de 30 mM. No segundo sistema, a geração *in vitro* de  $O_2^{\bullet-}$  era feita através da auto-oxidação da adrenalina a adenocromo. Mais uma vez, agora em concentrações acima de 15 mM, houve reação da taurina com o  $O_2^{\bullet-}$ . Esses resultados indicam uma grande importância da taurina na fisiologia mitocondrial, onde o  $O_2^{\bullet-}$  é principalmente formado, possivelmente atuando como um tampão antioxidante contra este radical.

Dando suporte a estes resultados, Parvez et al. (2007) mostraram que mitocôndrias hepáticas isoladas de ratos pré-tratados com 100 mg/kg de taurina por 10 dias foram capazes de diminuir a produção de  $O_2^{\bullet-}$  induzida por tamoxifeno<sup>8</sup> – um composto que aumenta significativamente a geração de  $O_2^{\bullet-}$  *in vivo*, agindo como um desacoplador e inibidor da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. Só o tratamento com taurina não afetou a produção de  $O_2^{\bullet-}$ .

---

<sup>8</sup> Tamoxifeno é um modulador seletivo do receptor de estrógeno oral que é utilizado no tratamento do câncer de mama e é atualmente o mais vendido para este tipo de câncer. Ele é utilizado para o tratamento de câncer de mama em estágios iniciais ou avançados em mulheres pré ou pós-menopáusicas. Também é aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para a redução da incidência de câncer de mama em mulheres com alto risco de desenvolvimento da doença.

A eficiente reação da taurina contra o  $\text{NO}^\bullet$  e o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  nos fez questionar se a taurina não seria *scavenger* de  $\text{ONOO}^-$ , um agente oxidante que pode causar nitração e inativação de diversas proteínas, formado *in vivo* pela reação desses dois compostos. Fluxos simultâneos de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e  $\text{NO}^\bullet$  são capazes de inativar ambas MnSOD e CuZnSOD recombinantes de humanos (Demicheli et al. 2007). Portanto, para verificar este fato, a enzima CuZnSOD foi utilizada e sua atividade quantificada por gel após pré-incubação da enzima com taurina e posterior indução à nitração por  $\text{ONOO}^-$ . No nosso trabalho, taurina 60 mM foi a única concentração capaz de impedir a nitração e conseqüente inativação da enzima neste modelo experimental, restaurando a atividade da enzima a níveis de controle.

Na maioria dos estudos sobre o tema, a nitração de tirosina tem sido associada a uma significativa perda de função da proteína nitrada. Um importante exemplo da perda da atividade enzimática é a enzima mitocondrial MnSOD, que foi a primeira proteína nitrada descoberta *in vivo*. A nitração de um único resíduo de tirosina (Tyr-34) leva à completa inativação da enzima (MacMillan-Crow & Thompson, 1999), resultando na possível conseqüência de favorecer a geração de  $\text{ONOO}^-$  nesta organela pela dismutação prejudicada do radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . *In vivo*, a nitração de MnSOD já foi detectada em roedores (MacMillan-Crow et al. 2001) e humanos (MacMillan-Crow et al. 1996), em fluido cérebro-espinhal de pacientes com esclerose lateral amiotrófica<sup>9</sup>, assim como na doença de Alzheimer e Parkinson (Aoyama et al. 2000), em corações de humanos com diabetes (Xu et al. 2006) e em camundongos expostos a fumaça de

---

<sup>9</sup> A Esclerose lateral amiotrófica (ELA) (também designada por doença de Lou Gehrig e doença de Charcot) é uma doença neurodegenerativa progressiva e fatal, caracterizada pela degeneração dos neurônios motores - as células do sistema nervoso central que controlam os movimentos voluntários dos músculos.

cigarro (Knight-Lozano et al. 2002), além de estar relacionada com o envelhecimento vascular (Van der Loo et al. 2000).

Finalmente, o  $\text{ONOO}^-$  modifica os resíduos de histidina através de um mecanismo de radical, formando o radical histidinil, um agente envolvido na inativação da CuZnSOD por  $\text{ONOO}^-$  (Yamakura & Ikeda, 2006).

Para verificarmos a especificidade da nitração por  $\text{ONOO}^-$  na inativação da enzima, o aduto 3-nitrotirosina foi quantificado, utilizando um anticorpo para antinitrotirosina específico. Pela técnica de *dot-blot*, nós demonstramos que a taurina em concentrações a partir de 30 mM conseguiu diminuir a nitração da enzima CuZnSOD. Esses dados revelam que em concentrações mais altas a taurina pode ser considerada um *scavenger* de  $\text{ONOO}^-$  evitando a nitração e inativação de enzimas e/ou dano a proteínas e grupamentos tióis. Dados não publicados do nosso grupo de pesquisa também demonstraram uma proteção da taurina contra a inativação da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase, mediada por um doador de  $\text{NO}^\bullet$  (nitroprussiato de sódio) em fatias de córtex de rato. Enquanto Nook-Toker et al. (2005) já tinham demonstrado o efeito protetor da taurina contra a inativação desta mesma enzima, mediada por  $\text{ONOO}^-$ .

A peroxidação lipídica é uma reação em cadeia de ácidos graxos poliinsaturados mediada por radicais livres e iniciada por processos ambos enzimáticos e não-enzimáticos nas membranas celulares. Dano ao DNA como resultado da peroxidação lipídica endógena tem sido reconhecido como um fator contribuinte na carcinogênese (Marnett & Plataras, 2001). O principal propagador da reação em cadeia da peroxidação lipídica é o radical peroxil ( $\text{ROO}^\bullet$ ) que tem uma meia-vida relativamente longa (Hildenbrand & Schulte-Frohlinde, 1997).

Nosso estudo também verificou o potencial antioxidante total da taurina através da técnica de TRAP (potencial antioxidante reativo total) que se baseia na

emissão de quimiluminescência emitida pelo composto luminol quando oxidado pelo ROO<sup>•</sup> gerado por uma decomposição termal do tampão glicina com AAPH, assim avaliando a eficiência da taurina como um *scavenger* de ROO<sup>•</sup> (Lissi et al. 1995).

Mais uma vez, concentrações de taurina acima de 15 mM conseguiram apresentar um perfil antioxidante impedindo a oxidação do luminol e diminuindo sua conseqüente quimiluminescência. Sendo que o potencial antioxidante da taurina se manteve no mesmo nível durante todo o período da técnica, o que evidencia uma eficiente reação de eliminação desse radical.

Já a lipoperoxidação lipídica ocorre em resposta ao estresse oxidativo e uma grande diversidade de aldeídos são formados pela quebra dos hidroperóxidos de membrana nos sistemas biológicos. Alguns desses aldeídos são altamente reativos e podem ser considerados como segundo mensageiros tóxicos que disseminam e aumentam eventos de geração de radicais livres (Esterbauer et al. 1991).

Aldeídos são geralmente espécies reativas capazes de formar adutos e complexos danosos nos sistemas biológicos, como o MDA, um dos principais produtos da oxidação dos lipídios (Lykkesfeldt, 2007). A formação de ROO<sup>•</sup> *in vivo* é um dos principais responsáveis pela iniciação e propagação da peroxidação lipídica que normalmente é verificada pela quantificação de um dos seus subprodutos: o MDA.

Visto que nossos estudos demonstraram que a taurina possui alta reatividade *in vitro* contra ROO<sup>•</sup>, um sistema *ex vivo* foi utilizado para elucidar a proteção da taurina a um tecido vivo. Fatias de fígado de rato foram pré-incubadas com taurina e logo após induzidas ao estresse oxidativo com *tert*-butilhidroperóxido (*t*-BHP). Nesse experimento foram utilizadas as concentrações de 30 e 60 mM de taurina, bem como a dose de suplementação de 100 mM, uma vez que concentrações como essas podem ser alcançadas quando um grande aporte exógeno é consumido. Assim, foi avaliada a

peroxidação lipídica pela técnica de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) que consiste na reação de TBA com o MDA, formando um composto colorido que pode ser lido em espectrofotômetro. Surpreendentemente, todas as doses testadas conseguiram proteger as fatias de tecido hepático do estresse oxidativo induzido pelo *t*-BHP, revertendo-as a níveis de controle. Contudo, esta reversão não foi dependente da concentração de taurina, demonstrando que doses acima de 30 mM já são capazes de prevenir o estresse oxidativo nesse sistema e sugerindo que doses mais baixas podem possuir o mesmo efeito protetor.

Um estudo feito com ratos velhos (de 22 meses) mostrou que os altos níveis de MDA e dienos conjugados no coração foram reduzidos após o tratamento de suplementação de taurina, sem modificar os parâmetros antioxidantes do sistema. Portanto, a suplementação de taurina parece ser suficiente para diminuir os níveis de MDA e dienos conjugados no coração de ratos velhos. Além disso, esses resultados indicam que mudanças nos níveis de taurina podem influenciar na suscetibilidade do tecido cardíaco à peroxidação lipídica e que a suplementação de taurina pode ter efeitos protetores para o tecido cardíaco contra o estresse oxidativo (Parildar et al. 2008).

Nestas mesmas fatias de fígado foi avaliado outro padrão de status redox: os grupamentos sulfidris. Os grupos tíois de resíduos de cisteína em proteínas são particularmente suscetíveis a oxidação por ERO/ERN e outras moléculas eletrofílicas. Fora o fato de que dissulfídios tem um importante papel na estrutura protéica, modificações dos resíduos tíois reativos de proteínas podem alterar sua função e estarem envolvidas na modulação da atividade enzimática. Tióis não funcionam somente na sinalização normal via S-nitrosilação (Stamler, 1994), S-glutatiolação (Klatt & Lamas 2000; Adachi et al. 2004) ou S-sulfenação (Salmeen et al. 2003); mas também podem ser irreversivelmente oxidadas pelo envelhecimento ou doenças, interferindo nas



funções protéicas (Ying et al. 2007). O mesmo padrão de reversão do dano ocorreu com a quantificação dos grupamentos sulfidris, diminuindo sua oxidação de uma maneira não dependente da concentração de taurina, protegendo o tecido do estresse oxidativo. Mais uma vez, é sugerido que concentrações menores de taurina pudessem exercer este efeito protetor.

Infelizmente, em nosso modelo experimental, nós não fomos capazes de avaliar a reatividade da taurina com o radical hidroxil, uma vez que testes de padronização prévios revelaram que a taurina interferia na técnica utilizada em nosso laboratório. Outra maneira seria a quantificação desse radical por EPR, que nós não dispomos no momento.

Em todos os experimentos *in vitro*  $\beta$ -alanina foi utilizada como um controle nas mesmas concentrações de taurina, garantindo a especificidade dos efeitos obtidos neste trabalho à taurina. Somente na técnica de reação com o óxido nítrico, a  $\beta$ -alanina demonstrou ser mais eficiente que a taurina, contudo, as concentrações utilizadas para  $\beta$ -alanina não são alcançadas *in vivo* (Kontro,1983).

O resultado desse trabalho é a evidência de que a taurina reage com diversas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, mostrando que concentrações fisiológicas de taurina são capazes de diminuir a produção de moléculas causadoras de dano celular.

## CONCLUSÕES

Até o presente estudo, acreditava-se que a taurina não poderia ser um *scavenger* direto de ERO/ERN, mas que agia preferencialmente aumentando outras defesas celulares antioxidantes. No presente trabalho, nós demonstramos que a taurina em concentrações fisiológicas é um eficiente *scavenger* de diversas ERO/ERN *in vitro*, sugerindo assim um importante papel *in vivo* deste  $\beta$ -aminoácido como antioxidante na fisiologia celular e principalmente mitocondrial, onde é formada a maioria dessas espécies.

## PERSPECTIVAS

Todos esses resultados, quando avaliados em conjunto, evidenciam uma grande capacidade da taurina de agir como um tampão contra todas estas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, claramente protegendo o ambiente celular do estresse provocado por estas moléculas. Possivelmente, algumas organelas se beneficiam dessa proteção contra essas espécies, como a mitocôndria. Estudos com taurina radioativa mostraram que a taurina adicionada ao meio de cultura é captada preferencialmente pela mitocôndria (Klamt & Shacter 2005), sugerindo que grande parte da concentração intracelular de taurina esteja dentro da mitocôndria, protegendo-a do estresse oxidativo causado principalmente pela respiração celular. Até o presente momento, também não há estudos sobre a quantidade de taurina na mitocôndria.

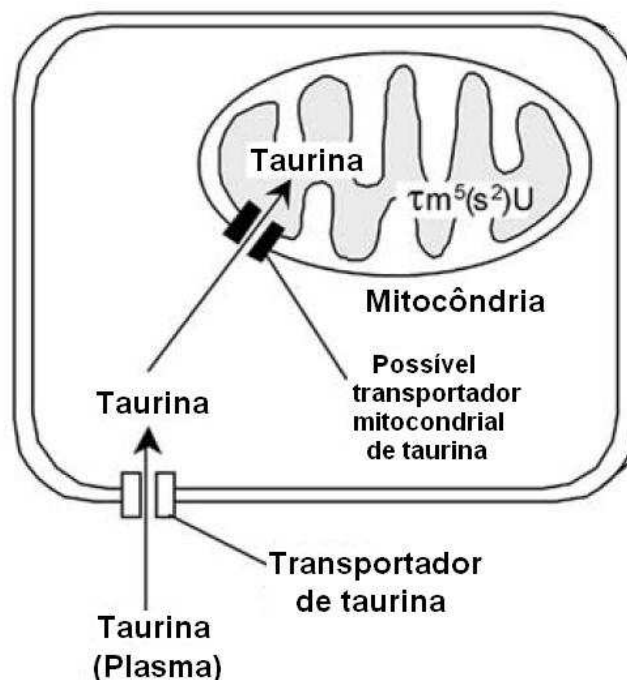


Figura 3: Figura ilustrativa de um possível transportador mitocondrial de taurina

As perspectivas deste estudo abrangem quantificar a concentração de taurina na fração mitocondrial por HPLC, assim como identificar e caracterizar o possível transportador mitocondrial de taurina e sua dependência iônica. Além disso, testar o pré-tratamento de taurina em mitocôndrias isoladas de diversos tecidos – como coração, rim, músculo esquelético e cérebro - desafiadas com diversos oxidantes, evidenciando o possível papel protetor da taurina a esta organela.

## REFERÊNCIAS

Adachi T, Weisbrod RM, Pimentel DR, Ying J, Sharov VS, Schoneich C, Cohen RA. (2004) S-Glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. *Nat. Med.* 10:1200–1207.

Agostoni C, Carratù B, Boniglia C, Riva E, Sanzini E. (2000) Free amino acid content in standard infant formulas: comparison with human milk. *J Am Coll Nutr.* 19(4):434-8.

Aoyama K, Matsubara K, Fujikawa Y, Nagahiro Y, Shimizu K, Umegae N, Hayase N, Shiono H, Kobayashi S. (2000) Nitration of manganese superoxide dismutase in cerebrospinal fluids is a marker for peroxynitrite-mediated oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol.* 47:524– 527.

Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. (1988) The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors. *Biochem J.* 256(1):251-5.

Bakker AJ, Berg HM. (2001) The effect of taurine on sarcoplasmic reticulum function and contractile properties in skinned skeletal muscle fibers of the rat. *J Physiol.* 538: 185–194.

Bavister BD, McKiernan SH. (1993) Regulation of hamster embryo development in vitro by amino acids. In: Bavister B (ed.), *Preimplantation Embryo Development*. Springer-Verlag, New York, pp. 57.

Birdsall TC. Therapeutic applications of taurine. (1998) *Altern Med Rev.* 3(2):128-36.

Blondin P, Coenen K, Sirard MA. (1997) The impact of reactive oxygen species on sperm fertilizing ability and oocyte maturation. *J Androl.* 18, 454–460.

Broughter JM. (2005) in *Oxygen Radicals and Tissue Injury* (Halliwell, B. ed.) pp. 99-104, published for the Upjohn Co. by Federation of American Societies for Experimental Biology, Bethesda.

Bouckennooghe T, Remacle C, Reusens B. (2006) Is taurine a functional nutrient? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 9(6):728-33.

Boveris A, Navarro A. (2008) Brain mitochondrial dysfunction in aging. *IUBMB Life.* 60(5):308-14.

Chang L, Zhao J, Xu, J, Jiang W, Tang CS, Qi YF. (2004) Effects of taurine and homocysteine on calcium homeostasis and hydrogen peroxide and superoxide anions in rat myocardial mitochondria. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 31(4):237-43.

Chesney RW. (1988) Taurine: is it required for infant nutrition? *J Nutr.* 118 (1):6-10.

Choi YH, Seyha S, Toyoda Y. (1998) Effect of taurine on in vitro fertilization and embryo development of Balb/c mouse strain. *J Reprod Dev.* 44, 29–34.

Cozzi R, Ricordy R, Bartolini F. (1995) Taurine and ellagic acid: two differently-acting natural antioxidants. *Environ Mol Mutagen* 26:248–254.

Cuisinier C, Michotte De Welle J, Verbeeck RK, Poortmans JR, Ward R, Sturbois X, Francaux M. (2002) Role of taurine in osmoregulation during endurance exercise. *Eur J Appl Physiol*. 87: 489–495.

Demicheli V, Quijano C, Alvarez B, Radi R. (2007) Inactivation and nitration of human superoxide dismutase (SOD) by fluxes of nitric oxide and superoxide. *Free Radic Biol Med*. 42(9):1359-68.

Devreker F, Hardy K. (1997) Effects of glutamine and taurine on preimplantation development and cleavage of mouse embryos. *Biol Reprod*. 57, 921–928.

Dumoulin JCM, Evers JLH, Bras M. (1992) Positive effect of taurine on preimplantation development of mouse embryos in vitro. *J Reprod Fertil*. 94, 373–380.

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*. 11(1):81-128.

Fujitani Y, Kasai K, Ohtani S, Nishimura K, Yamada M, Utsumi K. (1997) Effect of oxygen concentration and free radicles on in vitro development of in vitro-produced bovine embryos. *J Anim Sci* 75, 483–489.

Galijasevic S, Saed GM, Diamond MP, Abu-Soud HM. (2003) Myeloperoxidase up-regulates the catalytic activity of inducible nitric oxide synthase by preventing nitric oxide feedback inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(25):14766-71.

Gao L, Laude K, Cai H. (2008) Mitochondrial pathophysiology, reactive oxygen species, and cardiovascular diseases. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 38(1):137-55.

Getting SJ, Segieth J, Ahmad S, Biggs CS, Whitton PS. (1996) Biphasic modulation of GABA release by nitric oxide in the hippocampus of freely moving rats in vivo. *Brain Res* 717: 196–199.

Green JP, Day M, Robinson JD. (1991) Some acidic substances in neoplastic mast cells and in the pineal body. *biochem. pharmacol*. 11:957-960.

Guevara-Guzman R, Emson PC, Kendrick KM. (1994) Modulation of in vivo striatal transmitter release by nitric oxide and cyclic GMP. *J Neurochem*. 62: 807–810.

Guyader-Joly C, Ponchon S, Heyman Y, Menezo Y, Renard JP. (1998) Effect of hypotaurine on development of in vitro derived bovine embryos. *Theriogenology* 49, 201.

Han X, Patters AB, Jones DP, Zelikovic I, Chesney RW. (2006) The taurine transporter: mechanisms of regulation. *Acta Physiol. (Oxf)*. 187(1-2):61-73.



Hausladen A, Fridovich I. (2004) Superoxide and peroxynitrite inactivate aconitases, but nitric oxide does not. *J Biol Chem.* 269:29405–29408.

Haynes V, Elfering S, Traaseth N, Giulivi C. (2004) Mitochondrial nitric-oxide synthase: enzyme expression, characterization, and regulation. *J Bioenerg Biomembr.* 36(4):341-6.

Hildenbrand, K., and Schulte-Frohlinde, D. (1997) Time-resolved EPR studies on the reaction rates of peroxy radicals of poly- (acrylic acid) and of calf thymus DNA with glutathione. Reexamination of a rate constant for DNA, *Int. J. Radiat. Biol.* 71, 377-385.

Hoffman JR, Ratamess NA, Ross R, Shanklin M, Kang J, Faigenbaum AD. (2008) Effect of a Pre-Exercise Energy Supplement on the Acute Hormonal Response to Resistance Exercise.1: *J Strength Cond Res.* Apr 15.

Huxtable RJ. (1992) The physiological actions of taurine. *Physiol. Rev.* 72, 101-163.

Ide T, Kushiro M, Takahashi Y. (2002) mRNA expression of enzymes involved in taurine biosynthesis in rat adipose tissues. *Metabolism.* 51:1191–1197.

Ignarro LJ, Cirino G, Casini A, Napoli C. (1999) Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol.* 34(6):879-86.

Kamisaki Y, Wada K, Nakamoto K, Itoh T. (1995) Nitric oxide inhibition of the depolarization-evoked glutamate release from synaptosomes of rat cerebellum. *Neurosci Lett* 194: 5–8.

Keys SA, Zimmerman, WF. (1999) Antioxidant activity of retinol, glutathione, and taurine in bovine photoreceptor cell membranes. *Exp. Eye. Res.* 68, 693-702.

Kilic F, Bhardwaj R, Caulfeild J, Trevithick JR. (1999) Modelling cortical cataractogenesis 22: is in vitro reduction of damage in model diabetic rat cataract by taurine due to its antioxidant activity? *Exp Eye Res.* 69(3):291-300.

Klamt F, Shacter E. (2005) Taurine chloramine, an oxidant derived from neutrophils, induces apoptosis in human B lymphoma cells through mitochondrial damage. *J Biol Chem.* 280(22), 21346-21352.

Klatt P, Lamas S. (2000) Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem.* 267(16):4928-44.

Knight-Lozano CA, Young CG, Burow DL, Hu ZY, Uyeminami D, Pinkerton KE, Ischiropoulos H, Ballinger SW. (2002) Cigarette smoke exposure and hypercholesterolemia increase mitochondrial damage in cardiovascular tissues. *Circulation.* 105:849–854.

Kontro P. (1983) beta-Alanine uptake by mouse brain slices. *Neuroscience.* 8:153-9.

Kozumbo WJ, Agarwal S, Koren HS. (1992) Breakage and binding of DNA by reaction products of hypochlorous acid with aniline, 1-naphthylamine or 1-naphthol. *Toxicol Appl Pharmacol.* 115, 107-115.

Li J, Foote RH, Simkin M. (1993) Development of rabbit zygotes cultured in protein-free medium with catalase, taurine, or superoxide dismutase. *Biol Reprod* 48, 33–37.

Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH, Wallace DC, Epstein CJ. (2005) Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nature Genet.* 11:376–381.

Lim P, Wuenschell GE, Holland V, Lee DH, Pfeifer GP, Rodriguez H, Termini J. (2004) Peroxyl radical mediated oxidative DNA base damage: implications for lipid peroxidation induced mutagenesis. *Biochemistry.* 43(49):15339-48.

Lissi E, Salim-Hanna M, Pascual C, del Castillo MD. (1995) Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radic Biol Med.* 18(2):153-8.

Lykkesfeldt J. (2007) Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clin Chim Acta.* 1;380(1-2):50-8.

MacMillan-Crow LA, Crow JP, Kerby JD, Beckman JS, Thompson JA. (1996) Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93:11853–11858.

MacMillan-Crow LA, Cruthirds DL, Ahki KM, Sanders PW, Thompson JA. (2001) Mitochondrial tyrosine nitration precedes chronic allograft nephropathy. *Free Radic Biol Med*. 31:1603–1608.

MacMillan-Crow LA, Thompson JA. (1999) Tyrosine modifications and inactivation of active site manganese superoxide dismutase mutant (Y34F) by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys*. 366:82–88.

Mandelker L. (2008) Introduction to oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 38(1):1-30.

Marnett LJ, and Plataras JP. (2001) Endogenous DNA damage and mutation. *Trends Genet*. 17, 214-221.

Mehta TR, Dawson R. Jr. (2001) Taurine is a weak scavenger of peroxynitrite and does not attenuate sodium nitroprusside toxicity to cells in culture. *Amino Acids*. 20(4):419-33.

Morten KJ, Ackrell BA, Melov S. (2006) Mitochondrial reactive oxygen species in mice lacking superoxide dismutase 2: attenuation via antioxidant treatment. *J Biol Chem*. 281:3354–3359.

Nakamura H, Yatsuki J, Ubuka T. (2006) Production of hypotaurine, taurine and sulfate in rats and mice injected with L-cysteinesulfinate. *Amino Acids*. 2006; 31:27–33.

Kocak-Toker N, Giris M, Tülübas F, Uysal M, Aykac-Toker G. (2005) Peroxynitrite induced decrease in Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity is restored by taurine. *World J Gastroenterol*. 11(23):3554-7.

Oriyanhan W, Yamazaki K, Miwa S. (2005) Taurine prevents myocardial ischemia/reperfusion-induced oxidative stress and apoptosis in prolonged hypothermic rat heart preservation. *Heart Vessels*. 20:278–285.

Ortenblad N, Young JF, Oksbjerg N, Nielsen JH, Lambert IH. (2003) Reactive oxygen species are important mediators of taurine release from skeletal muscle cells. *American J Physiol Cell Physiol*. 284: C1362–C1373.

Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*. 87(1):315-424.

Parildar H, Dogru-Abbasoglu S, Mehmetçik G, Ozdemirler G, Koçak-Toker N, Uysal M. (2008) Lipid Peroxidation Potential and Antioxidants in the Heart Tissue of beta-Alanine- or Taurine-Treated Old Rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 54(1):61-5.

Parvez S, Tabassum H, Banerjee BD, Raisuddin S. (2007) Taurine prevents tamoxifen-induced mitochondrial oxidative damage in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 102(4):382-7.

Pasantes-Morales H, Cruz C. (1985) Taurine and hypotaurine inhibit light-induced lipid peroxidation and protect rod outer segment structure. *Brain Res.* 330(1):154-157.

Prast H, Philippu A. (2001) Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol.* 64: 51–68.

Rana SK, Sanders TA. (1986) Taurine concentrations in the diet, plasma, urine and breast milk of vegans compared with omnivores. *Br J Nutr.* 56 (1):17-27.

Ratamess NA, Hoffman JR, Ross R, Shanklin M, Faigenbaum AD, Kang J. (2007) Effects of an amino acid/creatine energy supplement on the acute hormonal response to resistance exercise. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 17(6):608-23.

Reed ML, Illera MJ, Petters RM. (1992) In vitro culture of pig embryos. *Theriogenology* 37, 95–109.

Ridnour LA, Isenberg JS, Espey MG, Thomas DD, Roberts DD, Wink DA. (2005) Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A;* 102(37):13147-52.

Salmeen A, Andersen JN, Myers MP, Meng TC, Hinks JA, Tonks NK, Barford D. (2003) Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate. *Nature* 423:769–773.

Saransaari P, Oja SS. (2007) Nitric oxide is involved in taurine release in the mouse brain stem under normal and ischemic conditions. *Amino Acids*. 34(3):429-36.

Schemmer P, Liang R, Kincius M. (2005) Taurine improves graft survival after experimental liver transplantation. *Liver Transpl*; 11:950–959.

Schneider CD, Oliveira AR. (2004) Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev. Bras. Med. Esporte* 10 (4):308-313.

Schuller-Levis GB, Park E. (2003) Taurine: new implications for an old amino acid. *FEMS Microbiology Letters.*, 226, 195-202.

Stamler JS. (1994) Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 78:931–936.

Sturman, JA. (1993) Taurine in development. *Physiol. Rev.* 73, 119-148.

Tadolini B, Pintus G, Pinna GG, Bennardini F, Franconi F. (1995) Effects of taurine and hypotaurine on lipid peroxidation. *Bioch. Bioph. Res.* 820-826.

Tappaz, ML. (2004) Taurine Biosynthetic Enzymes and Taurine Transporter: Molecular Identification and Regulations. *J. Neurochem.* 29, 83-96.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39(1):44-84.

Van der Loo B, Labugger R, Skepper JN, Bachschmid M, Kilo J, Powell JM, Palacios-Callender M, Erusalimsky JD, Quaschnig T, Malinski T, Gygi D, Ullrich V, Luscher TF. (2000) Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *J Exp Med.* 192:1731–1744.

Voss JW, Pedersen SF, Christensen ST, Lambert IH. (2004) Regulation of the expression and subcellular localization of the taurine transporter TauT in mouse NIH3T3 fibroblasts. *Eur J Biochem.* 271(23-24):4646-58.

Wang JX, Li Y, Zhang LK, Zhao J, Pang YZ, Tang CS, Zhang J. (2005) Taurine inhibits ischemia/reperfusion-induced compartment syndrome in rabbits. *Acta Pharmacol Sin.* 26(7):821-7.

Wink D, Kasprzak K, Maragos C, Elespuru R, Misra M, Dunams T, Cebula T, Koch W, Andrews A, Allen J, Keefer L. (1991) DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science.* 254:1001–1003.



Xu S, Ying J, Jiang B, Guo W, Adachi T, Sharov V, Lazar H, Menzoian J, Knyushko TV, Bigelow D, Schoneich C, Cohen RA. (2006) Detection of sequence-specific tyrosine nitration of manganese SOD and SERCA in cardiovascular disease and aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 290:H2220–H2227.

Yamakura F, Ikeda K. (2006) Modification of tryptophan and tryptophan residues in proteins by reactive nitrogen species. *Nitric Oxide.* 14:152–161.

Ying J, Clavreul N, Sethuraman M, Adachi T, Cohen RA. (2007) Thiol oxidation in signaling and response to stress: detection and quantification of physiological and pathophysiological thiol modifications. *Free Radic Biol Med.* 43(8):1099-108.

Zhang XN, Qi M (2008) Mitochondrion and its related disorders: making a comeback. *J Zhejiang Univ Sci B.* 9(2):90-2

## ANEXOS

Resumo apresentado na forma de pôster na XXXVII Annual Meeting of SBBq; XI Congress of the PABMB, Águas de Lindóia, Brasil, de 17 a 20 de maio de 2008.

### TAURINE AT PHYSIOLOGICAL CONCENTRATIONS ACTS AS AN ANTIOXIDANT BUFFER IN MITOCHONDRIA

Oliveira, M.W.S<sup>1</sup>; Minotto, J. B<sup>1</sup>; de Oliveira, M.R<sup>1</sup>; Zanotto-Filho, A<sup>1</sup>; Behr, G.A<sup>1</sup>; Hansel, G<sup>2</sup>;  
Böhmer, A. E<sup>2</sup>; Souza, D.O<sup>2</sup>; Moreira, J.C.F<sup>1</sup>; Klamt, F<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica - ICBS/Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), RS, Brazil.

<sup>2</sup>Laboratório 26, Departamento de Bioquímica - ICBS/Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), RS, Brazil.

The antioxidant properties of taurine, a sulfur-containing amino acid found in millimolar range in mammalian tissues, are still controversial. Even though the distribution of taurine in different subcellular compartment is unknown, many reports suggest a protective role of taurine in the oxidative metabolism of mitochondria. We have shown that taurine is an efficient scavenger against reactive oxygen and nitrogen species at physiological concentrations, especially  $O_2^{\cdot-}$  and  $NO\cdot$ . Here we quantified the mitochondrial concentration of taurine isolated from rat liver, brain, muscle and heart by HPLC. In addition, we pretreated isolated mitochondria with physiological concentrations of taurine and challenged them with different oxidants. We measured the protein nitration status by dot-blot assay using anti-nitrotyrosine antibody, and MnSOD activity. Taurine was effective to prevent oxidative damage to mitochondria, especially mediated by peroxynitrite ( $ONOO^-$ ). Moreover, in rat liver slices, decreased lipoperoxidation was demonstrated by TBARS method. Since mitochondria OXPHOS are the major cellular site of ROS generation and many authors have described the existence of a mitochondrial isoform of NOS (mtNOS), we hypothesized that taurine could minimize local  $ONOO^-$  formation and its deleterious effect. Hence, we verified that taurine is able to act as an antioxidant buffer in mitochondria, suggesting an important role for this amino acid that could explain its high concentrations in all mammalian tissues, particularly near to sites of ROS and RNS production. (Financial support: CNPq, PROPESQ-UFRGS).

Resumo apresentado na forma de pôster na XXXVII Annual Meeting of SBBq; XI Congress of the PABMB, Águas de Lindóia, BARSIL, de 17 a 20 de maio de 2008.

DETERMINATION OF SCAVENGING AND ANTIOXIDANT POTENTIAL OF  
PHYSIOLOGICAL CONCENTRATIONS OF TAURINE AGAINST DIFFERENT  
REACTIVE OXYGEN/NITROGEN SPECIES

Minotto, J.B<sup>1</sup>; Oliveira, M.W.S<sup>1</sup>; de Oliveira, M.R<sup>1</sup>; Zanotto-Filho, A<sup>1</sup>; Behr, G.A<sup>1</sup>;  
Rocha, R.F<sup>1</sup>; Moreira, J.C.F<sup>1</sup>; Klamt, F<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica -  
ICBS/Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), RS, Brazil.

Taurine is a sulfur-containing amino acid present in high concentrations in all kinds of human tissues. Although not incorporated into proteins, intracellular concentration of taurine reaches up to 80 mM depending on the tissue. Its chemical properties have already been studied and tested, however all studies made with taurine have used lower concentrations than the physiological. This study was undertaken to investigate the scavenging and antioxidant activities of physiological concentrations of taurine (*i.e.*: 1, 15, 30 and 60mM) against several reactive oxygen and nitrogen species, using different *in vitro* assays. We found different reactivity of taurine scavenger for different oxidants ( $ROO\bullet > O_2^{\bullet-} \geq NO\bullet > ONOO^-$ ). No significant reactivity between taurine and  $H_2O_2$  was found. Since mitochondria OXPHOS are the major cellular site of ROS generation and many authors have described the existence of a mitochondrial isoform of NOS (mtNOS), we hypothesized that taurine could minimize local  $ONOO^-$  formation and its deleterious effect. Superoxide dismutase (SOD) enzyme is one well-known  $ONOO^-$  target. Based on an enzymatic assay we found that taurine is able to decrease the nitration status of SOD induced by peroxynitrite *in vitro*. The aforementioned experimental data showed that taurine, at physiological concentrations, efficiently scavenges many reactive oxygen species and some reactive nitrogen species, suggesting that these properties are pivotal for the maintenance of cellular and mitochondrial functions. (Financial support: CNPq, PROPESQ-UFRGS).

Resumo apresentado no V Meeting of SFRBM – South American Group; V International Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species, em Montevideo, Uruguai, de 2 a 6 de setembro de 2007.

## ANTIOXIDANT PROPERTIES OF PHYSIOLOGICAL TAURINE CONCENTRATIONS.

Oliveira, MWS<sup>1</sup>; Silveira, MM<sup>1</sup>; Rocha, RF<sup>1</sup>; Behr, GA<sup>1</sup>; de Oliveira, MR<sup>1</sup>; Mackedanz, V<sup>1</sup>; Matté, C<sup>1</sup>; Wyse, ATS<sup>1</sup>; Moreira, JCF<sup>1</sup>; Klamt, F<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> - UFRGS.

### Abstract:

Taurine, a sulfur-containing amino acid that is not incorporated into proteins, is presented at high concentrations – reaching 50 mM – within mammalian cells. It is the most abundant free amino acid in the body and plays an important role in several essential biological processes. Taurine is believed to be a weaker scavenger of reactive oxygen/nitrogen species but the concentrations used to test its antioxidant properties were way lower than physiological. In this study we found that taurine, at physiological concentrations (milimolar range), is an efficient scavenger of peroxy radical (ROO<sup>•</sup>), measured by TRAP assay, as compared to Trolox®. No reactivity against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was obtained. We also observed that taurine reacts *in vitro* and *ex vivo* with nitric oxide. Using cortex brain slices, taurine prevented the inhibitory effect of sodium nitroprusside (a NO<sup>•</sup> donor) on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase activity – a well-known target of NO<sup>•</sup> oxidation. To support a physiological role of the observed antioxidant capacity, taurine concentrations were determined by HPLC in subcellular fractions (cytosolic, mitochondrial and nuclear) from different tissues. Moreover, we demonstrated that the mitochondrial fraction is the most enriched subcellular fraction with taurine. These results are in agreement with previous studies of our group, which demonstrated that taurine is taken up preferentially by mitochondria (Klamt & Shacter, J Biol Chem 280:21346-52, 2005). Our data suggest that physiological taurine concentrations have antioxidant capacity against NO<sup>•</sup> and peroxy radical, playing a pivotal role in the mitochondrial oxidative defense. (Supported by: CNPq, PROPESQ/UFRGS).