

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

PATRICIA POSTILIONE APPOLINÁRIO

**Avaliação do efeito do ácido docosahexaenoico e de seus
hidroperóxidos na oligomerização de SOD1 em um modelo da
doença Esclerose Lateral Amiotrófica**

Versão corrigida da Tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
26/02/2013

PATRICIA POSTILIONE APPOLINÁRIO

**Avaliação do efeito do ácido docosahexaenoico e de seus
hidroperóxidos na oligomerização de SOD1 em um modelo da
doença Esclerose Lateral Amiotrófica**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)*

Orientadora: Profa. Dra. Sayuri Miyamoto

São Paulo
2013

*Aos meus pais Elierte e Maria Vitória pela
doação eterna aos filhos e ensinamentos de
vida.*

*Ao meu marido, pelo exemplo de força,
coragem, otimismo, meu amor.*

AGRADECIMENTOS

Ao final deste trabalho, gostaria de prestar meus mais sinceros agradecimentos a todas as pessoas que participaram, direta ou indiretamente, para a sua concretização. Dentre elas, agradeço particularmente:

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado direto e por proporcionar a realização desse trabalho dentro e fora do laboratório e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e INCT - Redoxoma pelo apoio financeiro.

À Profa Sayuri Miyamoto, pela orientação científica responsável, exemplar e muito presente. Sou muito grata pelos cinco anos de ensinamentos, críticas construtivas e acima de tudo pela paciência, pela sensibilidade nos momentos difíceis e confiança. É uma honra ser sua primeira aluna de pós-graduação.

À Profa Ohara Augusto, pela honrosa colaboração científica, pela atenção dispensada sempre que a solicitei e oportunidade de discussões que foram um aprendizado.

À Profa Patrícia Lopes e ao Prof Uderlei por me apresentar a bioquímica de uma forma tão apaixonante. Em especial à Profa Patricia Lopes pelas oportunidades que me proporcionou.

Ao meu amigo Anderson Souza (“Lixão”), pela amizade verdadeira, ajuda que jamais esquecerei e que é o maior merecedor de todas as conquistas. Obrigada, obrigada, obrigada...

Ao Prof Bayardo, pela honra de conhecê-lo, por me acolher em seu laboratório no meu início no Instituto de Química e auxílio inesquecível nos estudos para prova de ingresso.

Ao Prof Paolo Di Mascio por ter me recomendado a Profa Sayuri Miyamoto como orientadora, por permitir que iniciasse meus experimentos em seu laboratório e pelo apoio e críticas construtivas em todos os seminários apresentados por mim.

Aos professores Luis Eduardo Soares Netto, Marisa Helena Gennari, Alícia Juliana Kowaltowski e Miriam Uemi que direta ou indiretamente colaboraram para realização desse trabalho.

Aos amigos Priscila Derogis (pessoa mais solícita que já conheci), Thiago Mattos (Thiaguito), Rafaela Kazaoka (Rafinha, meu anjinho da guarda), Tatiana Yamaguti (Tate), Daniela Cunha (Dani), Sílvio Oliveira (Silvão), pelos momentos de trabalho, congressos, diversão e principalmente pela amizade e carinho dentro e fora do laboratório. Pelos momentos realmente inesquecíveis, com muita dificuldade, mas sempre apoiados na amizade e companheirismo, haja vista as centenas de vezes que ouviram minha apresentação oral (rsrsrs). Obrigada pelo apoio e torcida em todos os momentos. Todos serão para mim especiais para sempre!

À técnica do nosso laboratório Zildinha, querida e a mais eficiente.

Aos amigos e colegas Danilo Bilches Medinas, Fernando Rodrigues Coelho, Raphael Queiroz, José Renato Cussioli, Letícia Anderson, Alessandra Scalfó, Florêncio Freitas, Flávia Daniela Motta, Lívea Barbosa, José Pedro Angeli, Fernando Mansano, Izaura Itoma, Angélica Sanches, Camila Carrião, Adriana, Vanderson Bispo, Rita Tokikawa e Júlio pelo apoio nas disciplinas ou auxílio e ensinamentos nos experimentos e pelos momentos de descontração.

Aos técnicos especialistas de outros laboratórios e da Central Analítica: Fernando, Izaura, Berê, Fernanda, Luzia, Janaína, Edlaine, Osmar, Alessandra, Emerson e Giovana pelo apoio nos experimentos e paciência.

Ao Gustavo Souza e à Grasielle Bonfanti da empresa Waters pela disponibilidade e oportunidade de conhecer e realizar experimentos nos equipamentos desta empresa.

Aos meus pais Elierte José e Maria Vitória e ao meu irmão Bruno, pelo amor, carinho e dedicação, pela compreensão e apoio demonstrados, por acreditarem em mim e em meus ideais, por estarem sempre do meu lado, participando diretamente da minha vida, me apoiando em todos os momentos, ouvindo minhas aflições. Agradeço por tudo com muito carinho e amor.

Ao meu amor (marido) mais que especial Fernando Appolinário, desde o início aprovou, acreditou, acompanhou e acima de tudo acalentou e compreendeu. Durante cinco anos participou desse meu objetivo ativamente, aprendeu, ensinou, participou de todos os congressos na área de radicais (mesmo sendo da área de engenharia, rsrsrs). Ou seja, proporcionou tudo o que foi necessário para a concretização desse trabalho. Agradecer é pouco! Te amo!

À **Deus**, por colocar em minha vida pessoas tão especiais, por me dar forças para desenvolver esse trabalho.

“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que melhor se adapta às mudanças”.

Charles Darwin

RESUMO

Appolinário, P.P. **Avaliação do efeito do ácido docosahexaenoico e de seus hidroperóxidos na oligomerização de SOD1 em um modelo da doença Esclerose Lateral Amiotrófica**. 2013. 126p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é uma doença progressiva e fatal causada pela degeneração seletiva dos neurônios motores do cérebro e medula. Dos casos familiares de ELA (fELA), 20% são causados por mutações pontuais no gene da *sod1*. O ácido docosahexaenoico (C22:6, *n*-3, DHA) é um ácido graxo altamente insaturado, sendo um dos principais ácidos graxos da massa cinzenta do cérebro. Estudos têm correlacionado mutações de SOD1 com a formação de agregados que poderiam ser induzidos por ácidos graxos insaturados. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos e mecanismos do DHA e de seus hidroperóxidos (DHAOOH) na agregação de SOD1 *in vitro*. As análises de dicroísmo circular (CD) mostraram mudanças na estrutura secundária de ambas as proteínas apo-SOD1WT e G93A promovidas pelo DHA, resultando em aumento de superfície hidrofóbica e formação de estruturas do tipo beta-amiloide, como mostrado pelos ensaios do bis-ANS e Tioflavina, respectivamente. Estas mudanças resultam na formação de agregados amorfos como observado por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Espécies de alto peso molecular foram observadas nas incubações do DHA com as formas apo da SOD1 por SDS-PAGE sob condições não redutoras e também por cromatografia de exclusão por tamanho. A formação dos agregados mostrou-se dependente de resíduos de Cys na sua forma desprotonada, visto que agregados não foram observados na presença de beta-mercaptoetanol e sua formação foi inibida na presença de bloqueador de tióis e em pH ácido. Além disso, análises por cromatografia de exclusão mostraram que a agregação é dependente da

insaturação e conformação *cis* dos ácidos graxos. Comparativamente ao DHA, os hidroperóxidos do DHA tiveram um efeito menor na agregação de SOD1, porém revelaram a propriedade de induzir a dimerização covalente de SOD1. No geral, os dados mostram que o DHA induz a agregação de SOD1, através de um processo envolvendo a exposição de superfícies hidrofóbicas, formação de pontes dissulfeto e também de possíveis cross-links envolvendo reações do tipo “ene-tiol”.

Palavras-chave: ácido docosahexaenoico, hidroperóxidos, oligomerização, agregados, tiol, esclerose lateral amiotrófica.

ABSTRACT

Appolinário, P.P. **Evaluation of the effect of docosahexaenoic acid and its hydroperoxides in Oligomerization of SOD1 in a model of the disease Amyotrophic Lateral Sclerosis.** 2013. 126p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ALS is a progressive and fatal disease caused by selective degeneration of motor neurons in the brain and spinal cord. Twenty percent of familial ALS (fALS) cases are caused mainly by point mutations in the *sod1* gene. Docosahexaenoic acid (C22:6, *n*-3, DHA) is a highly unsaturated fatty acid, which is one of the main fatty acids in the cerebral gray matter. Studies have linked SOD1 mutations to the formation of aggregates that could be induced by unsaturated fatty acids. The aim of this study was to evaluate the effect of DHA on aggregation of SOD1 fALS mutants *in vitro* and its mechanisms. CD analysis shows changes in the secondary structure of both apo-SOD1^{WT} and G93A promoted by DHA resulting in an increase in the surface hydrophobicity and formation of structures such as beta amyloid, which was also confirmed by bis-ANS assay and Thioflavin, respectively. These changes enhance the interaction of SOD1 and DHA, leading to amorphous aggregates as revealed by FESEM. Incubation of DHA with apo-SOD1 forms results in high-molecular weight species as detected by SDS-PAGE analyses under non-reducing conditions and also by size exclusion chromatography. This appears to require Cys residues in their thiolate forms because high aggregates are not observed under reducing conditions and also by size exclusion chromatography or at acidic pH. Also, size-exclusion chromatography indicates that the mutant apo-SOD1 aggregation is dependent on the unsaturation and *cis*-conformation of fatty acids. Compared to the DHA, DHAOOH had a minor effect on SOD1 aggregation, however revealed the ability to induce covalent dimerization of SOD1. Overall, the data suggest a mechanism of DHA aggregation, by a process involving exposure to hydrophobic

surfaces, formation of disulfide bonds and also for possible cross-links involving reactions such "thiol-ene".

Keywords: docosahexaenoic acid, hydroperoxides, oligomerization, aggregates, thiol, amyotrophic lateral sclerosis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\text{O}_2$: oxigênio singlete

AA: ácido araquidônico

ACN: acetonitrila

ALA: ácido α -linolênico

apo-SOD1 G93A: forma apo (sem metais) da enzima Cu,Zn-superóxido dismutase mutante (G93A)

apo-SOD1 WT: forma apo (sem metais) da enzima Cu,Zn-superóxido dismutase wild type

bis-ANS: 8-anilino naphthalene sulfonate

CD: dicroísmo circular

DHA: ácido docosahexaenoico

DHAOOH: hidroperóxidos do ácido docosahexaenoico

DTPA: ácido dietilenotriamino penta-acético

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

ELA: esclerose lateral amiotrófica

EPA: ácido eicosapentaenóico

fELA: esclerose lateral amiotrófica familiar

FESEM: field emission scanning electron microscopy

hapo-SOD1 G93A: forma apo (sem metais) da enzima Cu,Zn-superóxido dismutase mutante (G93A) humana

hapo-SOD1 WT: forma apo (sem metais) da enzima Cu,Zn-superóxido dismutase selvagem (wild type) humana

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

hSOD1: Cu,Zn-superóxido dismutase humana

IAA: iodoacetamida

IAF: iodoacetamida fluoresceína

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

LAOOH: hidroperóxidos do ácido linoléico

LB: meio de cultura Luria Broth

LOOH: hidroperóxidos de lipídios

MEV: microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo

NaIAc: ácido iodoacético

NTA: ácido nitriloacético

PAR: 4-(2- Piridilazo) resorcinol

PBN: N-t-Butyl-Phenylnitrone

PBS: Tampão Fosfato

PUFAs: ácidos graxos poli-insaturados

SOD1: Cu,Zn-superóxido dismutase

SUMÁRIO

1 Introdução	28
1.1 Ácidos graxos	28
1.1.1 Ácido docosahexaenoico (DHA)	29
1.1.2 Oxidação do DHA	37
1.2 Doenças neurodegenerativas x DHA	41
1.2.1 Doença de Alzheimer (AD)	42
1.2.2 Doença de Parkinson (PD)	44
1.2.3 Esclerose lateral amiotrófica (ELA)	46
1.2.3.1 Esclerose lateral amiotrófica (ELA) e SOD1	48
2 Objetivos	52
3 Materiais e Métodos	53
3.1 Reagentes e materiais	53
3.2 Síntese dos hidroperóxidos do ácido docosahexaenóico (DHAOOH)	54
3.3 Separação e purificação de DHAOOH por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	55
3.4 Quantificação de DHAOOH	55
3.5 Análise de DHAOOH por HPLC acoplado à espectrometria de massa em tandem (HPLC-MS/MS)	56
3.6 Expressão da hSOD1 recombinante em bactérias	56
3.7 Purificação da hSOD1 recombinante	57

3.8 Mutações sítio-dirigido em SOD1 humana (hSOD1)	58
3.9 Preparo das formas apo	59
3.10 Oligomerização/agregação da hSOD1 mediada por diferentes ácidos graxos <i>in vitro</i>	60
3.11 SDS-PAGE	60
3.12 Cromatografia de exclusão	60
3.13 Dependência de tiol na oligomerização da SOD1 induzida por DHA	61
3.14 Análise dos tióis livres na apo-SOD WT e apo-SOD G93A	61
3.15 Ensaio de fluorescência para análise da formação de estruturas do tipo β -amilóide e ambiente hidrofóbico	62
3.16 Dicroísmo circular (CD)	63
3.17 Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV)	63
3.18 Efeito da conformação <i>cis</i> e <i>trans</i> na oligomerização das formas hapo-SOD1 WT e hapo-SOD1 G93A	64
3.19 Efeito do pH na oligomerização/agregação da Cu,Zn-superóxido dismutase humana (hSOD1)	64
3.20 Recuperação do DHA nas incubações contendo agregados de SOD1	65
3.21 Quantificação do DHA extraído nas incubações contendo agregados de SOD1 por HPLC	65
3.22 Reação “ene-tiol” e análise por espectrometria de massas	66
3.23 Experimentos de EPR	66
3.24 Análise da participação do peróxido de lipídio na formação do dímero covalente da SOD1	67
3.25 Digestão <i>in gel</i>	67
3.26 Análise trípica do dímero covalente de SOD1 por espectrometria de massas	69

4 Resultados e Discussão	70
4.1 Síntese e monitoramento da formação dos DHAOOH	70
4.2 Separação de DHA-OOH por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) fase reversa	73
4.3 Análise de DHAOOH por HPLC acoplado à espectrometria de massa em tandem (HPLC-MS/MS)	74
4.4 Expressão e purificação da superóxido dismutase 1 humana recombinante	77
4.5 Avaliação do efeito de hidroperóxidos de DHA e do DHA sobre a oligomerização/agregação de SOD1 mutada <i>in vitro</i>	77
4.5.1 SDS-PAGE	78
4.5.2 Cromatografia de exclusão por tamanho	82
4.5.3 Dependência de tiol na oligomerização da SOD1 induzida por DHA	85
4.5.4 Extração do DHA	87
4.5.5 Reação “ene-tiol” e análise por espectrometria de massas	89
4.5.6 Avaliação da participação das cisteínas livres na estrutura da enzima antioxidante SOD1	92
4.5.7 Efeito do pH na agregação da SOD1	95
4.6 Ensaios de fluorescência para análise da formação de estruturas do tipo amilóide e ambiente hidrofóbico	96
4.7 Análise morfológica dos agregados de SOD1 induzidos por DHA	99
4.8 Dicroísmo circular (CD)	101
4.9 Agregação da SOD1 induzida por ácidos graxos e dependência de insaturação	102
4.10 Efeito da conformação <i>cis</i> e <i>trans</i> na oligomerização das formas hapo-SOD1 WT e hapo-SOD1 G93A	105
4.11 Caracterização do dímero covalente de SOD1	106
4.11.1 Experimentos de EPR	107

4.11.2 Relevância do peróxido orgânico para dimerização de SOD1	108
4.11.3 Análise do dímero covalente de SOD1 por espectrometria de massas	110
5 Discussão geral	113
5.1 Agregação de SOD1 induzida por DHA	113
5.2 Dimerização covalente de SOD1 induzida por DHAOOH	115
6 Conclusões	117
7 Perspectivas	118
8 Referências Bibliográficas	119
Lista de Anexos	130

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Os ácidos graxos possuem um grupo carboxílico e uma cadeia alifática. Os ácidos graxos saturados não possuem duplas ligações, enquanto os ácidos graxos poliinsaturados contêm uma ou mais duplas ligações. Estão representados os ácidos graxos saturados (ácido palmítico), monoinsaturados (ácido oléico), os ácidos graxos precursores do ácido araquidônico (ácido linoléico) e do ácido docosahexaenóico (DHA) (ácido α linolênico), ácido araquidônico e DHA, respectivamente, da série n-6 e n-3. 29
- Figura 2.** Esquema ilustrativo da via de síntese de ácidos graxos insaturados da série n-3 e n-6. 32
- Figura 3.** Figura representando o movimento do DHA através da unidade neurovascular e sua disposição dentro dos neurônios e astrócitos. Os fosfolipídios-22:6 são recaptados pelas células endoteliais a partir da circulação e transferidos para os astrócitos dentro do sistema nervoso central. A partir disto, o DHA é incorporado nos astrócitos ou transferido para os neurônios. Depois do empacotamento no retículo endoplasmático e do aparelho de Golgi, o DHA é também transportado para o terminal sináptico para se tornar incorporado dentro dos elementos sinápticos. Adaptada de BAZAN, 2011. 34
- Figura 4:** Esquema do processo de peroxidação lipídica e da catálise mediada por metais (M^{n+} ou M^{n+1}). X^{\bullet} é qualquer radical capaz de abstrair um átomo de Hidrogênio do lipídeo (LH). L^{\bullet} é um radical centrado no carbono metilênico. LOO^{\bullet} e LO^{\bullet} são radicais peroxila e alcoxila, respectivamente. 38
- Figura 5:** Esquema representativo dos hidroperóxidos derivados do DHA (4-, 7-, 8-, 10-, 11-, 13-, 14- e 16-, 17 e 20-HpDHA) e dos neuroprostanos identificados in vitro e in vivo (4-F₄-NP, 11-F₄-NP, 7-F₄-NP(nPF_{4 α} -V), 14-F₄-NP, 10-F₄-NP, 17-F₄-NP, 13-F₄-NP, 20-F₄-NP). A peroxidação do DHA leva à formação de oito possíveis grupos regioisoméricos de neuroprostanos, sendo que há a hipótese de que as séries 4 e 20-F₄-NPs são geradas em maior quantidade. Adaptado de YIN et. al., 2005. 40

Figura 6. Figura representando a wild-type Cu, Zn-SOD. Cobre (laranja) e zinco (azul) estão representados como esferas na subunidade do lado direito da figura. Em roxo está representado a ponte dissulfeto intramolecular Cys 57-Cys 146 que ajuda a formar a interface do dímero da SOD1. O cobre é coordenado pelos resíduos His63, His46, His48 e His120. Adaptada de ROBERTS, 2007. 49

Figura 7. Figura representando a wild-type Cu, Zn-SOD. Em roxo está representado as duas cisteínas reduzidas, a Cys 6 e a Cys 111, localizadas a Cys 6 na fita β 1 e no loop VI da SOD1 WT humana a Cys 111. 50

Figura 8. Formação de dienos conjugados durante fotooxidação do DHA. Espectro de absorvância no UV com pico máximo em 235nm. Interno ao espectro, gráfico de barras representando o aumento da formação dos DHAOOH com o aumento do tempo. 72

Figura 9. Resultado do experimento realizado em Cromatografia de Camada Delgada (TLC) a partir da fotooxidação do DHA. Estão representados DHA e os monohidroperóxidos DHAOOH. Foram analisadas alíquotas nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 min, havendo uma diminuição do DHA e aumento dos seus produtos de oxidação de acordo com o aumento do tempo. 72

Figura 10. Cromatograma de análise dos DHAOOH por HPLC fase reversa. Fase móvel acetonitrila:ácido fórmico 0,005% (55:45, v/v). Detecção UV em 235nm representado em preto e detecção UV em 205nm representado em azul. 73

Figura 11. (A) Espectro de massa dos DHAOOHs selecionando o íon m/z 359. (B) Espectro de massa da fragmentação padrão para o isômero 19-DHAOOH. 74

Figura 12. Espectros de massa adquiridos no modo negativo das fragmentações padrão para cada isômero de DHAOOH. (a) 19-DHAOOH (b) 20-DHAOOH (c) 16-DHAOOH (d) 13-DHAOOH (e) 14-DHAOOH (f) 10-DHAOOH (g) 11-DHAOOH (h) 7-DHAOOH (i) 8-DHAOOH (j) 5-DHAOOH (j) 4-DHAOOH. Condições de análise: temperatura de dessolvatação 200°C; temperatura da fonte 100°C, voltagem 30 V. 76

Figura 13. Banda de absorção do resíduo de triptofano na região do ultravioleta das enzimas hSOD1 nativa (WT) representado em preto (A) e hSOD1 mutante (G93A) representado em vinho (A). Análise da hSOD1 nativa e hSOD1 G93A (B) por SDS-PAGE sob condições redutoras e corado por prata. 77

Figura 14. SDS-PAGE sob condições não-redutoras ($-\beta$ -mercaptoetanol) (A) e redutoras ($+\beta$ -mercaptoetanol) (B). Avaliação do efeito do DHA e DHAOOH sob a oligomerização da enzima SOD1. Em ~ 37 e 21 kDa estão representados, respectivamente, o dímero e o monômero da SOD1. Incubações por 24h à 37°C de hSOD1 WT ($10\ \mu\text{M}$) e hapo-SOD1 WT ($10\ \mu\text{M}$) com $250\ \mu\text{M}$ DHA, DHAOOH ou H_2O_2 . A adição do agente redutor (β -mercaptoetanol) acontece após as 24 h de incubação. 79

Figura 15. SDS-PAGE da formação dos oligômeros das formas apo-hSOD1 induzidos por DHA ou DHAOOH sob condições não-redutoras (sem β -mercaptoetanol) (A) e redutoras (com β -mercaptoetanol) (B). As apo-enzymes WT ou G93A foram incubadas a 37°C por 24h na ausência (control) ou presença de $250\ \mu\text{M}$ de DHA, $250\ \mu\text{M}$ de DHAOOH ou $250\ \mu\text{M}$ de H_2O_2 . A adição do agente redutor (β -mercaptoetanol) foi feita após as 24 h de incubação. 81

Figura 16. SDS-PAGE sob condições não-redutoras ($-\beta$ -mercaptoetanol) (A) e redutoras ($+\beta$ -mercaptoetanol) (B). Avaliação da dose-dependência do DHA e DHAOOH sob a oligomerização das enzimas apo-SOD1WT e apo-SOD1G93A. Em ~ 37 e 21KDa estão representados, respectivamente, o dímero e o monômero da SOD1. A adição do agente redutor (β -mercaptoetanol) foi feita após as 24 h de incubação. 81

Figura 17. Cromatografia de exclusão para detecção da agregação da apo-SOD1 WT e G93A. Apo-SOD1 WT incubada na ausência de ácidos graxos (A) e na presença de 250µM DHA (B), DHAOOH (C) e H₂O₂ (D). Apo-SOD1G93A incubadas na ausência de ácidos graxos (E) e na presença de 250µM de DHA (F), DHAOOH (G) e H₂O₂ (H). As setas indicam o pico referente à SOD1. As linhas coloridas representam o tempo de incubação. Preto 2 h, 6 h em vermelho e azul 24 h. A formação de agregados está representada entre os tempos de ~5 a 9 minutos, sendo estes agregados de ~ 700 kDa. 84

Figura 18. Cromatografia de exclusão do requerimento de tióis reduzidos livres (-SH) pela apo-SOD1 WT analisados a partir da alquilação dos tióis por ácido iodoacético (NalAc). As linhas coloridas em (A) representam a incubação da apo-SOD1WT com MeOH (linha preta), NalAc+DHA (linha vermelha) e apo-SOD1WT com DHA (linha verde). Intensidade do pico da hapo-SOD1 WT (% relativa) está representada em (B). Incubações de 24 h à 37°C. A proteína agregada, sendo de maior tamanho em relação à proteína nativa, está representada nos tempos iniciais da corrida cromatográfica (5 a 9 min). 85

Figura 19. Experimento para análise de tióis livres na proteína. Em (A) SDS-PAGE em condições não redutoras da apo-SOD1 G93A controle e incubação contendo DHA. À esquerda gel corado com nitrato de prata e à direita imagem das proteínas fluorescentes no gel. No painel à direita, gráfico representativo da porcentagem das proteínas marcadas com IAF nas incubações controle e na presença de DHA. Em (B) mesmas condições apresentadas em (A), porém sob condições redutoras. 87

Figura 20. Análise de recuperação do DHA após incubação de 24 h com as proteínas apo-SOD1 WT e apo-SOD1 G93A. Todas as incubações foram processadas para extração de 100 µM de DHA. Após incubação e procedimento de extração, 104 µM de DHA foi recuperado na incubação controle (DHA+PBS), 48 µM de DHA foi recuperado na incubação com a apo-SOD1 WT e 57 µM de DHA foi recuperado na incubação com a apo-SOD1 G93A. 88

Figura 21. Análise da participação dos tióis na agregação de SOD1 por ESI-Q-ToF. 90
(A) cromatograma de LC-MS/MS selecionando-se a massa do DHA (m/z 327, em amarelo) e do aduto DHA- β -mercaptoetanol (m/z 405, em azul) (B) distribuição isotópica padrão para o aduto formado pela incubação do DHA com o β -mercaptoetanol (C) espectro do aduto formado pela incubação de DHA com β -mercaptoetanol. (D) espectro de MS/MS por MRM da massa 405 correspondente ao aduto da interação covalente do ácido graxo com o agente redutor β -mercaptoetanol. As incubações foram feitas a 37 °C por 24 h. Foram incubados DHA (250 μ M) com β -mercaptoetanol (1,43 M).

Figura 22. Resultado do sequenciamento para verificação da geração das mutações. 92
Em (A) C6S WT e (C) C111S WT. Em (D) C6S G93A e (F) C111S G93A. O retângulo em (B) destaca a glicina que é trocada por alanina na mutação G93A (E) não presente na WT Os retângulos em (A), (C), (D) e (F) destacam as mutações respectivas. As flechas indicam a sequência da enzima hSOD1.

Figura 23. Ensaio de participação das cisteínas livres na oligomerização de SOD1 94
induzida por DHA. Em (A) gráfico de barras representando % de formação de agregados em incubações de apo-SOD1 WT e suas respectivas mutações (C6S e C111S), na ausência e presença de DHA. Em (B) apo-SOD1 G93A e suas respectivas mutações (C6S e C111S), em incubações na presença e ausência de DHA, representadas em % de formação de agregados em gráfico de barras.
*p<0,001.

Figura 24. Gráficos em barra representativos da porcentagem de formação de agregados da SOD1 dependente dos resíduos de cisteína na forma de tiolato. As incubações foram feitas em uma faixa de pH de 3,5 a 8,4 na ausência e presença de DHA (A) % de agregação de apo-SOD1 WT na ausência de DHA (B) % de agregação de apo-SOD1 WT na presença de DHA (C) % de agregação de apo-SOD1 G93A na ausência de DHA (D) % of apo-SOD1 G93A na presença de DHA. 96

Figura 25. Efeito do DHA, DHAOOH e H₂O₂ em relação ao aumento de superfície hidrofóbica e formação de agregados β-amilóide de hapo-SOD1 WT e hapo-SOD1 G93A. (A) mostra o espectro de fluorescência da probe bis-ANS incubada com 250 μM de DHA, DHAOOH ou H₂O₂ sem a proteína, (B) com 10 μM da apo-SOD1WT; ou (C) com 10μM da apo-SOD1 G93A. (D) mostra o espectro de fluorescência da tioflavina S de incubações contendo 250 μM de DHA, DHAOOH ou H₂O₂ sem proteína; (E) com 10 μM da hapo-SOD1 WT; ou (F) com 10 μM da hapo-SOD1 G93A. Todas as reações foram incubadas por 24h a 37°C. 98

Figura 26. Imagem de MEV das amostras incubadas. (A) branco com MeOH (B) branco com DHA (C) apo-SOD1 WT (10 μM) na ausência de DHA (D) apo-SOD1 WT (10 μM) na presença de DHA (250 μM) (E) apo-SOD1 G93A (10 μM) na ausência de DHA (F) apo-SOD1 G93A (10 μM) na presença de DHA . A barra de escala é de 1 μm. 100

Figura 27. Espectro de CD UV-distante. (A) modificação da estrutura secundária da apo-SOD1 WT tratada com DHA (vermelho) em relação ao controle (preto). (B) mostra o efeito do DHA na estrutura secundária da apo-SOD1 G93A (vermelho) em relação ao controle (preto). Em (C) tabela representativa dos valores em porcentagem de folhas e random coil presentes nas proteínas apo WT e apo G93A. 102

Figura 28. Efeito dos diferentes ácidos graxos (ácido esteárico, linoléico, 104
araquidônico, DHA) na oligomerização da apo-SOD1 WT e G93A por cromatografia
de exclusão e SDS-PAGE. Em (A) cromatogramas das incubações de 24 h da hapo-
SOD1 WT com diferentes ácidos graxos (B) cromatogramas da hapo-SOD1 G93A
incubada com diferentes ácidos graxos por 24 h (C) gráfico em barras representando
a intensidade do pico da hapo-SOD1 WT em % em diferentes tempos, 2 h (em azul),
6 h (em vermelho) e 24 h (em verde) (D) intensidade do pico da hapo-SOD1 G93A
em % após incubação com diferentes ácidos graxos em diferentes tempos
representadas em gráfico de barras (E) SDS-PAGE das incubações de hapo-SOD1
WT com diferentes ácidos graxos e com mesmo número de carbonos, esteárico
(18:0), oléico (18:1) e linoleico (18:2).

Figura 29. Cromatografia de exclusão para análise da conformação do ácido graxo. 106
(A) incubações da apo-SOD1 WT com os ácidos oleico (em verde) e elaídico (em
vermelho). Como controle somente a proteína (em preto). (B) incubações da apo-
SOD1 G93A com os ácidos oleico (em verde) e elaídico (em vermelho). Como
controle somente a proteína (em preto). Em azul (A) e (B) cromatograma da
incubação da proteína com o DHA na forma cis confirmando a formação de
agregado.

Figura 30. Experimentos de EPR utilizando o captador de spin PBN. Em (A) 108
incubações controle de apo-SOD1 G93A 10 μ M e a outra de DHAOOH 250 μ M,
ambas com tampão fosfato 50 mM, DTPA 100 μ M, NaCl 150 mM, chelex e PBN
50mM e incubação da apo-SOD1 G93A com o DHAOOH e PBN 50 μ M. Todas
incubações à 37°C por 5 min e 24 h (B) incubações de DHAOOH com tampão
descrito anteriormente em diferentes temperaturas (15°C e 37°C) por 5 min e 24 h

Figura 31. SDS-PAGE sob condição redutora para análise da relevância do peróxido 109
orgânico para dimerização de SOD1. Em (A) incubação de apo-SOD1 G93A (10 μ M)
com DHAOH (250 μ M) e DHAOOH (250 μ M). Em (B) incubações com diferentes
peróxidos, sendo eles hidroperóxidos do ácido linoléico (LAOOH), DHAOOH, tert-
butil hidroperóxido e H₂O₂, todos na concentração de 250 μ M. (C) Incubações de
apo-SOD1 G93A durante 24 h à 37°C na ausência e presença de DHAOOH após
tratamento com agentes redutores (DTT) e alquilantes (IAA).

Figura 32. Cromatograma e espectro de amostras de apo-SOD1 G93A digeridas. 111
Em (A) o cromatograma na cor verde representa a incubação controle (monômero); o cromatograma na cor vermelha representa o dímero covalente. Em (B) o espectro na cor verde representa a incubação controle (monômero). Em azul está representado o espectro do dímero covalente. O círculo marca as massas altas em ambos espectros ($m/z = 2000-3700$ Da).

Figura 33. Análise comparativa dos peptídeos da apo-SOD1 G93A controle 112
(monômero), dímero e banco de dados de proteínas (PDB, código 3GZO). Em verde, estão representados os peptídeos comuns ao monômero e ao dímero. Em lilás, estão representados os peptídeos encontrados somente no monômero e em amarelo estão representados os peptídeos únicos para o dímero.

ÍNDICE DE ESQUEMAS E TABELAS

Esquema 1. Esquema da reação de fotossensibilização do ácido docosahexaenoico por azul de metileno gerando os isômeros de DHAOOH. (a) 20-OOH (b)19-OOH (c) 17-OOH (d) 16-OOH (e) 14-OOH (f)13-OOH (g) 11-OOH (h)10-OOH (i)8-OOH (j)7-OOH (k)5-OOH (l)4-OOH.	71
Esquema 2. Esquema representativo da reação “ene-tiol”.	89
Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para a construção de mutantes de SOD1.	58
Tabela 2. Fragmentação padrão de DHAOOH em análise por HPLC-MS/MS	76

1 Introdução

Os lipídios constituem um grupo heterogêneo de compostos que têm papel crucial na célula, cuja característica comum é a solubilidade em solventes orgânicos e insolubilidade na água. As funções biológicas dos mesmos são tão diversas quanto a sua química. Sua importância pode ser notada pelo número crescente de estudos apontando o envolvimento de seus produtos de oxidação e de disfunções no metabolismo de lipídios em doenças crônico-degenerativas (LARSSON *et. al.*, 2004; MONTINE E MORROW, 2005; LUSIS, 2000; CHISOLM e STEINBERG, 2000).

1.1 Ácidos graxos

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos com cadeias de hidrocarbonetos contendo de 4 a 36 carbonos, sendo encontrados principalmente esterificados a triacilglicerídios, colesterol e fosfolipídios constituintes das membranas celulares. Eles podem ser classificados em saturados (contendo apenas ligações simples), monoinsaturados (uma ligação dupla) ou poliinsaturados (duas ou mais ligações duplas) (Figura 1). Os ácidos graxos poliinsaturados podem ser representados usando a abreviação estrutural que os identifica única e exclusivamente através do número de carbonos e de duplas ligações. Também podem ser denominados a partir da posição das ligações duplas, em relação ao grupamento metila terminal, utilizando para tanto a denominação ω ou n (NELSON e COX, 2002) sendo a denominação n a recomendada pela IUPAC (IUPAC-IUB; 1978).

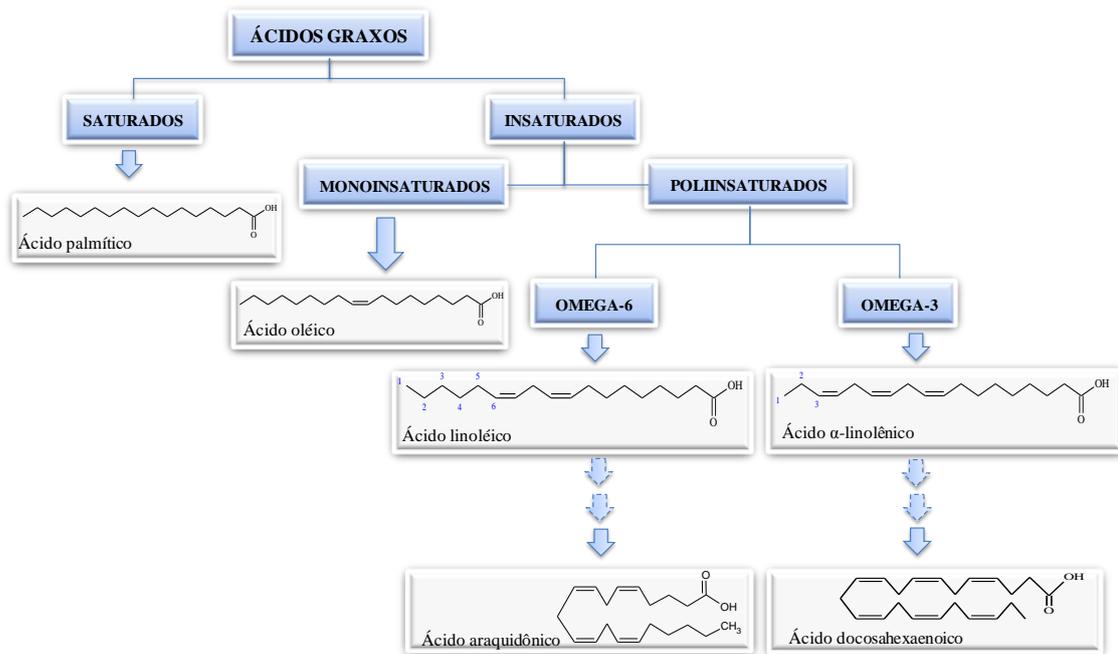


Figura 1: Os ácidos graxos possuem um grupo carboxílico e uma cadeia alifática. Os ácidos graxos saturados não possuem duplas ligações, enquanto os ácidos graxos poliinsaturados contêm uma ou mais duplas ligações. Estão representados os ácidos graxos saturados (ácido palmítico), monoinsaturados (ácido oléico), os ácidos graxos precursores do ácido araquidônico (ácido linoléico) e do ácido docosahexaenóico (DHA) (ácido α linolênico), ácido araquidônico e DHA, respectivamente, da série $n-6$ e $n-3$.

Estudos mostram que os ácidos graxos poliinsaturados $n-3$ (ômega-3) e $n-6$ (ômega-6) têm efeitos distintos nas células, sendo o primeiro associado a efeitos benéficos e o segundo, a efeitos deletérios (SCHMITZ e ECKER, 2008; SIMOPOULOS, 2002). Os ácidos linoléico (18:2 $n-6$) e linolênico (18:3 $n-3$) são os precursores dos ácidos graxos $n-6$ e $n-3$, respectivamente. São considerados essenciais por não serem sintetizados *de novo* pelos tecidos de vertebrados, sendo necessária a ingestão destes pela dieta (HOLMAN, 1986).

1.1.1 Ácido docosahexaenoico (DHA)

O ácido docosahexaenoico (*cis*- 4, 7, 10, 13, 16, 19-22:6, DHA) é um ácido graxo $n-3$ (ômega-3) de 22 carbonos e 6 insaturações. Está enriquecido nas

membranas neurais do córtex cerebral e na retina (HORROCKS e FAROOQUI, 2004; LAURITZEN *et. al.*, 2001), onde 25-35% se encontra esterificado em aminofosfolipídios como a fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina e em plasmalogênios (KIM, 2007; SALEM *et. al.*, 2001). O acréscimo do DHA no sistema nervoso central ocorre ativamente durante o período de desenvolvimento perinatal (KIM, 2007; SALEM *et. al.*, 2001; FAROOQUI *et. al.*, 2000; FAROOQUI *et. al.*, 2000; ALESSANDRI *et. al.*, 2003). Estudos mostram que o DHA está envolvido em vários processos neuronais, entre eles: no funcionamento da memória (GAMOH *et. al.*, 1999), função excitável da membrana (MCGAHON *et. al.*, 1999), biogênese e função de células fotorreceptoras (GORDON e BAZAN, 1990), sinalização neuronal (MIRNIKJOO *et. al.*, 2001) e neuroproteção (RODRIGUEZ DE TURCO *et. al.*, 2002; KIM *et. al.*, 2000).

As vias metabólicas de síntese dos ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) foram elucidadas por dois grupos de pesquisadores há mais de 40 anos (revisado em detalhes por SPRECHER, 2000). Estes desenvolveram técnicas para sintetizar PUFAs marcados ($1-^{14}\text{C}$), os quais foram administrados a ratos machos albinos. Posteriormente, os PUFAs dos tecidos destes animais foram isolados e saponificados, sendo o perfil de marcação desses compostos usado para propor suas vias de biossíntese (MEAD, 1971; KLENK e MOHRHAUER, 1960). Estabeleceu-se que o DHA pode ser sintetizado a partir do ácido α -linolênico (18:3n-3, ALA) através de uma sequência de reações envolvendo dessaturações e alongamentos da cadeia carbônica (KIM, 2007; UAUY e CASTILLO, 2003; AYALA *et. al.*, 1973; SCOTT e BAZAN, 1989; VOSS *et. al.*, 1991). No entanto, estudos *in vivo* em humanos mostraram que ~5% do ALA é convertido em EPA mas apenas 0,5% é convertido em DHA (PLOURDE e CUNNANE, 2007). Portanto, considera-se

importante a ingestão de alimentos ou suplementos ricos em DHA (PLOURDE e CUNNANE, 2007).

A via de síntese do DHA conforme representado na figura 2 inicia-se com a ação da enzima $\Delta 6$ -dessaturase (enzima que insere uma dupla ligação na posição 6) a partir da dessaturação do ácido α -linolênico a $18:4n-3$ pela enzima. Em seguida, este ácido graxo tem sua cadeia carbônica alongada a $20:4n-3$ pela enzima elongase, sendo subsequentemente convertido à $20:5n-3$ (ácido eicosapentaenóico, EPA) pela $\Delta 5$ -dessaturase e alongada a $22:5n-3$ no retículo endoplasmático (KIM, 2007). Ainda neste mesmo compartimento celular, o ácido graxo $22:5n-3$ sofre adição de 2 carbonos formando $24:5$, o qual é convertido a $24:6$ pela ação de uma $\Delta 6$ -dessaturase (KIM, 2007). As enzimas $\Delta 5$ e $\Delta 6$ -dessaturases de mamíferos, foram identificadas e clonadas (NAKAMURA E NARA, 2004; AKI *et. al.*, 1999). Porém, a enzima $\Delta 4$ -dessaturase, responsável pela síntese direta de DHA a partir de $22:5n-3$, foi identificada apenas em microalgas. Deste modo, em mamíferos, o DHA é sintetizado por meio de etapas adicionais envolvendo reações de alongamento, dessaturação e posterior encurtamento da cadeia nos peroxissomos (KIM, 2007). Um estudo utilizando fibroblastos de pacientes com defeitos na oxidação mitocondrial e peroxissomal de ácidos graxos, mostrou que, peroxissomos e não mitocôndrias estão envolvidos na formação do DHA (FERDINANDUSSE *et. al.*, 2001). Deste modo, a partir da formação de $24:6n-3$, este é transferido para os peroxissomos onde é convertido a DHA através da remoção de dois carbonos da cadeia por β -oxidação. O DHA formado é transferido de volta ao retículo endoplasmático e rapidamente incorporado aos fosfolipídios de membrana por nova esterificação ou por reação de deacilação-reacilação (KIM, 2007; UAUY e CASTILLO, 2003; SPRECHER *et. al.*, 1995).

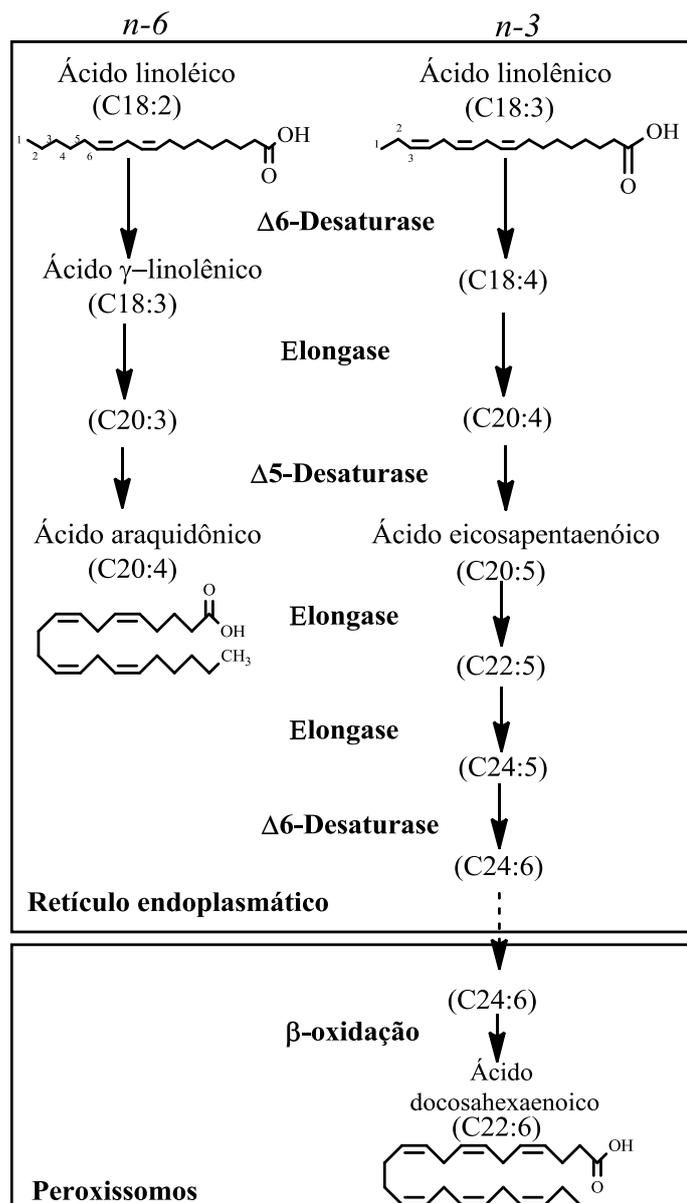


Figura 2. Esquema ilustrativo da via de síntese de ácidos graxos insaturados da série n-3 e n-6.

Os ácidos graxos de cadeia longa n-6 são biosintetizados a partir do ácido linoléico (18:2n-6) utilizando uma via análoga e o mesmo sistema enzimático dos ácidos graxos n-3 (Figura 3) (KIM, 2007). É interessante notar que na maioria dos tecidos, o ácido graxo de cadeia longa mais comumente encontrado é o ácido araquidônico (20:4n-6; AA), no entanto o cérebro é particularmente enriquecido em DHA. Postula-se que o acúmulo preferencial de DHA neste tecido provavelmente

seja consequência de um processo de captação, síntese e esterificação bastante efetiva deste ácido graxo na célula neuronal (MOORE *et. al.*, 1991).

O fígado é considerado o principal local de síntese de DHA (SCOTT e BAZAN, 1989). Porém, um estudo realizado por MOORE *et. al.*, 1991 investigou se os próprios neurônios seriam capazes de alongar e dessaturar ácidos graxos essenciais ou estão dependentes do apoio de outras células cerebrais. Para tanto, culturas primárias de neurônios e astrócitos de rato foram incubadas com [1-¹⁴C] 18:02 *n*-6 [1-¹⁴C] 20:04 *n*-6, [1-¹⁴C] 18:03 *n*-3, ou [1-¹⁴C] 20:05 *n*-3. Culturas neuronais dessaturaram de forma ineficaz os ácidos graxos a cada passo da via, produzindo principalmente produtos de alongamento dos precursores de 18 - e de 20-carbonos. (MOORE *et. al.*, 1991). Em contraste, os astrócitos alongaram e dessaturaram ativamente os precursores de 18 - e 20 carbonos (WILLIARD *et. al.*, 2002). A maioria dos ácidos graxos de cadeia longa, formados por culturas de astrócitos, particularmente AA e DHA, foi liberado no líquido extracelular. Embora incapaz de sintetizar AA e DHA, culturas neuronais captaram esses ácidos graxos a partir do meio (MOORE *et. al.*, 1991). Dessa forma, os astrócitos, que estão situados em estreito contato com os neurônios, parecem desempenhar um papel importante de fornecimento de DHA para os neurônios (Figura 3) (KIM, 2007; BAZAN *et. al.*, 2011).

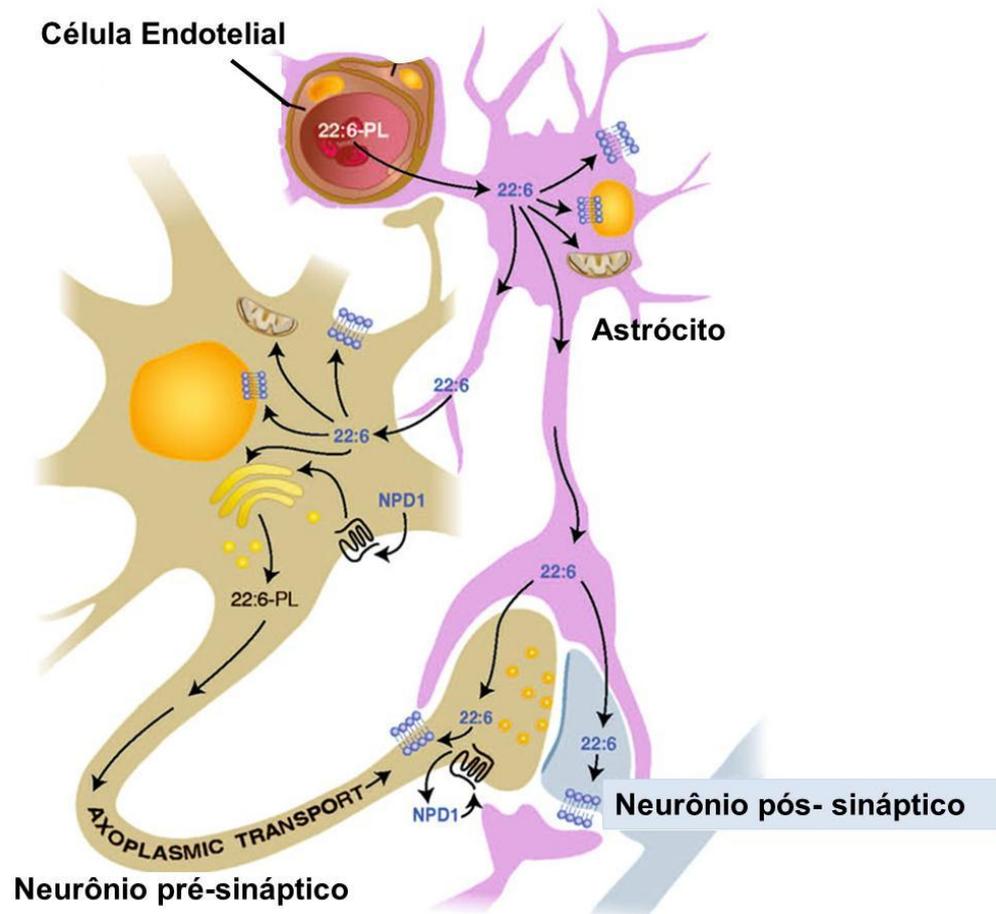


Figura 3. Figura representando o movimento do DHA através da unidade neurovascular e sua disposição dentro dos neurônios e astrócitos. Os fosfolípidios-22:6 são recaptados pelas células endoteliais a partir da circulação e transferidos para os astrócitos dentro do sistema nervoso central. A partir disto, o DHA é incorporado nos astrócitos ou transferido para os neurônios. Depois do empacotamento no retículo endoplasmático e do aparelho de Golgi, o DHA é também transportado para o terminal sináptico para se tornar incorporado dentro dos elementos sinápticos. **Adaptada de BAZAN, 2011.**

O DHA da dieta ou sintetizado no fígado é transportado até o cérebro. Na circulação sanguínea o DHA pode ser transportado ligado à albumina ou a lipoproteínas. A albumina atravessa facilmente a barreira hematoencefálica, no entanto, argumenta-se que a quantidade de ácidos graxos livres não seja suficientemente alta para fornecer quantidades suficientes de DHA para o cérebro e, portanto, ácidos graxos esterificados presentes em lipoproteínas seriam a principal fonte de DHA exógeno (SCOTT e BAZAN, 1989). Existem dois fatores que controlam o grau de incorporação do DHA no cérebro: (a) a taxa de sua dissociação

da albumina plasmática e (b) a esterificação do DHA à co-enzima A pela acil-CoA sintetase de cadeia longa (RAPOPORT, 2003; RAPOPORT, 1999).

Independente da sua fonte, o DHA é rapidamente internalizado pelos neurônios e incorporado nos fosfolípidios das membranas plasmáticas sinápticas e nas vesículas sinápticas (KIM *et. al.*; 2000; RAPOPORT *et. al.*, 2001; BRECKENRIDGE *et. al.*, 1973; GARCIA *et. al.*, 1998). Os mecanismos de absorção do DHA pelas células neurais continuam a ser elucidados, sendo também identificado o envolvimento de proteínas como a ácido graxo translocase e proteínas transportadoras de ácido graxo (KIM, 2007; KALANT e CIANFLONE, 2004).

Durante a síntese dos fosfolípidios, os ácidos graxos saturados, como o ácido palmítico (16:0) e o ácido esteárico (18:0) são acilados a posição *sn-1* do glicerol 3-fosfato, enquanto os ácidos graxos poliinsaturados como o DHA, são principalmente incorporados a posição *sn-2*. O DHA é incorporado, principalmente, em aminofosfolípidios, sendo a maior parte em fosfatidiletanolamina (PE) e em menor proporção na fosfatidilserina (PS) (HOLUB, 1978; MARSZALEK e LODISH, 2005). Experimentos realizados *in vivo* utilizando ratos acordados (recuperados da anestesia) mostraram que 2-8% do DHA incorporado nos fosfolípidios do cérebro são substituídos diariamente em ratos adultos (RAPOPORT *et. al.*, 2001). Neste experimento os ratos foram inicialmente anestesiados para implantação de um cateter na veia e artéria femoral direita e uma solução contendo o ácido graxo marcado radioativamente foi injetada após recuperação da anestesia. Medidas de radioatividade no plasma e no cérebro mostraram que essa reposição é feita pelo DHA não esterificado do plasma sanguíneo, sendo que em torno de 90 % da radioatividade foi encontrada na fração lipídica contendo fosfolípidios (RAPOPORT *et. al.*, 2001).

Os DHAs não esterificados são rapidamente reincorporados a um lisofosfolípido, através de ações de uma série de acil-CoA sintetases e aciltransferases com o consumo de ATP (LAJTHA *et. al.*, 2007). Estudos mostram que a incorporação de PUFAs plasmáticos em fosfolípidios do cérebro não é limitada por difusão através da barreira hematoencefálica, mas sim regulada pela conversão dependente de ATP dos PUFAs não esterificados a acil-CoA pela acil-CoA sintetase dentro do cérebro (RAPOPORT *et. al.*, 2001; CHANG *et. al.*, 1999). Além da incorporação em fosfolípidios, parte do DHA não esterificado captado pelos neurônios também é consumida através de um número de vias catabólicas, incluindo β -oxidação e conversão a eicosanóides ou docosanóides pelas ciclooxygenases, lipooxygenases ou citocromo P450 epoxygenases (RAPOPORT *et. al.*; 2007; PHILLIS *et. al.*, 2006) e também por vias não-enzimáticas mediadas por espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio.

O DHA é um ácido graxo altamente insaturado (possui 6 insaturações), conseqüentemente, susceptível à oxidação mediada por espécies reativas (PAN *et. al.*, 2005; LYBERG e ADLERCREUTZ, 2006). Várias evidências apontam para envolvimento de espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio na patogênese de doenças neurodegenerativas (SIMONIAN e COYLE, 1996). Deste modo, lipídios poliinsaturados, em particular o DHA, são alvos bastante susceptíveis de oxidação, gerando neste processo uma série de produtos oxidados, entre eles, hidroperóxidos de lipídios (LOOH) (LYBERG e ADLERCREUTZ, 2006; YIN *et. al.*, 2005; GIROTTI, 1998). Sendo mais polares, os LOOHs modificam a estrutura e a função das membranas e podem ser deletérios para as células (GIROTTI, 1998).

1.1.2 Oxidação do DHA

Os LOOHs são os produtos primários de um processo autocatalítico de oxidação conhecido como peroxidação lipídica (Figura 4). Esse processo inicia-se pelo ataque a um lipídio por qualquer espécie que tenha reatividade suficiente para abstrair um átomo de hidrogênio de um grupo metileno ($-\text{CH}_2-$). Nesta fase, chamada de etapa de iniciação, tem-se a formação de um radical centrado no carbono metilênico ($-\dot{\text{C}}\text{H}-$) pela retirada do seu H^\bullet , provocando um desemparelhamento de elétrons neste mesmo carbono. O destino mais provável deste novo radical formado será combinar-se com o O_2 produzindo novos radicais, ainda mais reativos. Nesta fase de propagação da peroxidação, novos radicais são formados pela combinação do radical de carbono com o O_2 , os radicais peroxila ou radical peróxido (LOO^\bullet), os quais reagirão com outros lipídeos adjacentes. É nesta fase que ocorrem reações em cadeia e a propagação da peroxidação lipídica. Esta combinação do radical peroxila com um átomo de hidrogênio abstraído de outra molécula gera hidroperóxidos de lipídeos (LOOH) ou apenas peróxidos. Íons de metais livres (M^{n+}) também são capazes de promover a oxidação lipídica e a continuidade da reação de propagação pela quebra dos LOOH pré-formados, gerando LOO^\bullet e/ou radical alcóxila (LO^\bullet). A decomposição de LOOH promovida por metais reduzidos (M^{n+}) gera LO^\bullet , enquanto os na forma oxidada (M^{n+1}), produz LOO^\bullet (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). A última etapa da reação, a fase de terminação, dá-se pela aniquilação dos radicais formados originando produtos não radicalares (GARDNER, 1989; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Os radicais peroxila e alcóxila também podem: sofrer dismutação ou clivagem β formando aldeídos; formar uma ligação covalente com resíduos de aminoácidos ou sofrer um rearranjo formando produtos secundários da lipoperoxidação (derivados hidroxil-, ceto-, cetohidroxil- e epoxi-

leva à formação de 12 isômeros: os mesmos 10 formados pela oxidação mediada por radicais livres mais os isômeros 5- e 19- DHAOOH que não apresentam dienos conjugados (LYBERG e ADLERCREUTZ, 2006).

Além dos hidroperóxidos, a oxidação do DHA gera uma série de produtos secundários como, por exemplo, os neuroprostanos (NP) (YIN *et. al.*, 2005), neurofuranos (SONG *et. al.*, 2007), neurocetais (BERNOUD-HUBAC *et. al.* 2001) e aldeídos de cadeia curta (KAWAI *et. al.*, 2004). A formação desses produtos tem sido revelada em amostras de cérebro, inclusive humano; além disso, estudos sugerem que esses produtos podem servir como bons marcadores da injúria oxidativa em tecidos enriquecidos em DHA como, o cérebro (KAWAI *et. al.*, 2006).

Os NP são compostos análogos aos isoprostanos (IsoP), gerados pela via enzimática de oxidação do AA (YIN *et. al.*, 2005). A peroxidação do DHA leva à formação de 8 possíveis grupos regioisoméricos, sendo que há a hipótese de que as séries 4 e 20-NPs são geradas em maior quantidade (Figura 5) (YIN *et. al.*, 2005; ROBERTS *et al.*, 1998; REICH *et. al.*, 2000).

Os neurofuranos são isofuranos caracterizados por um anel tetrahidrofurano substituído. Eles são preferencialmente formados sob condições de alta tensão de oxigênio (SONG *et. al.*, 2007). Neurofuranos já foram detectados em níveis elevados no córtex cerebral em ratos de um modelo de doença de Alzheimer (ARNESON *et. al.*, 2007).

A peroxidação dos ácidos graxos poliinsaturados leva também à formação de uma série de aldeídos citotóxicos e genotóxicos (ESTERBAUER *et. al.*; 1991). Os aldeídos são relativamente estáveis e, conseqüentemente, capazes de se difundir dentro ou fora da célula e atacar células distantes do local onde foi iniciado o processo oxidativo. Aldeídos derivados da peroxidação do DHA têm sido descritos

como compostos que apresentam um papel chave na patogênese das doenças neurodegenerativas e seus metabólitos são potenciais parâmetros de lipoperoxidação (DE ZWART *et. al.*, 1999).

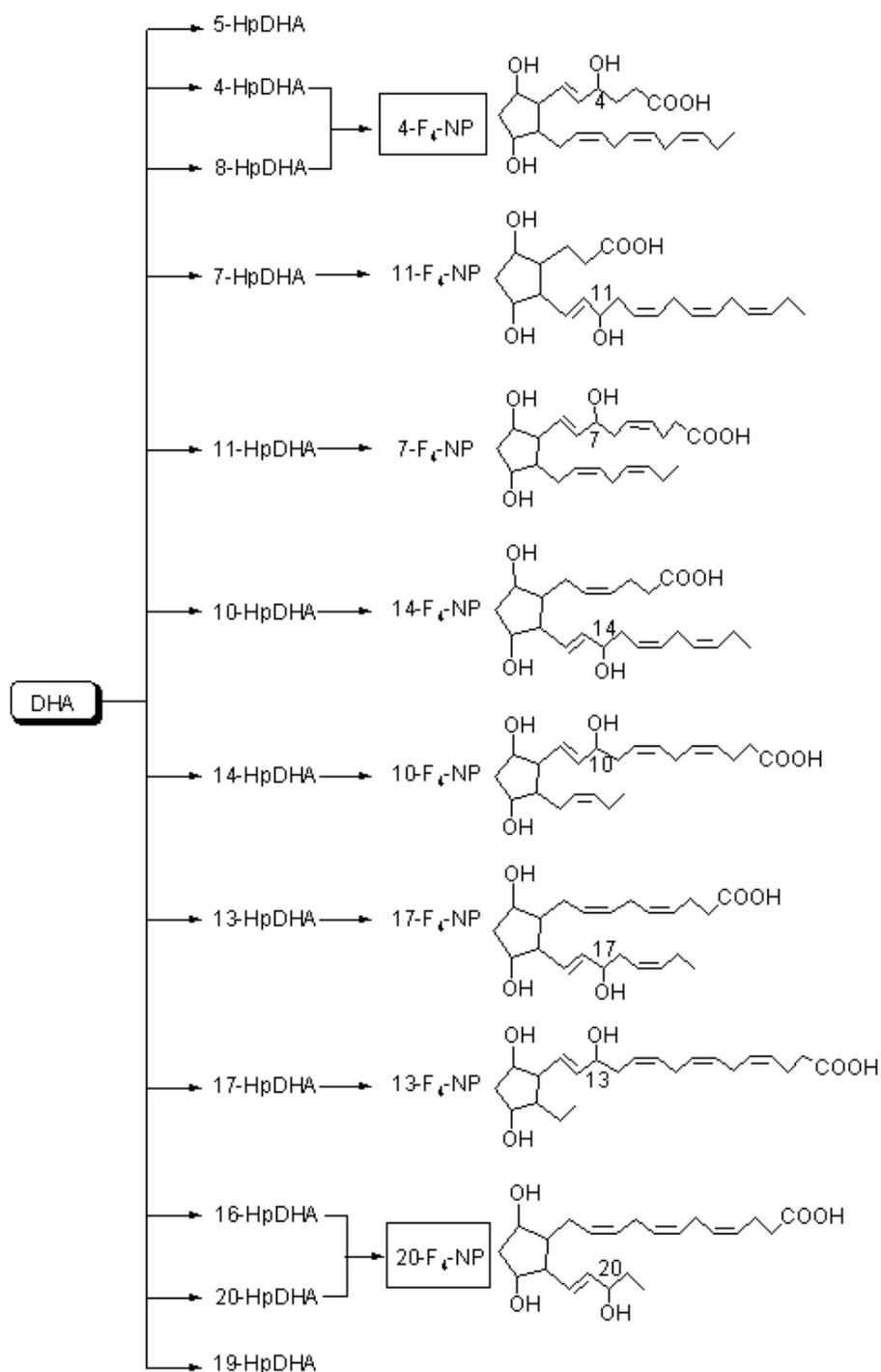


Figura 5: Esquema representativo dos hidroperóxidos derivados do DHA (4-, 7-, 8-, 10-, 11-, 13-, 14- e 16-, 17 e 20-HpDHA) e dos neuroprostano identificados *in vitro* e *in vivo* (4-F₄-NP, 11-F₄-NP, 7-F₄-NP(nPF_{4α}-V), 14-F₄-NP, 10-F₄-NP, 17-F₄-NP, 13-F₄-NP, 20-F₄-NP). A peroxidação do DHA leva à formação de oito possíveis grupos regioisoméricos de neuroprostano, sendo que há a hipótese de que as séries 4 e 20-F₄-NPs são geradas em maior quantidade. **Adaptado de YIN *et. al.*, 2005.**

1.2 Doenças neurodegenerativas x DHA

Doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (AD), de Parkinson (PD) e a Esclerose Lateral Amiotrófica (ALS) são caracterizadas pela perda de células neuronais específicas e tem como mecanismo comum a presença de agregados protéicos (ROSS e POIRIER, 2004). Com relação à forma, há vários tipos de agregados, incluindo agregados do tipo amorfo e do tipo amilóide, sendo este último o mais característico (ROSS e POIRIER, 2004). Os agregados do tipo amilóide caracterizam-se pela presença de fibrilas constituídas pelo empilhamento de folhas β paralelas. A presença dessas folhas β foi demonstrada para os agregados protéicos encontrados em AD e PD, constituídos respectivamente de peptídeos β -amilóide e de α -sinucleína. Até o momento não se sabe ao certo os mecanismos que disparam essa agregação, porém estudos recentes têm sugerido o envolvimento de fatores como o estresse oxidativo e também de lipídeos e seus produtos de oxidação nesse processo (JOMOVA *et. al.*, 2010; ZHAO *et. al.*, 2011).

Com relação aos lipídeos, alguns estudos têm mostrado uma diminuição no conteúdo de DHA em pacientes com AD (LUKIW *et. al.*, 2005; SODERBERG *et. al.*, 1991). Dentre estes estudos, LUKIW *et. al.*, 2005, observaram uma redução significativa de DHA em regiões específicas do cérebro, como o hipocampo, mantendo-se inalterado em outras regiões como cortex e o tálamo. Porém, não está claro se este declínio no conteúdo de DHA é um resultado das mudanças no metabolismo do ácido graxo ou pela modificação oxidativa do DHA (NOUROOZ-ZADEH *et. al.*, 1999). Como descrito anteriormente o DHA é bastante susceptível à oxidação e pode ser oxidado tanto enzimaticamente como não-enzimaticamente e estes processos podem ser responsáveis pelo consumo de DHA.

Outra característica comum a doenças neurodegenerativas é sua associação com a peroxidação lipídica (MONTINE e MORROW, 2005; MONTINE *et. al.*, 2002; BARNHAM *et. al.*, 2004; ARNESON e ROBERTS, 2007). Porém, a interpretação de experimentos que investigam a contribuição de produtos da peroxidação lipídica para patogênese de doenças é limitada pela falta de especificidade bioquímica (MONTINE e MORROW, 2005). Uma classe bastante estudada de produtos reativos é a dos aldeídos. Destes, os mais estudados são os gerados pela peroxidação do AA, como o 4-hidroxi-2-nonenal e do DHA, o 4-hidroxi-2-hexenal (ESTERBAUER *et. al.*, 1991; JOMOVA *et. al.*, 2010). Embora as consequências fisiopatológicas da superprodução de 4-hidroxi-2-nonenal e 4-hidroxi-2-hexenal ter sido destaque em diversos estudos, deve-se salientar que estes aldeídos reativos também são gerados em baixos níveis em todas as células e parecem ter um papel normal na sinalização fisiológica (FORMAN e DICKINSON, 2004).

1.2.1 Doença de Alzheimer (AD)

A Doença de Alzheimer (AD) é uma desordem neurodegenerativa progressiva caracterizada pelo acúmulo de peptídeos amiloidogênicos A β gerados pelo processamento da proteína precursora amilóide (APP) pela β - and α -secretase (JICHA e MARKESBERY, 2010; GRIMM *et. al.*, 2011). Na AD, uma terceira protease associada à membrana, γ -secretase, cliva a APP dentro da porção transmembrana da proteína. Esta clivagem combinada com a clivagem extracelular da APP pela β -secretase, que parece ser a enzima limitante nesta via degenerativa, libera o peptídeo tóxico A β na forma característica de 40 ou 42 aminoácidos (COLE e VASSAR, 2008; WILLEM *et. al.*, 2009). A liberação de fragmentos tóxicos de A β levam a formação inicial de agregados diméricos e oligoméricos solúveis (JICHA e

MARKESBERY, 2010). Uma agregação adicional leva a formação de complexos macromoleculares insolúveis que se depositam no meio extracelular do parênquima do cérebro para formar placas amilóides, um biomarcador patológico chave da AD. A combinação dos efeitos tóxicos de ambos, os agregados iniciais oligoméricos e o depósito de placas A β insolúveis leva a um rompimento neuronal e a uma morte celular eventual, que por sua vez é responsável pelo declínio cognitivo irreversível encontrado na AD (JICHA e MARKESBERY, 2010; GRIMM *et. al.*, 2011).

A riqueza dos dados coletados a partir de ensaios *in vitro*, em cultura celular e modelos de animais transgênicos para AD suportam uma associação direta de PUFAs ômega-3, principalmente DHA, com o processamento amilóide no cérebro (JICHA e MARKESBERY, 2010). PUFAs ômega-3 como componentes integrais de membrana podem agir para alterar o processamento amiloidogênico de várias maneiras distintas incluindo: a) facilitar a interação de α -secretase com APP para produzir fragmentos não-tóxicos e evitar a formação de A β , b) proteger a seqüência de reconhecimento e sítio de clivagem intramembrana essencial para γ -secretase, c) servir como um local dissipador para os radicais livres reduzindo, assim, a atividade enzimática da γ -secretase, uma vez que pode ser induzida por danos causados pelos radicais livres para o complexo de proteínas, o que é importante para a regulação da função normal γ -secretase; d) inibir diretamente a fibrilação e formação de espécies oligoméricas de A β (JICHA e MARKESBERY, 2010).

Muitos estudos epidemiológicos mostraram uma relação inversa entre ingestão de ômega-3 e incidência de AD, considerando que estudos clínicos encontraram pouco ou nenhum efeito pronunciado no estágio inicial da doença. Esses dados indicam que o DHA pode ter um efeito mais eficaz para prevenção do que para o tratamento dessa doença (GRIMM *et. al.*, 2011).

Estudos com cultura celular demonstraram consistentemente uma redução de 20% da produção de A β depois do tratamento com o DHA (JICHA e MARKESBERY, 2010; LUKIW e BAZAN, 2008; OKSMAN *et. al.*, 2006). As atividades de ambas β - and γ -secretase estava diminuída quando essas culturas celulares foram tratadas com DHA, o que está de acordo com os níveis reduzidos de A β (JICHA e MARKESBERY, 2010; GRIMM *et. al.*, 2011). Esses efeitos parecem estar diretamente relacionados com a composição de lipid rafts na membrana, sendo uma das propostas de um grupo de pesquisadores (GRIMM *et. al.*, 2011) que o DHA reduz a geração de A β deslocando o colesterol para fora dos lipids rafts, reduzindo assim, a atividade enzimática responsável pelo processamento amiloidogênico da APP (GRIMM *et. al.*, 2011).

1.2.2 Doença de Parkinson (PD)

A Doença de Parkinson (PD) é a desordem de movimento mais comum, afetando mais que 1% da população acima de 65 anos de idade (BROERSEN *et. al.*, 2006). A maior parte dos casos ocorre esporadicamente com o avanço da idade, sendo um importante fator de risco (BROERSEN *et. al.*, 2006). É caracterizada pela perda progressiva de neurônios dopaminérgicos e a deposição de corpos de inclusão intracelular na forma de corpos de Lewy e neuritos de Lewy (BROERSEN *et. al.*, 2006; KARUBE *et. al.*, 2008; SPILLANTINI *et. al.*, 1997). O principal componente protéico desses depósitos é a α -sinucleína (SPILLANTINI *et. al.*, 1997). A α -sinucleína é uma proteína desdobrada caracterizada por sete repetições (KTKEGV) na região N-terminal; por uma região central hidrofóbica formada por resíduos 61-65 (componente não- β -amilóide); e por trechos acídicos na parte C-terminal (De FRANCESCHI *et. al.*, 2009).

Alguns estudos reportam que α -sinucleína pode interagir com ácidos graxos poliinsaturados, cuja interação promoveria a oligomerização da proteína (BROERSEN *et. al.*, 2006; KARUBE *et. al.*, 2008; De FRANCESCHI *et. al.*, 2009; ISRAELI e SHARON, 2009). Os níveis de DHA mostraram-se elevados nas áreas do cérebro contendo α -sinucleína em pacientes com PD, o que atraiu o interesse no estudo da interação entre DHA e α -sinucleína (De FRANCESCHI *et. al.*, 2009; SHARON *et. al.*, 2003). De FRANCHESCHI *et. al.*, 2009, mostraram que α -sinucleína interage com o DHA adquirindo uma conformação α -helicoidal e o estado físico do lipídio torna-se alterado. Especificamente, métodos biofísicos e microscopia eletrônica indicaram que o DHA forma gotículas de óleo na presença da α -sinucleína. Experimentos de proteólise limitada mostrou que, quando a proteína está ligada a essas gotículas de óleo, inicialmente é clivada na região de 89-102, sugerindo que este segmento da cadeia é suficientemente flexível para ser desdobrado ou protease-sensível. Eventos proteolíticos subseqüentes produzem fragmentos correspondentes aos primeiros 70-80 resíduos que ficam estruturados e mostram uma elevada afinidade pelos lipídios. O fato de que uma região da cadeia polipeptídica permanece acessível a proteases, quando interage com os lipídios, sugere que esta região poderia estar envolvida em outras interações, justificando a propensão ambivalente de α -sinucleína para dobrar ou agregar na presença de DHA. Outro grupo de pesquisadores (BROERSEN *et. al.*, 2006) também buscou explicar a interação entre α -sinucleína e DHA. Estes mostraram que a α -sinucleína faz com que o DHA esteja na forma de um polímero solúvel em vez de uma forma micelar. Após a interação com DHA, a α -sinucleína que normalmente está desestruturada, rapidamente adota uma conformação α -helicoidal. A exposição

prolongada ao DHA, no entanto, gradualmente converte a α -sinucleína em fibras do tipo amilóide (BROERSEN *et. al.*, 2006).

Assim como para doença de Alzheimer, várias linhas de evidência sugerem um papel importante para o estresse oxidativo e a PD (CHINTA E ANDERSEN, 2008). Neurônios dopaminérgicos (DA) são particularmente propensos ao estresse oxidativo devido ao metabolismo dos DA e auto-oxidação combinado com o aumento de ferro, níveis diminuídos de glutathiona total e produção de ROS induzida pela inibição do complexo I mitocondrial induzida no sistema nervoso que pode levar à morte celular por exceder a capacidade oxidativa na região das células contendo DA (CHINTA e ANDERSEN, 2008).

1.2.3 Esclerose lateral amiotrófica (ELA)

O foco desse estudo foi avaliar a participação do ácido graxo poliinsaturado, o ácido docosahexaenoico e seus produtos primários de oxidação, na doença neurodegenerativa Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), portanto uma revisão bibliográfica mais detalhada será feita para esta doença.

ELA é uma doença neurodegenerativa progressiva e devastadora que é também conhecida como doença de Lou Gehrig, descrita pela primeira vez pelo neurologista francês Jean Martin Charcot em 1869 (VUCIC E KIERNAN, 2009), resulta na degeneração dos neurônios motores no cérebro e medula espinhal, paralisia e morte dentro de 2-5 anos do diagnóstico (TRUMBULL e BECKMAN, 2009). A cada ano, cinco mil pessoas são diagnosticadas com ELA nos EUA, sendo o começo da doença aproximadamente entre os 45 e 60 anos, com a prevalência (proporção de indivíduos afetados na população) de 4-6/100.000 (BOILLÉE *et. al.*, 2006; TRUMBULL e BECKMAN, 2009). No Brasil, em um trabalho preliminar

realizado pela Associação Brasileira de Esclerose Lateral Amiotrófica (AbrELA), foram catalogados 540 pacientes com ELA, sendo 58% do sexo masculino. A idade média de aparecimento dos primeiros sintomas foi de 52 anos. Estima-se que a incidência em nosso país seja de 1,5 casos/100.000 pessoas, ou seja, 2.500 pacientes/ano (www.tudosobreela.com.br). É geralmente descrita como uma doença multifatorial, estando envolvidos estresse oxidativo, dano mitocondrial, excitotoxicidade do glutamato, agregação de proteínas e diminuição do transporte axonal (BENDOTTI e CARRI, 2009). Hoje, existe somente um medicamento aprovado, o Riluzol (Rilutek[®] Sanofi Aventis). Este medicamento, apesar de o mecanismo de ação não estar esclarecido, é proposto para atuar inibindo os processos relacionados ao glutamato (excitotoxicidade) (www.tudosobreela.com.br). Na maioria dos casos da doença (80-90%), apresenta-se na sua forma esporádica (sem antecedentes familiares, sem causa genética), enquanto 10% dos casos tem a forma familiar (ELAf) (BOILLÉE *et. al.*, 2006). Recentemente, mutações em alguns genes que codificam para proteínas ligadoras de RNA e para SOD1 estão sendo relacionados com a ELAf. De 5-10% destes casos estão sendo relacionados a mutações em duas proteínas, são elas: 43 kDa *transactive response TAR DNA-binding protein-43* (TDP-43) e *fused in sarcoma* (FUS; também conhecida como *TLS- translocated in liposarcoma*) (WANG *et. al.*, 2011; COUTHOUIS *et. al.*, 2012; STEINACKER *et. al.*, 2011). Estas proteínas dividem elementos estruturais relacionados, sugerindo que elas têm papéis ligados ao processamento ou regulação do RNA. Além disso, ambas as proteínas foram identificadas como componentes de agregados patológicos em neurônios de pacientes com ELA (COUTHOUIS *et. al.*, 2012). Cada uma das mutações em TDP-43 e FUS estão associadas com 5% dos casos de ELAf, o que indica que anormalidades nestes dois

genes coletivamente atingem os 10-20% de prevalência das variantes em SOD1 entre os indivíduos com ELAf (BOSCO *et. al.*, 2010).

1.2.3.1 Esclerose lateral amiotrófica (ELA) e SOD1

Sabe-se que 20% dos casos familiares da Esclerose Lateral Amiotrófica é causada por mutações no gene que codifica a enzima antioxidante, Cu, Zn superóxido dismutase (SOD1) (BANCI *et. al.*, 2008; VALENTINE *et. al.*, 2005). A enzima Cu, Zn superóxido dismutase (SOD1) está presente na maior parte dos organismos aeróbicos. Ela catalisa a reação de dismutação do ânion radical superóxido: $O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$ (FRIDOVICH, 1978). As células eucarióticas contêm duas formas distintas de SOD, a enzima mitocondrial contendo manganês e a enzima citoplasmática contendo Cu/Zn (SOD1) (LEVANON *et. al.*, 1985). A enzima SOD1 humana selvagem é excepcionalmente estável, uma proteína homodimérica de 32 kDa, localizada principalmente no citoplasma, mas também está presente nos peroxissomos, no espaço intermembranas da mitocôndria e no núcleo de células eucarióticas (Figura 6) (OKADO-MATSUMOTO e FRIDOVICH, 2001; STURTZ *et. al.*, 2001.; ROBERTS *et. al.*, 2007).

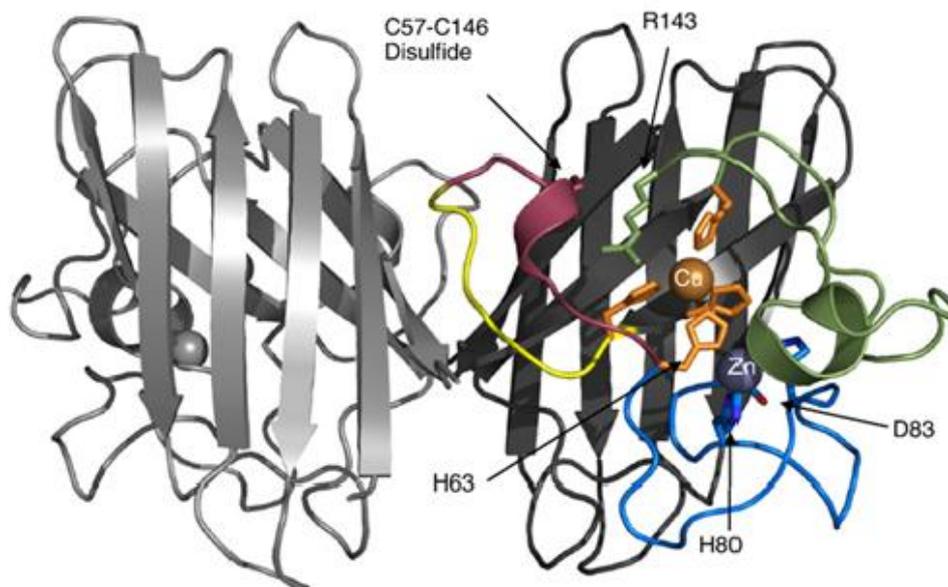


Figura 6. Figura representando a wild-type Cu, Zn-SOD. Cobre (laranja) e zinco (azul) estão representados como esferas na subunidade do lado direito da figura. Em roxo está representado a ponte dissulfeto intramolecular Cys57-Cys146 que ajuda a formar a interface do dímero da SOD1. O cobre é coordenado pelos resíduos His63, His46, His48 e His120. **Adaptada de ROBERTS, 2007.**

Cada subunidade do dímero liga um cobre e um zinco e se dobra como oito fitas barril β que são estabilizadas por uma ponte dissulfeto intrasubunidade (Cys 57, Cys 146) próximo ao sítio ativo (VALENTINE *et. al.*, 2005; BANCI *et. al.*, 2009). Além das duas cisteínas envolvidas na formação da ponte dissulfeto intramolecular, duas cisteínas reduzidas, a Cys 6 e a Cys 111, estão localizadas na fita β 1 e no loop VI da SOD1 WT humana, respectivamente (Figura 7). Além dos loops conectando as oito fitas β , dois tem papel estrutural e funcional. O loop eletrostático (loop VII, resíduos 121–144) contém resíduos carregados que contribuem para guiar o substrato (ânion radical superóxido) negativamente carregado para o sítio catalítico contendo cobre. O longo loop de zinco (loop IV, resíduos 49–84) contém todos os resíduos ligados ao zinco (VALENTINE *et. al.*, 2005).

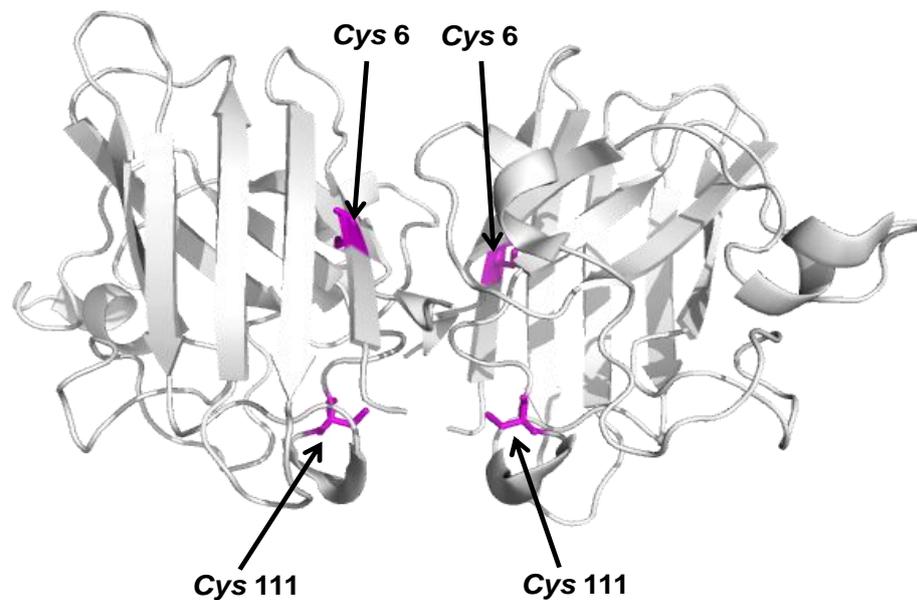


Figura 7. Figura representando a wild-type Cu, Zn-SOD. Em roxo estão representadas as duas cisteínas reduzidas, a Cys 6 e a Cys 111, localizadas na fita β 1 e no loop VI, respectivamente.

Mais de 190 mutações já são descritas, no entanto, os mecanismos moleculares da degeneração seletiva dos neurônios motores por SOD1 mutante em ELAf ainda são desconhecidos. A mutação resulta em um ganho de função tóxica, que alguns estudos sugerem poder estar relacionada ao efeito pró-oxidante da mutante SOD1 e / ou à formação de agregados citotóxicos de SOD1 (VALENTINE *et. al.*, 2005; RAKHIT *et. al.*, 2002; KIM *et. al.*, 2005). Os eventos estruturais que levam à formação de oligômeros de alto peso molecular de SOD1 ainda são incertos (BANCI *et. al.*, 2008; KARUBE *et. al.*, 2008). Alguns estudos sugerem que a SOD1 WT oxidada e várias das suas mutantes, somente formam oligômeros solúveis, *in vitro*, quando estão na forma livre de metais (apo) (BANCI *et. al.*, 2008). Estes oligômeros seriam formados sob condições aeróbicas quando as proteínas são mantidas a 37 °C e em concentração e pH próximos ao fisiológico, ou seja, de 100 μ M e pH 7. Estes oligômeros resultantes são formados por pontes dissulfeto covalentes intermoleculares, envolvendo as cisteínas 6 e 111, e por interações não covalentes entre folhas β , formando estruturas do tipo β amiloide. A taxa de

oligomerização proteica é diferente para as várias mutantes, mas eventualmente geram o mesmo tipo de espécies oligoméricas solúveis (BANCI *et. al.*, 2008; BANCI *et. al.*, 2009).

Estudo realizado por KIM *et. al.*, 2005 mostrou que há indução da agregação de SOD1 na presença de ácidos graxos poli-insaturados. Esses agregados de alta massa molecular tem uma morfologia granular e apresenta citotoxicidade significativa (KIM *et. al.*, 2005). Os lipídios servem como mediadores na sinalização e inflamação durante a progressão da neurodegeneração. Embora a SOD1 esteja frequentemente em contato com lipídios, as interações com SOD1 não tem sido investigadas na mesma intensidade quando comparadas com outras proteínas ligadas a outras doenças (De FRANCESCHI *et. al.*, 2009; KARUBE *et. al.*, 2008; CHOI *et. al.*, 2010; BROERSEN *et. al.*, 2006; MÜNCH *et. al.*, 2011).

2 Objetivos

Considerando que há o envolvimento de agregados protéicos nas doenças neurodegenerativas e que os lipídios podem estar envolvidos neste processo, o estudo do DHA e dos respectivos produtos de oxidação, como os DHAOOH, na formação de agregados de SOD1 torna-se importante.

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do DHA e dos DHAOOH na oligomerização de SOD1 envolvidos na doença Esclerose Lateral Amiotrófica.

Para atingir este objetivo o trabalho teve como metas realizar a síntese de hidroperóxidos de DHA, estudar o papel dos DHAOOH e do DHA na formação dos agregados de SOD1 *in vitro* e, finalmente, investigar os possíveis mecanismos envolvidos na formação dos agregados.

3 Materiais e Métodos

3.1 Reagentes e materiais

Meio de cultura Luria Broth (meio LB) obtido da BD, Complete Mini, EDTA-free obtido da Roche. Os plasmídios pET-3d foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Ohara Augusto. O ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA), isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), endonuclease (Benzonase) ditioneitol (DTT), tris(hidroximetil)aminometano (Tris), ácido docosaheptaenoico (DHA) peróxido de hidrogênio, 4-hidroxi-2,2,6,6-tetra-metil-piperidiniloxila (Tempol), 4-(2-Piridilazo) resorcinol (PAR), ampicilina, bis-acrilamida, coomassie brilliant blue, formaldeído 37%, cloreto de sódio, cloreto de cobre, cloreto de zinco, bicarbonato de sódio, sulfato de amônio, fosfato de sódio monobásico, fosfato de sódio dibásico, guanidina, acetato de sódio, tiosulfato de sódio, carbonato de sódio, dodecilsulfato de sódio (SDS), persulfato de amônio, tioflavina S e resina Chelex-100 foram obtidos da Sigma. Ácido acético, etanol, metanol, clorofórmio, ácido fórmico, ágar foram obtidos da J.T. Baker (todos os solventes eram nível de HPLC). O iodoacetato de sódio obtido da Merck. O bis-ANS e a iodoacetamida fluoresceína foram obtidos da Molecular Probe. Azul de bromofenol e tetrametiletilenodiamina (TEMED), marcador de peso molecular Kaleidoscope, glicerol, glicina, acrilamida foram obtidos da Bio-Rad. Tripsina grau sequenciamento foi obtida da Promega e cloranfenicol foram obtidos da USB. Colunas de cromatografia de troca aniônica QSepharose e MonoQ, de interação hidrofóbica Phenyl-Sepharose foram obtidas da Amersham Biosciences. Coluna de fase reversa C18, exclusão por tamanho para HPLC foram obtidas da Phenomenex. Membrana de diálise com corte de peso molecular de 6-8 kDa foi obtida da Spectrum.

Dispositivo de ultrafiltração com corte de peso molecular de 10 kDa foi obtido da Millipore. A água utilizada em todos os experimentos foi deionizada num sistema de purificação Milli-Q da Millipore.

3.2 Síntese dos hidroperóxidos do ácido docosahexaenóico (DHAOOH)

A síntese dos DHAOOH foi realizada por reação de fotossensibilização acrescentando-se 4 µL de uma solução de azul de metileno (0,1 M em metanol) a 25 mg de ácido docosahexaenóico dissolvido em 4 mL de clorofórmio (~20 mM). A reação foi conduzida em um balão (pyrex, 25 mL) imerso em banho de gelo. A mistura foi mantida sob constante agitação, saturada com oxigênio e irradiada com duas lâmpadas de tungstênio (500 W) por aproximadamente 2 h. Para maior rendimento na formação de hidroperóxidos, após 2 h foi adicionado mais 2 µL de azul de metileno à mistura. A formação de DHAOOH foi monitorada a partir de alíquotas retiradas em tempos 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 e 180 min, medindo-se as absorvâncias das soluções no UV a 235 nm e por cromatografia de camada delgada (TLC) em placas de sílica eluídas com uma mistura de clorofórmio:metanol (90:6, v/v). A visualização dos hidroperóxidos nas placas foi realizada utilizando uma solução de ácido sulfúrico 50% (MIYAMOTO *et. al.*, 2003).

3.3 Separação e purificação de DHAOOH por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Uma alíquota de 10 μL foi retirada da amostra de DHA fotooxidado (20 mM) solubilizado em clorofórmio, em seguida secou-se sob nitrogênio e solubilizou-se em 100 μL de metanol. Para análise de DHAOOH foram otimizadas as condições descritas por LYBERG e ADLERCREUTZ, 2006. As amostras foram separadas e purificadas em coluna C18 Gemini (250 x 4.6 mm, 5 μm , Phenomenex, USA) utilizando-se como fase móvel uma mistura de acetonitrila:ácido fórmico 0,005% (55:45, v/v) em fluxo de 1 mL/minuto. O detector de UV foi programado para detecção no comprimento de onda de 235 nm para detecção de dienos conjugados e 205 nm para detecção dos dienos não conjugados (SPD-10AVVP, Shimadzu, Japão). Após separação dos componentes da amostra (di, tri e mono-hidroperóxidos do DHA) (Figura 10), realizou-se a purificação da mistura de DHAOOH (Figura 10, tempos ~ 30 a 60 min) utilizando-se um coletor de frações (FRC-10A, Shimadzu, Japão). A fração contendo a mistura dos isômeros foi seca em um rota-evaporador (R-215, Büchi, Suíça) em seguida, ressuspensa em 1 mL de metanol e estocada a -20°C .

3.4 Quantificação de DHAOOH

A quantificação dos hidroperóxidos foi realizada através da medida da absorvância dos dienos conjugados e calculada a partir do coeficiente de extinção ($\epsilon_{234\text{nm}} = 25200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (WU E RAO, 1999). A concentração dos hidroperóxidos também foi determinada pelo método iodométrico (BUEGE e AUST, 1978).

3.5 Análise de DHAOOH por HPLC acoplado à espectrometria de massa em tandem (HPLC-MS/MS)

A análise estrutural dos hidroperóxidos foi realizada por HPLC acoplado a um detector de absorvância UV-Vis (SPD-10AVVP, Shimadzu, Tokyo, Japão) e a um espectrômetro de massa Quattro II da Micromass (Manchester, Reino Unido) em tandem (HPLC-MS/MS). A separação e análise dos hidroperóxidos em HPLC-MS/MS foi realizada em coluna C18 Gemini (250 x 4.6 mm, 5 µm, Phenomenex, USA) utilizando-se como fase móvel uma mistura de acetonitrila:ácido fórmico 0,005% (55:45, v/v). A detecção dos produtos no espectrômetro de massa foi feita no modo de ionização química electrospray negativa (ES-). Para a análise no espectrômetro de massa utilizaram-se as seguintes condições: temperatura de dessolvatação 200°C; temperatura da fonte 100°C, voltagem 30 V.

3.6 Expressão da Cu, Zn superóxido dismutase humana (hSOD1) recombinante em bactérias

Os plasmídios pET-3d que codificam as enzimas hSOD1 nativa ou mutante G93A e as respectivas mutantes na cisteína (C6S, C111S), foram expressos em *Escherichia coli* da linhagem BL21(DE3)pLysS segundo protocolo descrito por MEDINAS *et. al* (2010). As bactérias foram transformadas por eletroporação e selecionadas por incubação a 37°C durante a noite em ágar/LB contendo 100 µg/mL de ampicilina e 34 µg/mL de cloranfenicol. Uma colônia da placa foi selecionada e cultivada em meio LB a 37°C. A expressão foi induzida a partir da adição de 0,5 mM de IPTG e 0,5 mM de cloreto de cobre após ser atingida a fase logarítmica de

crescimento da cultura (D.O. 0,6-1,0). Após 6 h de expressão a 25°C, a cultura foi centrifugada a 3000g e o pellet armazenado a -20°C.

3.7 Purificação da hSOD1 recombinante

Para cada litro de cultivo foi utilizado 20 mL de tampão 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 contendo 10 mM de NaCl, 2 mM de MgCl₂ e 1 tablete Complete Mini, EDTA-free para ressuspender o pellet, em seguida, foi submetido a três ciclos consecutivos de congelamento e descongelamento. Esse homogenato foi tratado com 1 mg/mL de lisozima à temperatura ambiente. Após 1h da adição de lisozima, foram adicionadas 10 U/mL de Benzonase (endonuclease capaz de digerir DNA e RNA), seguido de incubação por mais 30min à temperatura ambiente para redução da viscosidade. O homogenato foi centrifugado a 18000g. Ao sobrenadante foram adicionados 0,5 mM de cloreto de cobre e cloreto de zinco, seguido de incubação durante a noite a 4°C. O extrato de aspecto azulado foi então submetido a uma etapa de precipitação térmica por 30 minutos a 65°C. O precipitado foi removido por centrifugação a 18000g e o volume do sobrenadante foi medido e submetido lentamente à precipitação com sulfato de amônio. Primeiramente, foi adicionado sulfato de amônio para 50% de saturação. Em seguida, foi incubado durante 2 h a temperatura ambiente e a suspensão submetida à centrifugação a 18000g. O mesmo procedimento foi realizado para 60% de saturação e para 100% de saturação. O pellet azulado obtido foi dissolvido em 4 mL de tampão 5 mM fosfato, pH 8,0. A solução contendo a enzima hSOD1 recombinante foi, então, dialisada contra tampão 5 mM fosfato, pH 8,0 e submetida à cromatografia de troca aniônica em coluna MonoQ (Amersham Bioscience). A eluição da proteína foi feita aplicando-se um

gradiente de tampão fosfato de 5-200 mM, pH 8,0. As frações contendo a hSOD1 foram coletadas e adicionou-se sulfato de amônio sólido na amostra até a concentração final de 2,7 M. Em seguida, a amostra foi aplicada em uma coluna de interação hidrofóbica equilibrada com tampão 5 mM fosfato, pH 8,0 contendo 2,5 M de sulfato de amônio. A eluição da proteína foi feita aplicando-se um gradiente linear de maneira a eliminar o sulfato de amônio. Finalmente, a proteína foi lavada repetidamente e concentrada por ultrafiltração em filtros de corte de 30 KDa (Amicon Ultra-Centrifugal Filter) em tampão fosfato 5 mM, pH 7,4 tratado com Chelex-100.

3.8 Mutações sítio-dirigido em SOD1 humana (hSOD1)

As mutações foram realizadas em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto (IB-USP), utilizando o kit QuikChange® Site-Directed Mutagenesis (Stratagene). Foram sintetizados dois oligonucleotídeos (cada um complementar a sua fita oposta) contendo a mutação de interesse (Tabela 1).

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para a construção de mutantes de SOD1.

SOD1	Sentido	Sequência (5' → 3')
C6S	<i>Foward</i>	ACTAAAGCTGTGTTCTGCTGAAGGGCGAC
	<i>Reverse</i>	GTCGCCCTTCAGCACGAACACAGCTTTAGT
C111S	<i>Foward</i>	TCTCAGGAGACCATTCCATCATTGGCCGCA
	<i>Reverse</i>	TGCGGCCAATGATGGAATGGTCTCCTGAGA

A polimerase presente no kit (*PfuTurbo*®) é capaz de estender ambas as fitas de um plasmídeo contendo o inserto de interesse com alta fidelidade e processividade. Através da extensão dos *primers* gera-se um plasmídeo mutante. Dessa forma, as mutantes foram geradas utilizando como molde os vetores de expressão com os respectivos genes selvagens e com a mutação G93A clonados.

As mutações foram realizadas utilizando o protocolo padrão do Kit QuikChange Site-directed Mutagenesis (Stratagene, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, Califórnia, USA) e os *primers* contendo a mutação de interesse. Em 50 μ L de reação adicionou-se 30 ng do vetor molde (pET-3d), 12.5 pmol de cada oligonucleotídeo, 200 μ M de dNTPs e 2.5 U de Pfu Turbo polimerase. Após a amplificação e a digestão do DNA molde com *DpnI* (endonuclease que somente reconhece a fita parental metilada digerindo-a), os produtos de mutagênese foram transformados em células XL1-Blue por eletroporação e plaqueadas em meio sólido seletivo LB/Amp. As colônias resultantes foram selecionadas para confirmação do inserto por reação de PCR e a amplificação foi feita utilizando-se *primers* T7 que flanqueiam a região de interesse no vetor (pET-3d). Em seguida, as colônias no qual o inserto foi confirmado, foram crescidas em meio líquido LB/Amp. A região codificante do vetor isolado foi sequenciada para verificação da geração das mutações e os vetores com as respectivas mutações confirmadas foram transformados em linhagens de *E. coli* de expressão BL21(DE3)pLysS.

3.9 Preparo das formas apo

As formas apo-SOD1 foram preparadas a partir de diálises repetidas das SOD1s (WT e G93A) contra: 1) tampão 50 mM acetato, pH 3,8 contendo 10 mM de EDTA, 2) tampão 50 mM acetato, pH 3,8 contendo 100 mM NaCl para remover o EDTA 3) finalmente, o tampão é removido por diálise contra água grau Milli-Q tratada com a resina Chelex-100 para eliminar traços de metais de transição (BENOV *et. al.*, 1996). Para avaliar a remoção dos metais, foi feita análise em Espectrometria de Emissão Atômica (ICP-AES).

3.10 Oligomerização/agregação da hSOD1 mediada por diferentes ácidos graxos *in vitro*

Apo-SOD1 WT e/ou G93A foi dissolvida em 50 mM de tampão fosfato contendo 150 mM NaCl e 100 μ M de DTPA. Os oligômeros foram preparados incubando a forma apo-SOD1 WT (10 μ M) ou G93A (10 μ M) por 2, 6 ou 24 h, 37°C, pH 7,4 contendo 250 μ M de ácido esteárico ou ácido oléico, ácido linoléico, ácido araquidônico, DHA, DHAOOH ou H₂O₂.

3.11 SDS-PAGE

Para detecção dos oligômeros formados a partir do DHA e DHAOOH e para análise de dose-dependência, foi feito SDS-PAGE sob condições redutoras (adição de β -mercaptoetanol) e não-redutoras (sem adição de β -mercaptoetanol) em uma proporção de gel de poliacrilamida de 12%. Alíquotas das amostras (20 μ L) contendo oligômeros de apo-SOD1 WT (10 μ M) ou apo-SOD1 G93A (10 μ M), após 24 h foram, ainda, incubadas por 1 h com 50 mM de NaIAc. Em seguida, foram incubadas em tampão de amostra (62 mM Tris-HCl, pH 6,8 contendo 10% glicerol, 2% SDS, 0,01% azul de bromofenol) na ausência e presença de β -mercaptoetanol (~200 mM) por 15 minutos em água a 37°C. A revelação foi feita com nitrato de prata.

3.12 Cromatografia de exclusão

A cromatografia de exclusão foi realizada utilizando-se uma coluna (BioSep-SEC-S4000, 300 x 7.8mm, Phenomenex, USA). Para determinação do tamanho dos

agregados de SOD1 foi feita uma curva padrão, utilizando-se como padrões de proteína a tireoglobulina (660kDa), ferritina (440 kDa), aldolase (158 kDa), conalbumina (75kDa) e ovoalbumina (43 kDa).

Cada amostra foi eluída com uma solução tampão 50 mM fosfato, pH 7.4 contendo 150 mM de NaCl e 100 μ M de DTPA. O detector de UV foi programado para detecção das proteínas no comprimento de onda de 210 nm e 280 nm. Também, utilizou-se o detector de fluorescência com comprimento de onda de excitação de 280 nm e emissão de 340 nm.

3.13 Dependência de tiol na oligomerização da SOD1 induzida por DHA

Foi feita uma pré-incubação da apo-SOD1 WT (10 μ M) a 37°C em tampão fosfato 50 mM, pH 7.4, contendo 150 mM de NaCl e 100 μ M de DTPA com NaIAC (300 μ M). Após 2 h foi adicionado DHA (250 μ M) e incubado à mesma temperatura até completar 24 h. O mesmo foi feito com a hapo-SOD1 WT (10 μ M) após pré-incubação com H₂O₂ (250 μ M). Estas amostras foram analisadas por cromatografia de exclusão, sendo o volume de injeção de 30 μ L.

3.14 Análise dos tióis livres na apo-SOD WT e apo-SOD G93A

Após 24 h de incubação das formas apo da proteína (10 μ M) com DHA (250 μ M), uma solução estoque de IAF (10 mM) foi preparada em DMSO e adicionada à reação para uma concentração final de 200 μ M. As proteínas foram incubadas no escuro a 37°C por 1 h, na presença de SDS (1%). Todos os passos seguintes foram realizados sob exposição mínima das amostras a luz. Para remover o excesso de

IAF, as amostras foram dialisadas por filtração (Amicon, 10,000 MWCO) contra água. Em seguida, as proteínas (5 µg) foram solubilizadas em tampão de amostra (Tris-HCl 62 mM, pH 6,8, contendo glicerol (10%), SDS (2%), β-mercaptoetanol (100 mM) e azul de bromofenol (0,01%), fervidas por 5 min e submetidos à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (5% gel de empacotamento; 12% gel de resolução) a 150 V por 2 h. A imagem das proteínas fluorescentes no gel foi capturada no instrumento Typhoon 9400 com comprimento de onda de excitação de 488 nm e filtro de emissão de 520 nm. A análise de densitometria relativa das colunas foi realizada com o programa ImageJ 1.44p (NIH, USA). Então, o gel foi fixado com etanol (30%) e ácido acético (10%) por 30 min, seguido pela coloração por prata para dosagem do conteúdo total de proteína. Em seguida, o gel foi submetido à análise de densitometria de bandas. Os níveis de proteínas contendo tióis reduzidos foram expressos relativamente ao conteúdo total de proteína.

3.15 Ensaio de fluorescência para análise da formação de estruturas do tipo β-amilóide e ambiente hidrofóbico

A formação de estrutura do tipo amilóide foi monitorada seguindo o aumento da fluorescência da probe Tioflavina S e pelo aumento na fluorescência da probe bis-ANS, indicando ambientes hidrofóbicos (MUSCI *et. al*, 1985). Após 24 horas, uma alíquota de 60 µL de cada incubação foi incubada com 12 µL de bis-ANS (60 µM) ou Tioflavina S (600 µM) por 15 minutos em água a 37°C. O espectro de fluorescência foi obtido por um leitor de placas (TECAN). Foi realizada uma excitação em 390 nm medindo-se a emissão em 400-600 nm e uma excitação em

442 nm medindo-se a emissão em 450-650 nm, para bis-ANS e Tioflavina S, respectivamente.

3.16 Dicroísmo circular (CD)

Foi feita uma incubação de apo-SOD1 WT (10 μ M) e apo-SOD1 WT (10 μ M) a 37°C em tampão fosfato 50 mM, pH 7.4, contendo 150 mM de NaCl e 100 μ M de DTPA, na ausência e presença de DHA (250 μ M). Após 24 h de incubação, as amostras foram lavadas repetidamente e concentradas por ultrafiltração em filtros de corte de 30 KDa (Amicon Ultra-Centrifugal Filter). As estruturas secundárias das proteínas foram examinadas no laboratório de espectroscopias e calorimetria (LEC, Campinas), utilizando-se da espectroscopia de dicroísmo circular (CD) (espectropolarímetro Jasco J-815, USA). Para as medidas foi utilizada uma cubeta de quartzo de 1 mm e o espectro de CD foi registrado de 200 a 260 nm. Todas as medidas foram realizadas usando os parâmetros seguintes: bandwidth de 1 nm, run speed de 50nm/min, 0,1 nm de step size, response time de 1 s e uma média de 3 acúmulos. Os dados foram analisados no programa PETFIT Analysis.

3.17 Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV)

Apo-SOD1 WT e/ou G93A foram dissolvidas em 50 mM de tampão fosfato contendo 150 mM NaCl e 100 μ M de DTPA. Os oligômeros foram preparados incubando a forma apo-SOD1 WT (10 μ M) ou G93A(10 μ M) por 24 h, 37°C, pH 7,4 contendo 250 μ M de DHA. Em seguida, as incubações foram lavadas repetidamente e concentradas por ultrafiltração em filtros de corte de 30 KDa (Amicon Ultra-

Centrifugal Filter). As amostras (alíquotas de 10 μ L) foram aplicadas em bases de latão e secas rapidamente em estufa antes da análise. A microscopia eletrônica de varredura foi usada para caracterizar a morfologia dos agregados de SOD1, sendo utilizado equipamento JSM-7401F (JEOL), operado a 2 KV. Este experimento foi realizado na Central Analítica, Instituto de Química-USP.

3.18 Efeito da conformação *cis* e *trans* na oligomerização das formas hapo-SOD1 WT e hapo-SOD1 G93A

Visando analisar a dependência e o efeito da conformação *cis* ou *trans* do ácido graxo na agregação de SOD1, incubações de apo-SOD1 WT (10 μ M) e apo-SOD1 G93A (10 μ M) foram feitas com ácido oléico (*cis*-9 -18:1) (250 μ M) e com o ácido elaídico (*trans*-9 -18:1) (250 μ M). As incubações foram analisadas por cromatografia de exclusão utilizando uma coluna (BioSep-SEC-S4000, 300 x 7.8mm, Phenomenex, USA). Cada amostra foi eluída com uma solução tampão 50 mM fosfato, pH 7.4 contendo 150 mM de NaCl e 100 μ M de DTPA.

3.19 Efeito do pH na oligomerização/agregação da Cu,Zn-superóxido dismutase humana (hSOD1)

Soluções tampão 50 mM fosfato, contendo 150 mM de NaCl e 100 μ M de DTPA foram feitas para diferentes pHs. Foram preparadas para pH 3,5; 4,7; 5,5; 6,2, 7,4 e pH 8,4. Foram incubadas tanto a forma apo-SOD1 WT como a apo-SOD1 G93A em todos os pHs por 24 h, 400 rpm a 37°C em um agitador Thermomixer®. As análises de agregação foram feitas por cromatografia de exclusão.

3.20 Recuperação do DHA nas incubações contendo agregados de SOD1

Para esta análise as incubações preparadas foram: DHA + PBS (tampão 50 mM fosfato, contendo 150 mM de NaCl e 100 μ M de DTPA), proteínas (apo-SOD1 WT e apo-SOD1 G93A 10 μ M) + DHA. Destas misturas reacionais, 20 μ L foram retirados para o processo de extração do lipídio (DHA). Em seguida, foram adicionados 500 μ L de hexano, sendo agitados por 1 min em vortex e das duas fases formadas, foi recolhida a fase superior (processo repetido por duas vezes). Após esta etapa, foram adicionados 500 μ L de clorofórmio, sendo realizado o mesmo procedimento que para a etapa descrita anteriormente, porém, foi coletada a fase inferior. As amostras foram secas sob nitrogênio, ressuspendidas em 50 μ L de metanol e injetados 5 μ L no HPLC, sendo a concentração final de DHA de 100 μ M.

3.21 Quantificação do DHA extraído nas incubações contendo agregados de SOD1 por HPLC

Para análise do DHA extraído, foram utilizadas uma coluna C18 Gemini (250 x 4.6 mm, 5 μ m, Phenomenex, USA) e como fase móvel uma mistura de acetonitrila:ácido fórmico (0,005%), 95:5 em fluxo de 1mL/minuto. O detector de UV foi programado para detecção no comprimento de onda de 205 nm para detecção dos dienos não conjugados. Foi feita uma curva padrão com diferentes concentrações de DHA (25 - 200 μ M) e os picos relativos ao DHA em cada concentração foram integrados para quantificação. Sendo assim, foi possível a quantificação do DHA extraído nas amostras.

3.22 Reação “ene-tiol” e análise por espectrometria de massas

Incubações de DHA (250 μ M) com β -mercaptoetanol (1,43 M) foram feitas por 24 h a 37°C, pH 12,3. A análise das incubações foi realizada em coluna C18 Kinetex (100 x 4.6 mm, 2,1 μ m, Phenomenex, USA) utilizando-se como fase móvel uma mistura de acetonitrila:ácido fórmico 0,005% (90:10, v/v). A detecção dos produtos foi realizada no espectrômetro de massa ESI-Q-ToF (Maxis 3G, Alemanha) no modo de ionização química electrospray negativa (ES-). Para a análise no espectrômetro de massa utilizaram-se as seguintes condições: temperatura da fonte 180°C; voltagem do capilar 4000 V; nebulizador 4.0 bar.

3.23 Experimentos de EPR

As misturas reacionais contendo apo-SOD1 G93A (10 μ M), tampão fosfato 50 mM, pH 7,4, DTPA 100 μ M, NaCl 150 mM e DHAOOH (250 μ M), foram incubados a 15 ou 37°C, na presença de N-t-Butyl-Phenylnitron (PBN) (50 mM). Em tempos determinados, alíquotas das reações foram transferidas para uma cela chata de quartzo, e os espectros foram obtidos à temperatura ambiente (25 \pm 2°C) em um instrumento Bruker EMX em colaboração com o grupo da Profa Dra Ohara Augusto. A quantificação dos sinais foi feita pela integração dupla dos sinais simulados e cálculos baseados numa curva padrão de tempo. As condições instrumentais foram: ganho, 6,32 x 10⁵; potência de microondas, 20 mW; amplitude de modulação, 1 G; constante de tempo, 327 ms; tempo de varredura, 335,54 s; número de leitura, 3.

3.24 Análise da participação do peróxido de lipídio na formação do dímero covalente da SOD1

Para avaliar se a formação do dímero covalente da SOD1 é especificamente induzida pelos hidroperóxidos do DHA, incubações foram feitas com diferentes peróxidos. As incubações contendo apo-SOD1 G93A (10 μ M), tampão fosfato 50 mM, pH 7,4, DTPA 100 μ M, NaCl 150 mM e DHAOOH (250 μ M) foram repetidas com hidroperóxidos do ácido linoleico (LAOOH), H₂O₂ e tert-butil hidroperóxido (tert-butil OOH), todos os peróxidos na concentração de 250 μ M. Outra incubação feita foi da apo-SOD1 G93A (10 μ M) com o hidróxido do DHA (DHAOH) (250 μ M). As análises foram feitas em SDS-PAGE sob condição redutora (na presença do agente redutor β - mercaptoetanol) e o gel revelado por nitrato de prata. Da mesma forma, para comprovar a formação efetiva do dímero covalente, as mesmas incubações de apo-SOD1 G93A (10 μ M) foram feitas, na ausência e presença de DHAOOH, porém, após 24 h de incubação foram adicionados às incubações, 2 M de guanidina, 166 mM de DTT, incubados por 4 h e 200 mM de IAA overnight. Em seguida, as incubações foram lavadas repetidamente e concentradas por ultrafiltração em filtros de corte de 30 KDa (Amicon Ultra-Centrifugal Filter). Após os tratamentos cada uma das incubações foi aplicada em SDS-PAGE sob condição redutora e o gel revelado por nitrato de prata.

3.25 Digestão *in gel*

Após 24 h de incubação de apo-SOD1 G93A (10 μ M) com DHAOOH (250 μ M) à 37°, foram aplicados 32 μ g da proteína em gel de poliacrilamida para separação do dímero covalente. As regiões do gel de poliacrilamida correspondentes às espécies

de hSOD1 monômero e dímero foram cortadas e colocadas em tubos separados. Cada pedaço de gel foi então cortado em pedaços menores para aumentar a superfície de contato com as soluções. Primeiramente, os géis corados com Coomassie coloidal foram tratados com uma solução descorante (50% v/v de acetonitrila e 25mM de bicarbonato de amônio) aplicada três vezes, com intervalos de 10 min. Após o desaparecimento da coloração azul, os pedaços de gel foram desidratados com 100% de acetonitrila por 10 min. Em seguida, os fragmentos de gel foram reidratados pela adição de solução de redução (DTT 20 mM) por 40 min à 56 °C. Após um pulso na centrífuga a solução de redução foi removida e adicionou-se a solução de alquilação (Iodoacetamida 55 mM) por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, os géis foram submetidos a dois ciclos de incubação com 50 mM de bicarbonato de amônio e desidratação com acetonitrila (100 %) e então secos sob vácuo. Os tubos foram colocados em gelo e foi feita adição de tampão de digestão (50 mM bicarbonato de amônio, pH 8,0 contendo 20 ng/μl de tripsina grau sequenciamento) para rehidratação dos pedaços de gel. Após 15 min de rehidratação, adicionou-se mais tampão 50 mM bicarbonato de amônio, para cobrir os géis e incubou-se por 16 h a 37°C para a digestão enzimática. Em seguida, a ação da tripsina foi bloqueada pela adição de ácido fórmico 5% em acetonitrila (ACN) 50% e o sobrenadante transferido para um tubo novo. A extração dos peptídeos da malha do gel de acrilamida foi feita em 1% ácido fórmico e 60% de metanol (MeOH) seguida de incubação por 15 min a 40 °C sob agitação. Após a centrifugação dos géis, o sobrenadante foi recolhido e misturado ao sobrenadante prévio. A extração continua com a adição de ácido fórmico 1% em 50% de ACN. Esta etapa de extração foi repetida e o sobrenadante transferido. Para finalizar, foi adicionado 100% de ACN para desidratar o gel e o sobrenadante transferido para o

tubo contendo os sobrenadantes prévios. A solução de peptídeos foi seca sob vácuo, filtrada e armazenada a -20 °C.

3.26 Análise tríplica do dímero covalente de SOD1 por espectrometria de massas

Após digestão, as amostras foram ressuspensas em acetonitrila e água com ácido fórmico 0.1% e analisadas em colaboração com a empresa Waters do Brasil, utilizando-se NanoUPLC em tandem com o nanoESI em um equipamento Xevo G2 QToF (Waters, UK). Foi aplicada a tecnologia 2D nanoACQUITY UPLC para separação dos peptídeos. Os peptídeos foram eluídos em uma nano coluna primeira dimensão XBridge BEH130 C18 5µm 300µm x 50mm (Waters, USA) usando 20 mM de formato de amônia, pH 10 (bomba A) e ACN (bomba B) e a segunda dimensão foi realizada com uma nano coluna nanoACQUITY UPLC Trap Symmetry C18 5 µm 180 µm x 20 mm (Waters, USA) imediatamente seguida de uma coluna nanoACQUITY UPLC HSS T3 1.8 µm 75 µm x 150 mm (Waters, USA).

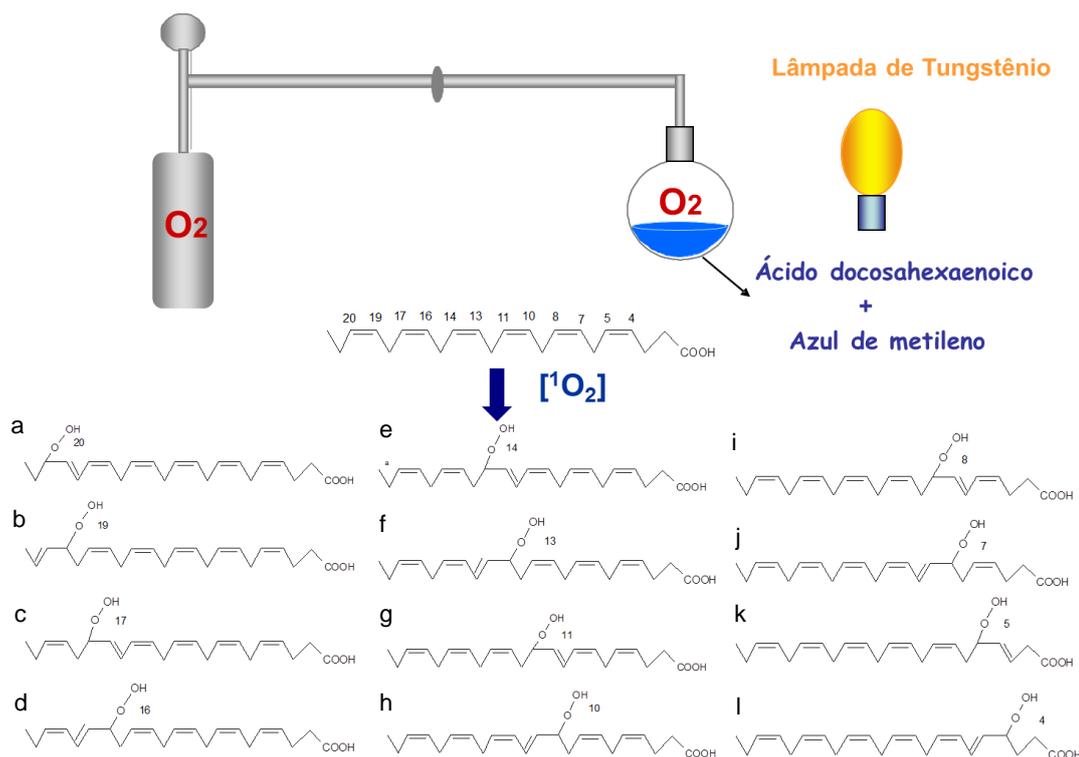
4 Resultados e Discussão

4.1 Síntese e monitoramento da formação dos DHAOOH

A geração de hidroperóxidos do ácido docosahexaenoico (DHAOOH) neste trabalho foi realizada a partir do $^1\text{O}_2$, uma espécie reativa de oxigênio. É um processo conhecido como fotooxidação.

O $^1\text{O}_2$ foi formado pelo fornecimento de energia (lâmpadas de tungstênio) ao sensibilizador (azul de metileno), que passa para seu estado excitado. O oxigênio molecular, presente nessa reação, recebe a energia do sensibilizador formando, então, o $^1\text{O}_2$.

Os lipídios insaturados são bastante suscetíveis ao ataque por espécies reativas de oxigênio como o $^1\text{O}_2$. O resultado deste ataque é a formação de hidroperóxidos de lipídios. Para o ácido docosahexaenoico que possui seis insaturações é possível a formação de 12 hidroperóxidos (Esquema 1).



Esquema 1. Esquema da reação de fotossensibilização do ácido docosahexaenoico por azul de metileno gerando os isômeros de DHAOOH. (a) 20-OOH (b) 19-OOH (c) 17-OOH (d) 16-OOH (e) 14-OOH (f) 13-OOH (g) 11-OOH (h) 10-OOH (i) 8-OOH (j) 7-OOH (k) 5-OOH (l) 4-OOH.

A formação de DHAOOH foi monitorada a partir de alíquotas retiradas em tempos 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 e 180 min, medindo-se as absorvâncias das soluções no UV a 235 nm. Houve uma formação crescente de DHAOOH até 2 h de fotooxidação, a partir daí, foi necessária a adição de mais 2 μ L de azul de metileno e mais uma hora de fotooxidação como mostra a Figura 8.

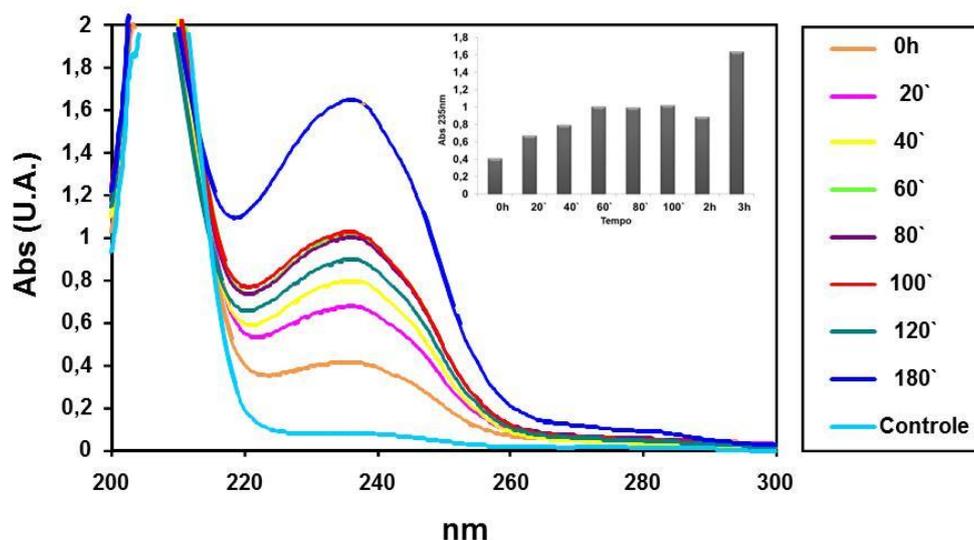


Figura 8. Formação de dienos conjugados durante fotooxidação do DHA. Espectro de absorvância no UV com pico máximo em 235nm. Interno ao espectro, gráfico de barras representando o aumento da formação dos DHAOOH com o aumento do tempo.

O monitoramento também foi realizado através de cromatografia de camada delgada (ou, *thin layer chromatography* - TLC) (Figura 9). Pela análise das placas de TLC pôde-se observar a formação dos hidroperóxidos conforme padrão de bandas para DHA e DHAOOH, confirmando-se a formação de DHAOOH pela fotooxidação.

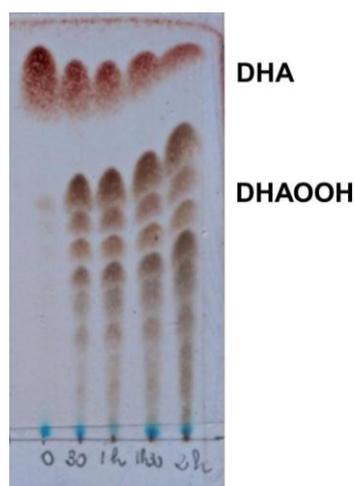


Figura 9. Resultado do experimento realizado em Cromatografia de Camada Delgada (TLC) a partir da fotooxidação do DHA. Estão representados DHA e os monohidroperóxidos DHAOOH. Foram analisadas alíquotas nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 min, havendo uma diminuição do DHA e aumento dos seus produtos de oxidação de acordo com o aumento do tempo.

4.2 Separação de DHAOOH por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) fase reversa

Neste trabalho, foi utilizado o método descrito por Lyberg e Adlercreutz como base para os experimentos de separação dos DHAOOH. As condições de fase móvel foram otimizadas e estabeleceu-se a condição acetonitrila:ácido fórmico 0,005% (55:45) como ótima para separação e purificação dos hidroperóxidos do ácido docosahexaenoico. Obteve-se a separação dos di e tri-hidroperóxidos, representados no cromatograma por picos presentes nos tempos iniciais (Figura 10, tempos de 5 a 20 min). Esta separação fez-se necessária para a purificação da mistura dos monohidroperóxidos (DHAOOH), através da coleta dos picos referentes a eles (Figura 10, tempos ~ 30 a 60 min). Após a coleta, secagem e quantificação da mistura dos DHAOOH, esta foi utilizada para as demais análises na presença da enzima antioxidante SOD1.

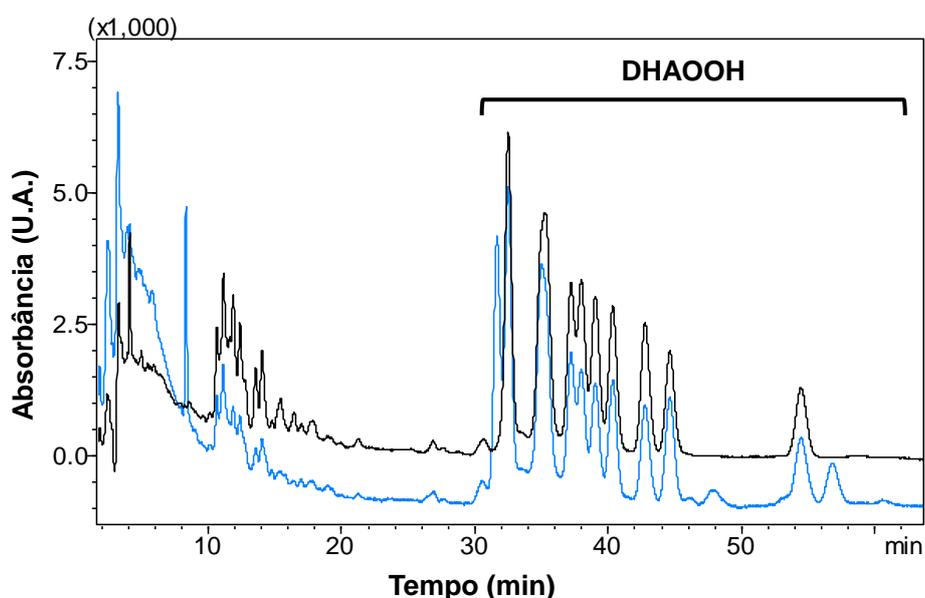


Figura 10. Cromatograma de análise dos DHAOOH por HPLC fase reversa. Fase móvel acetonitrila:ácido fórmico 0,005% (55:45, v/v). Detecção UV em 235nm representado em preto e detecção UV em 205nm representado em azul.

4.3 Análise de DHAOOH por HPLC acoplado à espectrometria de massa em tandem (HPLC-MS/MS)

A detecção dos produtos primários de oxidação do DHA no espectrômetro de massa foi feita através do método de ionização por electrospray, em modo negativo (ES-), utilizando-se as seguintes condições: temperatura de dessolvatação 200°C; temperatura da fonte 100°C, voltagem 30 V.

A partir da análise por HPLC-MS/MS, pôde-se fazer uma pré caracterização dos isômeros dos hidroperóxidos do ácido docosahexaenoico. Assim como foi feito para o isômero representado pela letra **a** no cromatograma abaixo (Figura 11 A e B), os demais isômeros foram analisados da mesma forma (Figura 12). Cada isômero possui uma fragmentação característica, como é dado na tabela 2 (descrição mais detalhada em DEROGIS *et. al.* artigo submetido).

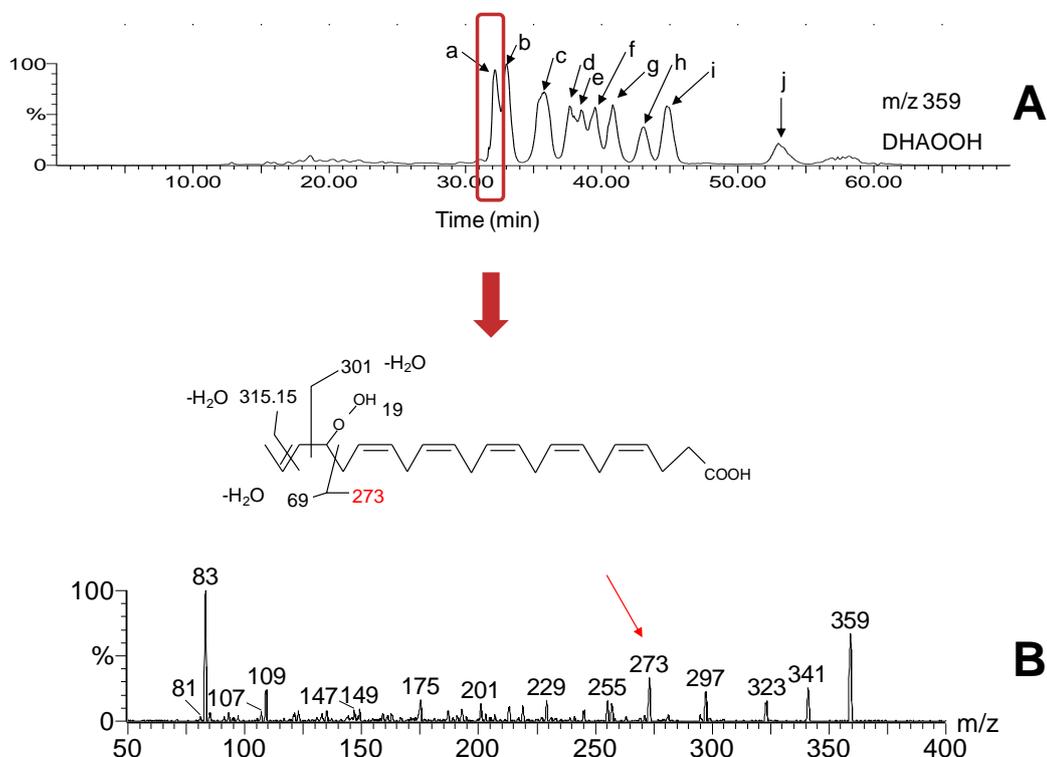
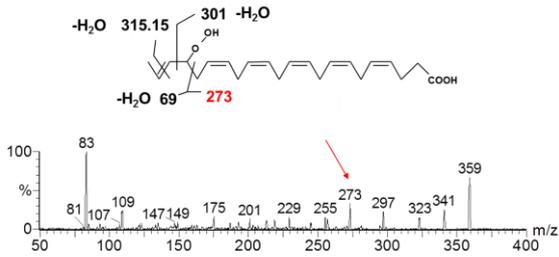
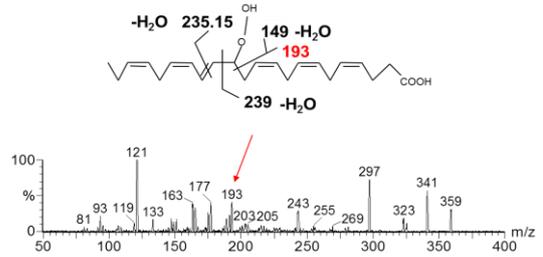


Figura 11. (A) Espectro de massa dos DHAOOHs selecionando o íon m/z 359. **(B)** Espectro de massa da fragmentação padrão para o isômero 19-DHAOOH.

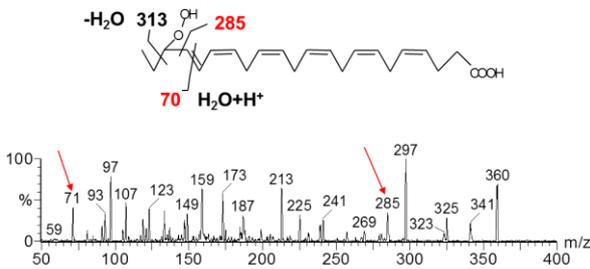
a) 19-OOH



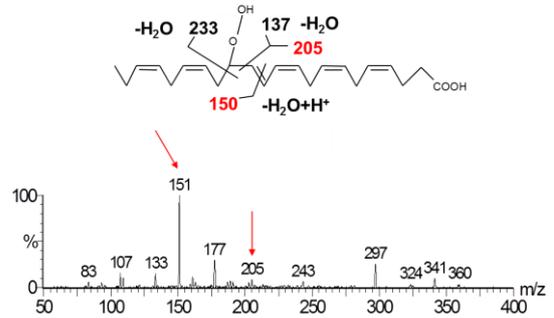
d) 13-OOH



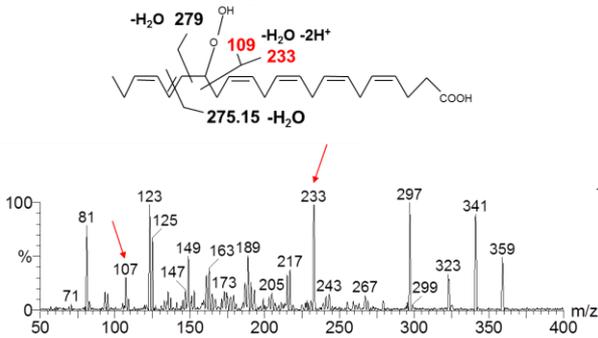
b) 20-OOH



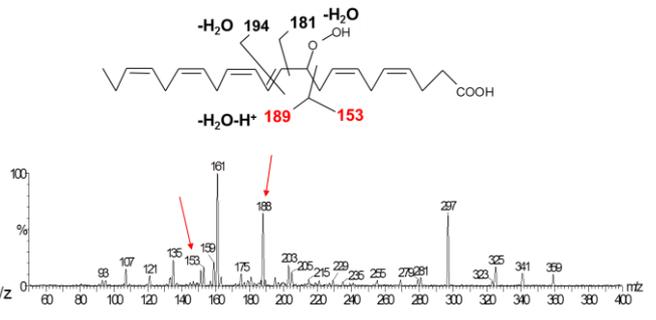
e) 14-OOH



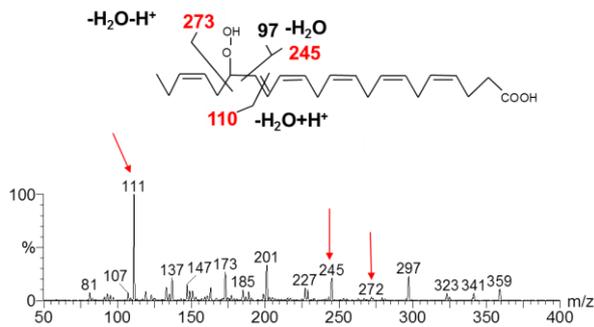
c) 16-OOH



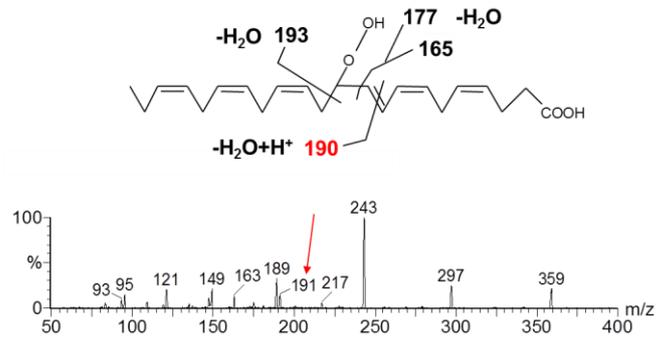
f) 10-OOH



c) 17-OOH



g) 11-OOH



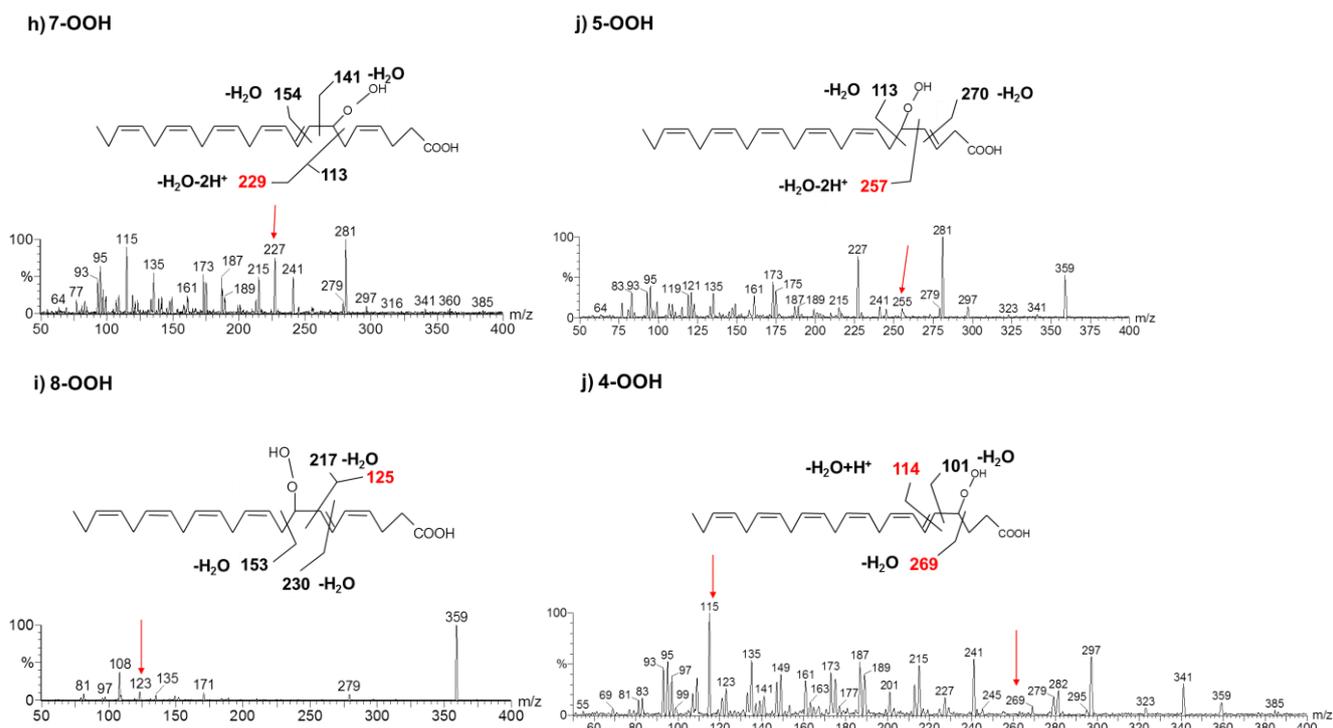


Figura 12. Espectros de massa adquiridos no modo negativo das fragmentações padrão para cada isômero de DHAOOH. (a) 19-DHAOOH (b) 20-DHAOOH (c) 16-DHAOOH (d) 13-DHAOOH (e) 14-DHAOOH (f) 10-DHAOOH (g) 11-DHAOOH (h) 7-DHAOOH (i) 8-DHAOOH (j) 5-DHAOOH (j) 4-DHAOOH. Condições de análise: temperatura de dessolvatação 200°C; temperatura da fonte 100°C, voltagem 30 V.

Tabela 2. Fragmentação padrão de DHAOOH em análise por HPLC-MS/MS

Posição dos isômeros DHA-OOH	Fragmentação Padrão (m/z)
(a)19-OOH	273, 301, 314
(b)20-OOH	70, 285, 313
(c)17-OOH	110, 245, 273
(c)16-OOH	109, 233, 261, 274
(d)13-OOH	149, 193, 221, 234
(e)14-OOH	137, 150, 205, 233
(f) 10-OOH	153, 181, 189, 194
(g)11-OOH	165, 177, 190, 193
(h)7-OOH	113, 141, 154, 229
(i)8-OOH	125, 153, 217, 230
(j)5-OOH	113, 257, 270
(j)4-OOH	101, 114, 269

Após pré-caracterização dos isômeros de posição dos hidroperóxidos do DHA, estes foram utilizados para as análises posteriores.

4.4 Expressão e purificação da superóxido dismutase 1 humana recombinante

Com o objetivo de obter a caracterização das enzimas SOD1 humana recombinante e mutante (G93A) expressas e purificadas como descrito nos itens 3.6 e 3.7 foi medida a banda de absorção do resíduo de triptofano com máximo em 280 nm (Figura 13A). Pode-se observar o espectro característico do triptofano em ambas as preparações (Figura 13A, em preto hSOD1 WT e em vinho hSOD1 G93A).

A cromatografia de interação hidrofóbica resultou em um pico único de hSOD1 correspondente à proteína pura, sendo observado pela presença de uma única banda no gel de poliacrilamida em condições redutoras (Figura 13B).

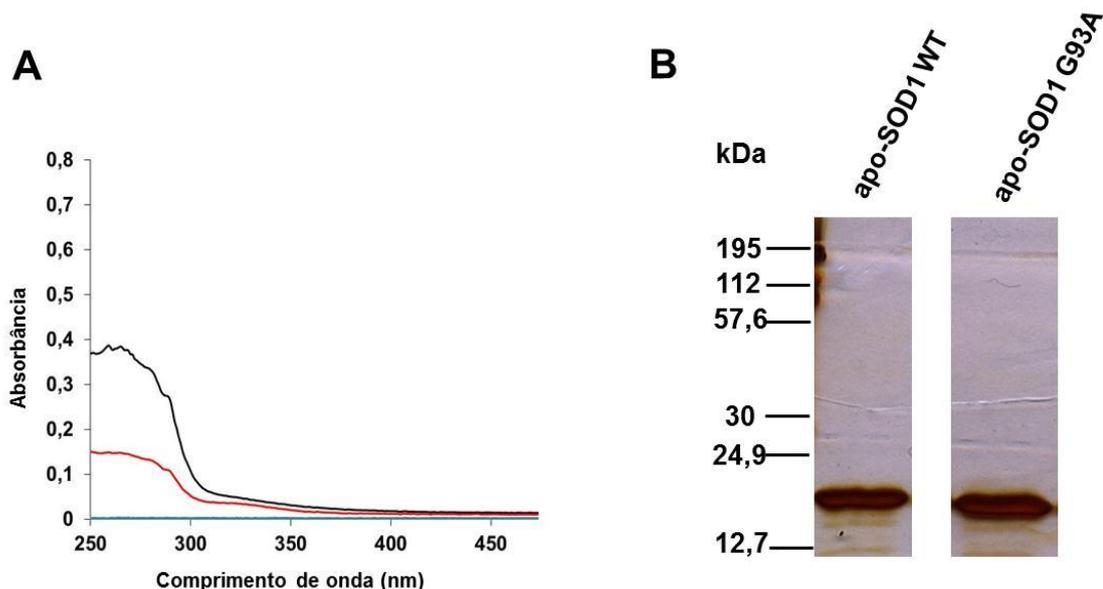


Figura 13. Banda de absorção do resíduo de triptofano na região do ultravioleta das enzimas hSOD1 nativa (WT) representado em preto (A) e hSOD1 mutante (G93A) representado em vinho (A). Análise da hSOD1 nativa e hSOD1 G93A (B) por SDS-PAGE sob condições redutoras e corado por prata.

4.5 Avaliação do efeito de hidroperóxidos de DHA e do DHA sobre a oligomerização/agregação de SOD1 mutada *in vitro*

Após obtenção da mistura de DHAOOH e das proteínas expressas e purificadas, partiu-se para análise *in vitro* do efeito do DHA e dos DHAOOH sobre a

agregação da enzima antioxidante SOD1. Estudos recentes mostraram que a enzima SOD1 *wild type* humana (hSOD1 WT) na ausência dos metais (apo-SOD1 WT), sob condições fisiológicas (37°C, pH 7), possuía maior propensão para formar oligômeros protéicos do tipo amiloide (BANCI *et. al*, 2008). Sendo assim, para os ensaios iniciais de agregação utilizou-se tanto a forma holo como a apo (ausência dos metais) da enzima purificada. Experimentos iniciais foram realizados incubando-se 10 µM de cada uma das enzimas (apo-SOD1 WT e hSOD1 WT) na presença de 250 µM de DHA ou DHAOOH em tampão fosfato 50 mM, pH 7,4 contendo 150 mM de NaCl e 100 µM de DTPA. Incubações também foram conduzidas na presença de 250 µM de H₂O₂. Após 24h de incubação a 37°C sob agitação constante (300 rpm), foi analisada a formação de agregados por meio de duas técnicas: eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, sob condições redutora e não-redutora) e cromatografia de exclusão.

4.5.1 SDS-PAGE

As análises em SDS-PAGE sob condições não-redutoras confirmaram a maior propensão da forma apo da SOD1 selvagem (apo-SOD1 WT) à oligomerização, como se pode observar pelo aparecimento de bandas de oligômeros tanto para o controle como para as amostras incubadas com DHA, DHAOOH ou H₂O₂ (Figura 14A). O gel não redutor da proteína apo mostra que o DHA induz a formação de agregados de alto peso molecular (>200 KDa) de forma bastante intensa, enquanto o mesmo não é observado para as incubações com DHAOOH e H₂O₂. Por outro lado, análises em condições redutoras (na presença de β-mercaptoetanol) mostram o desaparecimento das bandas de alto peso molecular,

sugerindo o envolvimento de pontes de disulfeto no processo de oligomerização e formação de espécies de alto peso molecular. Também é importante destacar o aparecimento de bandas referentes a dímeros resistentes à ação do β -mercaptoetanol nas incubações com o DHAOOH, tanto da forma holo como da apo, (Figura 14B), indicando que DHAOOH promove um tipo diferente de modificação que resulta na dimerização covalente da enzima.

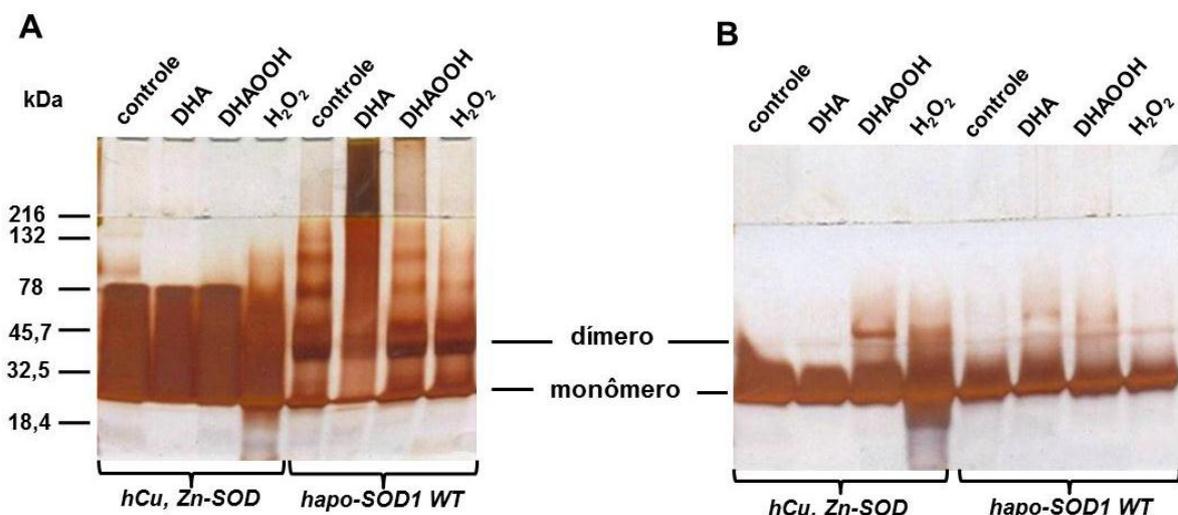


Figura 14. SDS-PAGE sob condições não-redutoras ($-\beta$ -mercaptoetanol) (A) e redutoras ($+\beta$ -mercaptoetanol) (B). Avaliação do efeito do DHA e DHAOOH sob a oligomerização da enzima SOD1. Em ~ 37 e 21 kDa estão representados, respectivamente, o dímero e o monômero da SOD1. Incubações por 24h à 37°C de hSOD1 WT ($10\ \mu\text{M}$) e hapo-SOD1 WT ($10\ \mu\text{M}$) com $250\ \mu\text{M}$ DHA, DHAOOH ou H_2O_2 . A adição do agente redutor (β -mercaptoetanol) acontece após as 24 h de incubação.

Dados na literatura mostram que a oligomerização de SOD1 pode ocorrer a partir da oxidação das cisteínas 6 e 111 que encontram-se mais expostas ao solvente na estrutura da enzima, favorecendo a formação de pontes dissulfeto e posterior formação de estruturas do tipo amilóide (BANCI *et. al.*, 2008; BANCI *et. al.*, 2007). O fato de os DHAOOH ou H_2O_2 não induzirem a formação de espécies de alto peso molecular, pode estar relacionado à oxidação das cisteínas livres da SOD1 (Cys 6 e Cys 111). De fato, estudos mostram que a oxidação destes tóis (p. ex. a

ácido sulfênico) dificulta a formação de pontes dissulfeto inibindo a oligomerização de SOD1 (CARBALLAL *et. al.*, 2003). Outro fator a se considerar no caso do DHAOOH é a presença do grupamento peróxido que por ser mais polar dificultaria a formação de interações hidrofóbicas (entre a proteína e o ácido graxo) possivelmente envolvidos no mecanismo de agregação promovido por DHA.

Em resumo, os dados iniciais obtidos com a proteína selvagem mostraram claramente um grande potencial do DHA em induzir a agregação da SOD1, principalmente na sua forma apo. Sendo assim, experimentos subsequentes utilizando a forma mutante de SOD1 foram realizados somente com a forma apo da proteína.

Os resultados obtidos no gel não-redutor e redutor para as incubações realizadas com a SOD1 selvagem e mutante mostraram os mesmos perfis obtidos anteriormente em termos de agregação e dimerização da proteína. No entanto, como esperado, observou-se uma maior propensão de agregação da enzima contendo a mutação G93A em comparação com a enzima *wild type* (WT) (Figura 15A). Em condições redutoras, destaca-se, novamente o desaparecimento dos agregados e a presença de dímeros resistentes à ação do β -mercaptoetanol principalmente nas incubações contendo DHAOOH (Figura 15B). Assim como para a agregação, a dimerização induzida por DHAOOH mostrou-se mais intensa na forma mutante.

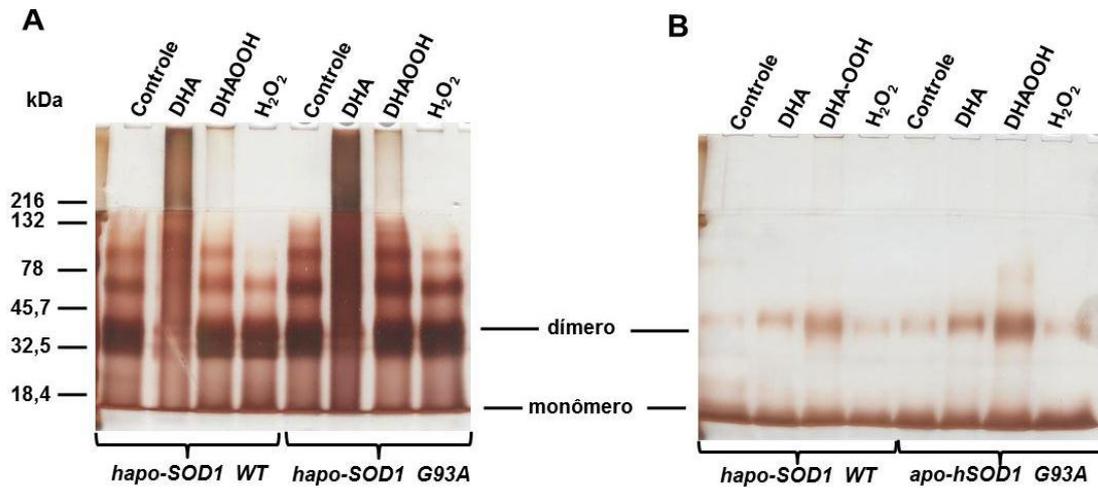


Figura 15. SDS-PAGE da formação dos oligômeros das formas apo-hSOD1 induzidos por DHA ou DHAOOH sob condições não-redutoras (sem β -mercaptoetanol) (A) e redutoras (com β -mercaptoetanol) (B). As apo-enzymes WT ou G93A foram incubadas a 37°C por 24h na ausência (control) ou presença de 250 μ M de DHA, 250 μ M de DHAOOH ou 250 μ M de H₂O₂. A adição do agente redutor (β -mercaptoetanol) foi feita após as 24 h de incubação.

Para verificar a dose-dependência do DHA e dos DHAOOH na oligomerização da SOD1, incubações foram preparadas na presença de 50 μ M, 100 μ M e 250 μ M de DHA ou DHAOOH e analisadas por SDS-PAGE.

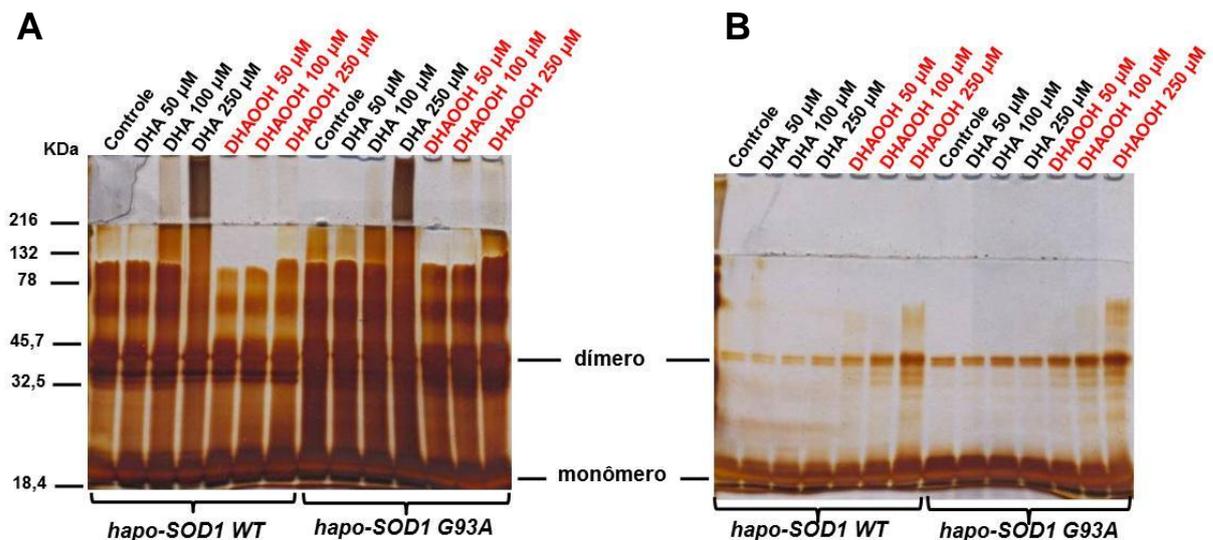


Figura 16. SDS-PAGE sob condições não-redutoras ($-\beta$ -mercaptoetanol) (A) e redutoras ($+\beta$ -mercaptoetanol) (B). Avaliação da dose-dependência do DHA e DHAOOH sob a oligomerização das enzimas apo-SOD1WT e apo-SOD1G93A. Em ~37 e 21kDa estão representados, respectivamente, o dímero e o monômero da SOD1. A adição do agente redutor (β -mercaptoetanol) foi feita após as 24 h de incubação.

Sob condições não-redutoras (Figura 16A), observou-se uma dose-dependência do DHA para formação das espécies de alto peso molecular (>200 KDa), em contrapartida, sob condições redutoras, observou-se uma dose-dependência para formação de dímeros de DHAOOH (Figura 16B). Também, no gel sob condições redutoras (Figura 16B), confirmou-se a dependência dos resíduos de cisteína (tióis) para a formação dos oligômeros da SOD1, já que na presença do β -mercaptoetanol, os oligômeros/agregados são desfeitos, ou seja, não há presença de espécies de alto peso molecular. Vale destacar que o efeito do DHA e do DHAOOH foi mais pronunciado com a forma mutante da enzima (G93A) e na concentração de 250 μ M.

4.5.2 Cromatografia de exclusão por tamanho

As análises por SDS-PAGE requerem a adição de reagentes como tampão de amostra contendo dodecil sulfato de sódio (SDS), fatores que podem interferir na estrutura nativa da proteína a ser analisada. Para realizar a análise da proteína em condições nativas, foi utilizada a técnica de cromatografia de exclusão por tamanho. Alíquotas das incubações (as mesmas realizadas anteriormente) foram retiradas em 2, 6 e 24 h e estão representadas nos cromatogramas pelas linhas coloridas. Os agregados são observados nos tempos iniciais do cromatograma (tempos ~ 2,5-7,5 min) e o pico da SOD1 nos tempos de 8 a 10 min, sendo assim, pode-se observar que tanto para apo-SOD1WT (Figura 17A) como para apo-SOD1G93A (Figura 17E), pouco ou nenhuma agregação ocorreu. Estas análises mostraram um aumento tempo dependente na formação de espécies de alto peso molecular (~700 kDa) na incubação da hapo-SOD1 WT (Figura 17B) e hapo-SOD1 G93A (Figura 17F) com o DHA, sendo mais pronunciada no tempo de incubação de 24 h. Em acordo com as

análises por SDS-PAGE, a incubação das enzimas com H_2O_2 não formaram agregados em nenhum dos tempos de incubação. Considerando que, provavelmente, a formação de agregados está relacionada com a formação de pontes dissulfeto, a ação do H_2O_2 pode estar relacionada com a prevenção desta formação através da oxidação dos tióis livres na proteína (Figuras 17D e 17H). Baseado neste resultado, os hidroperóxidos do DHA podem estar atuando da mesma maneira oxidando resíduos de cisteína, o que explica a não formação dos agregados quando a enzima SOD1 é incubada com DHAOOH (Figuras 17C e 17G), também, a presença do peróxido na molécula de DHA, pode dificultar a interação com a proteína, evitando a formação dos agregados. Os resultados obtidos para a enzima apo-SOD1G93A (mutante) (Figuras 17E-H) foi similar ao obtido com a apo-SOD1WT, porém, deve-se destacar que a forma mutante mostrou uma maior propensão para formar agregados quando comparada com a WT, como pode ser observado pela intensidade relativa dos picos dos agregados em relação ao pico da SOD1.

Em conjunto os dados obtidos nos experimentos de SDS-PAGE e cromatografia de exclusão comprovam que há uma relação entre o DHA e a formação de agregados de SOD1, sendo que a formação destes agregados são dependentes dos tióis da proteína, como observado nos géis sob condições redutoras. Sendo assim, algumas abordagens foram utilizadas com o intuito de caracterizar esta dependência dos tióis e do DHA na agregação de SOD1.

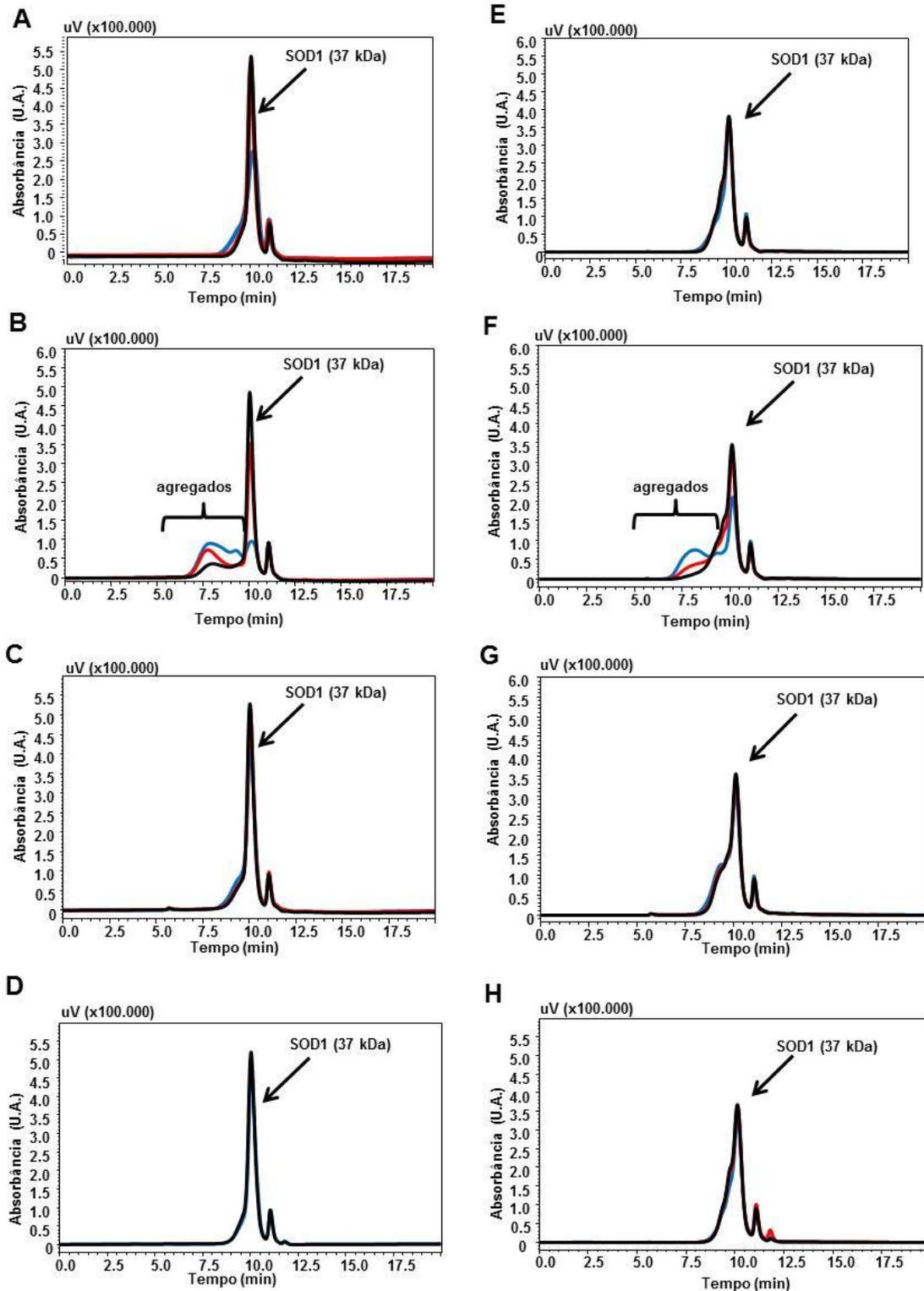


Figura 17. Cromatografia de exclusão para detecção da agregação da apo-SOD1 WT e G93A. Apo-SOD1 WT incubada na ausência de ácidos graxos (A) e na presença de 250 μ M DHA (B), DHAOOH (C) e H₂O₂ (D). Apo-SOD1G93A incubadas na ausência de ácidos graxos (E) e na presença de 250 μ M de DHA (F), DHAOOH (G) e H₂O₂ (H). As setas indicam o pico referente à SOD1. As linhas coloridas representam o tempo de incubação. Preto 2 h, 6 h em vermelho e azul 24 h. A formação de agregados está representada entre os tempos de ~5 a 9 minutos, sendo estes agregados de ~700 kDa.

4.5.3 Dependência de tiol na oligomerização da SOD1 induzida por DHA

A primeira abordagem foi a utilização do agente alquilante de tiol, o ácido iodoacético (NaIAc). Como esperado, estas análises mostraram que há formação de oligômeros/agregados apenas na presença de DHA (Figura 18A; linha verde). A pré-incubação com NaIAc (Figura 18A, linha vermelha) alquila os tióis, tornando as cisteínas indisponíveis para a interação com o DHA. A intensidade do pico da apo-SOD1 WT (% relativa) é representada na Figura 18B. Observa-se que após incubação com DHA há uma diminuição na intensidade do pico da SOD1 acompanhada do aparecimento de um pico largo referente a formação de agregados proteicos. Porém, observa-se que quando a proteína é pre-tratada com o NaIAc, esta agregação é prevenida. Estes resultados confirmam o requerimento de tióis livres na formação dos agregados induzida pelo DHA.

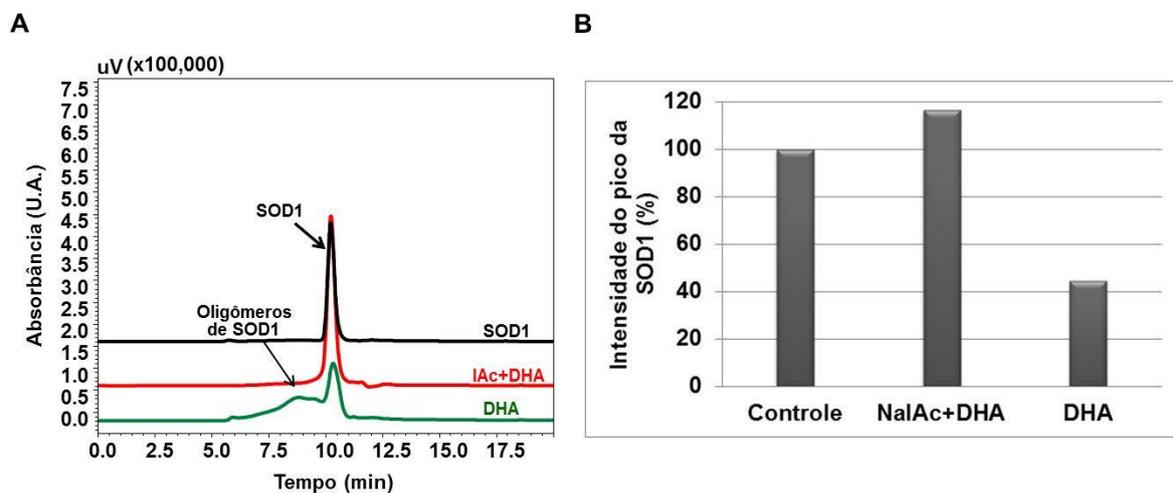


Figura 18. Cromatografia de exclusão do requerimento de tióis reduzidos livres (-SH) pela apo-SOD1 WT analisados a partir da alquilação dos tióis por ácido iodoacético (NaIAc). As linhas coloridas em (A) representam a incubação da apo-SOD1WT com MeOH (linha preta), NaIAc+DHA (linha vermelha) e apo-SOD1WT com DHA (linha verde). Intensidade do pico da hapo-SOD1 WT (% relativa) está representada em (B). Incubações de 24 h à 37°C. A proteína agregada, sendo de maior tamanho em relação à proteína nativa, está representada nos tempos iniciais da corrida cromatográfica (5 a 9 min).

Complementando estes resultados, outra abordagem utilizada foi a quantificação dos níveis de tióis livres na proteína com iodoacetamida-fluoresceína (IAF). Este composto é capaz de marcar os tióis reduzidos (BATY *et. al.*, 2002). Os resultados mostram que sob condições não redutoras, apenas 10 % da intensidade total relativa aos tióis livres é detectada na incubação com o DHA quando comparada ao controle, sugerindo que aproximadamente 90% das cisteínas na apo-SOD1 G93A incubadas com o DHA estavam comprometidas (Figura 19A), estando ~ 10% disponível para ligação com a IAF. Por outro lado, em condições redutoras, houve um aumento na quantidade de tióis livres detectados de 10 para 62 % (Figura 19B) indicando que aproximadamente 38% dos resíduos de cisteína na apo-SOD1 G93A incubada com o DHA continuam comprometidos mesmo após a redução. Como possíveis razões para a não recuperação dos tióis pode-se sugerir uma possível hiperoxidação dos tióis por peróxidos contaminantes do DHA ou uma ligação covalente envolvendo tiol e o DHA. No entanto, considerando que a quantidade de peróxidos presentes ou formados a partir do DHA é mínima durante todo o processo de incubação, acredita-se que a contribuição da primeira hipótese é mínima.

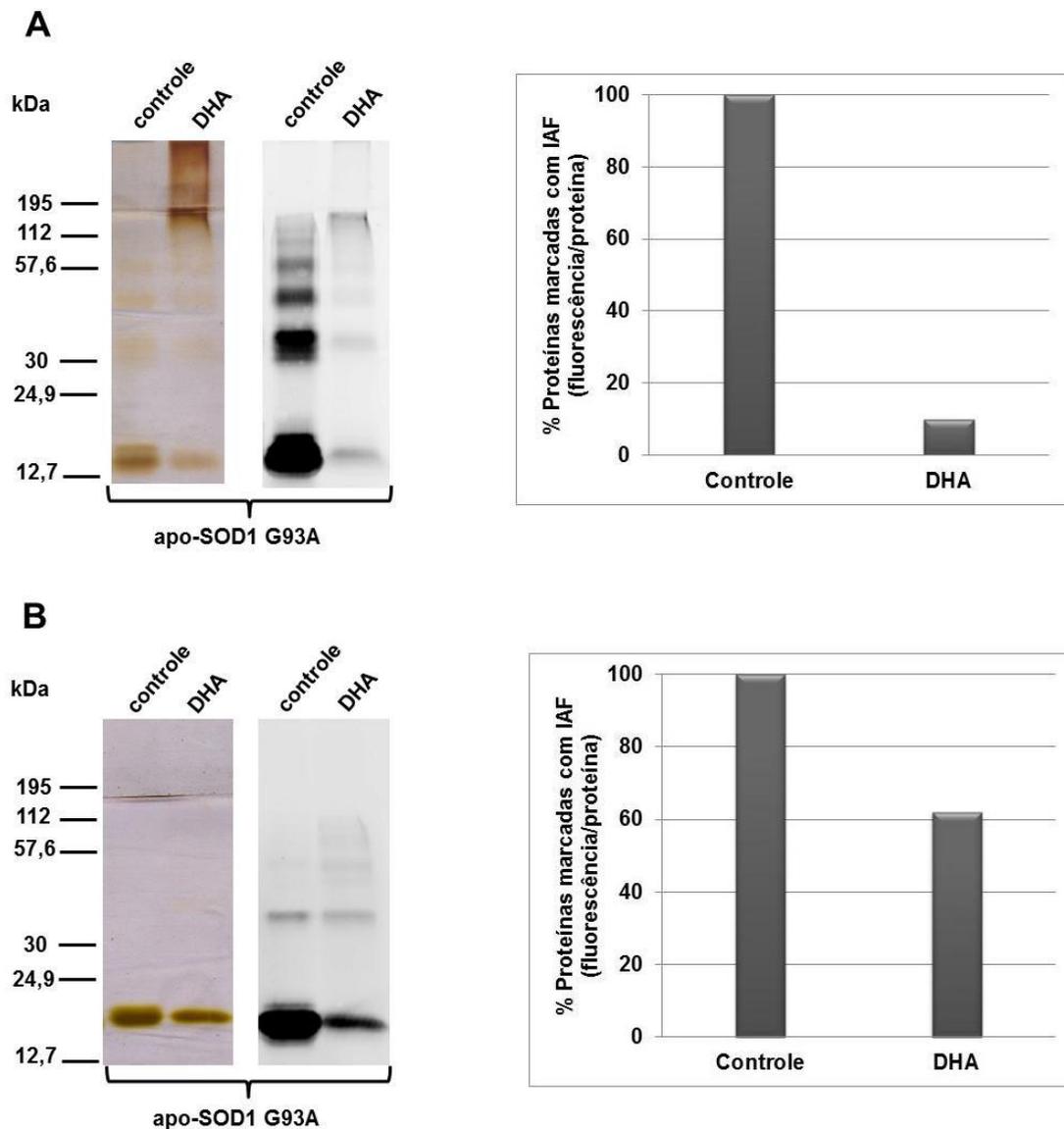


Figura 19. Experimento para análise de tióis livres na proteína. Em **(A)** SDS-PAGE em condições não redutoras da apo-SOD1 G93A controle e incubação contendo DHA. À esquerda gel corado com nitrato de prata e à direita imagem das proteínas fluorescentes no gel. No painel à direita, gráfico representativo da porcentagem das proteínas marcadas com IAF nas incubações controle e na presença de DHA. Em **(B)** mesmas condições apresentadas em **(A)**, porém sob condições redutoras.

4.5.4 Extração do DHA

Conforme descrito anteriormente, há uma possível interação covalente entre o DHA e a SOD1. Assim, procurou-se analisar possíveis interações moleculares a partir da extração do DHA das incubações contendo as proteínas de interesse (apo-SOD1 WT e apo-SOD1 G93A). Alíquotas de 20 μ L de cada uma das incubações

foram retiradas para extração do DHA, sendo 100 μM a concentração correspondente à 100% de DHA extraído. Na figura 20 pode-se observar que na incubação controle (DHA e PBS), como esperado, 100 % do DHA foi extraído, ou seja, 104 μM de DHA foi recuperado. Na incubação da proteína apo-SOD1 WT na presença de DHA, apenas 48% do DHA foi recuperado, enquanto com a apo-SOD1 G93A obteve-se uma recuperação de 57%. Estes dados indicam uma possível interação da proteína com o DHA fazendo com que este não esteja livre em solução para extração. Também, considerando-se que esta interação ocorra entre DHA e as cisteínas livres da proteína (Cys6 e Cys111), os dados corroboram com o esperado, ou seja, nas incubações analisadas, para cada 10 μM de enzima tem-se 40 μM de cisteínas e 100 μM de DHA. Portanto, considerando uma estequiometria de reação de DHA e tiol de 1:1 seria esperado que em torno de 40 μM do DHA não fossem recuperados. De fato, os dados de recuperação mostram que dos 100 μM , em torno de 48 μM não são recuperados.

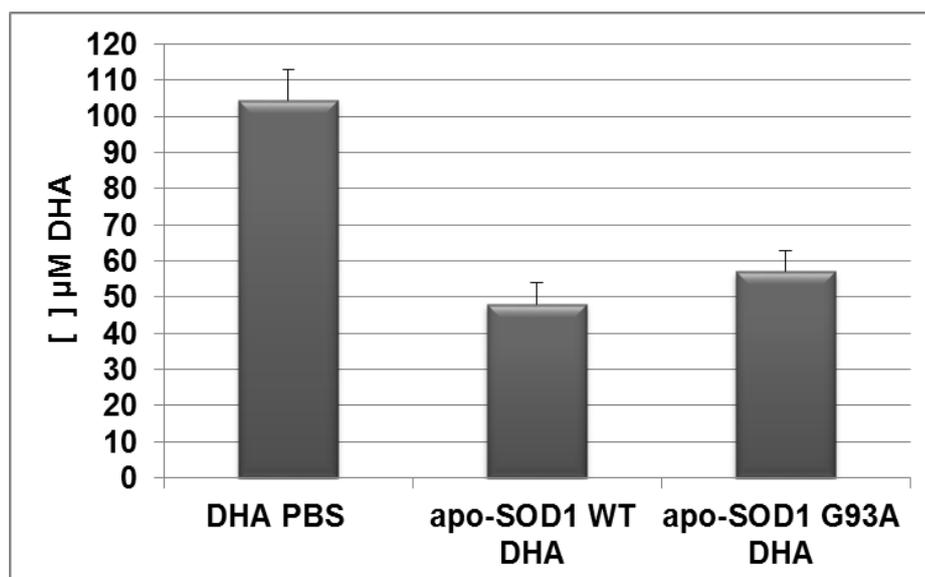
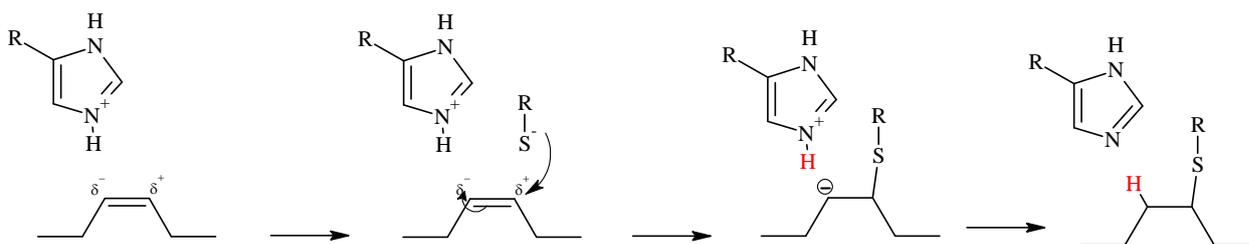


Figura 20. Análise de recuperação do DHA após incubação de 24 h com as proteínas apo-SOD1 WT e apo-SOD1 G93A. Todas as incubações foram processadas para extração de 100 μM de DHA. Após incubação e procedimento de extração, 104 μM de DHA foi recuperado na incubação controle (DHA+PBS), 48 μM de DHA foi recuperado na incubação com a apo-SOD1 WT e 57 μM de DHA foi recuperado na incubação com a apo-SOD1 G93A.

4.5.5 Reação “ene-tiol” e análise por espectrometria de massas

A partir dos dados obtidos, propõe-se que o mecanismo geral da reação entre o DHA e os tióis livres (na forma de tiolato) da proteína seja do tipo “ene-tiol” (Esquema 2). A adição nucleofílica de tióis a compostos insaturados ocorre através de uma etapa em que o ânion tiolato adiciona-se a um átomo de carbono com hibridização sp^2 . Este tipo de adição é mais frequente em sistemas com ligação conjugadas polarizadas como o que ocorre com aldeídos insaturados, cetonas, ésteres, amidas etc. Outra possibilidade, seria a adição radicalar de tióis a $C=C$. Em particular, a adição radicalar de tióis a olefinas é caracterizada por uma baixa barreira de energia de ativação (KOVAL, 2007).



Esquema 2. Esquema representativo da reação “ene-tiol”.

Para demonstrar a interação existente entre o DHA e tióis, incubações foram feitas com DHA e o agente redutor β -mercaptoetanol como fonte de tiol. Após 24 h, analisou-se a incubação por espectrometria de massas. O aduto esperado entre o DHA e o β -mercaptoetanol apresenta um m/z de 405,2463.

A Figura 21A mostra o cromatograma de LC-MS/MS selecionando-se a massa do DHA (m/z 327, em amarelo) e do aduto DHA- β -mercaptoetanol (m/z 405, em azul). Observa-se que o DHA aparece no tempo de retenção de 15 min enquanto o aduto aparece no tempo de 8 min.

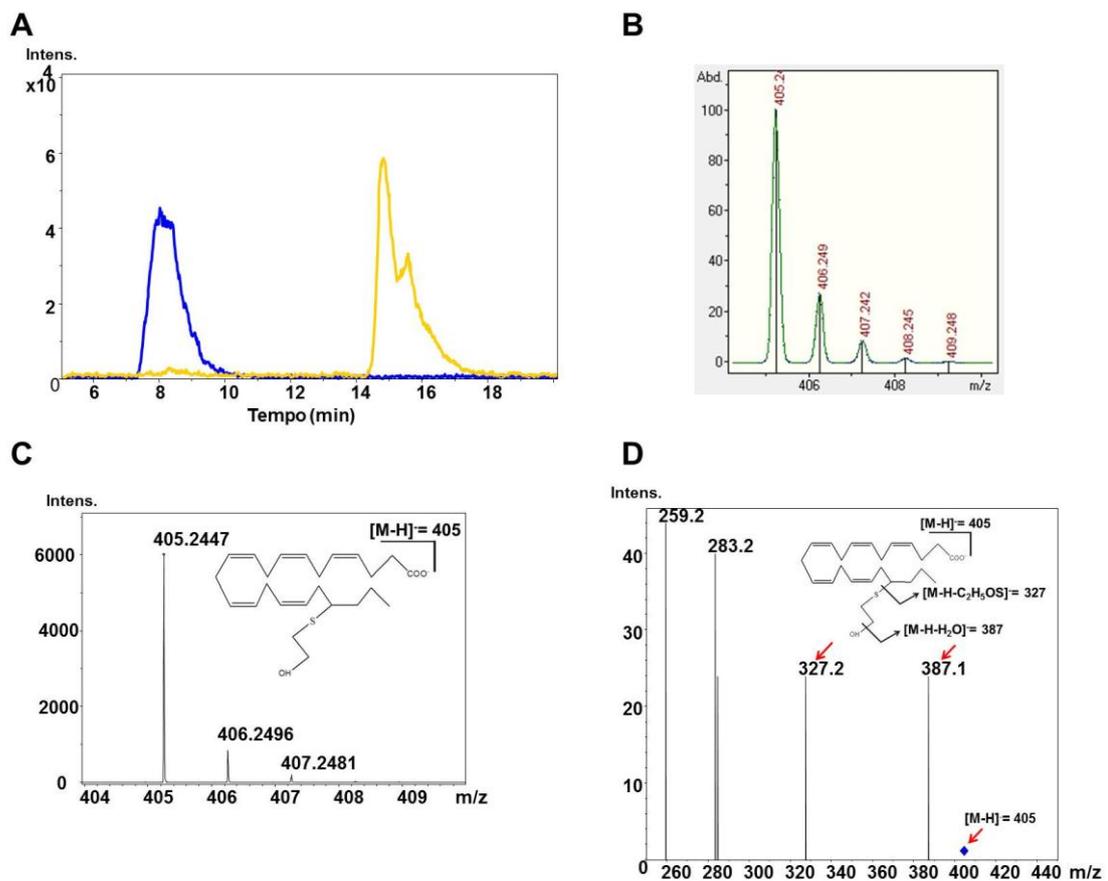


Figura 21. Análise da participação dos tióis na agregação de SOD1 por ESI-Q-ToF. **(A)** cromatograma de LC-MS/MS selecionando-se a massa do DHA (m/z 327, em amarelo) e do aduto DHA- β -mercaptoetanol (m/z 405, em azul) **(B)** distribuição isotópica padrão para o aduto formado pela incubação do DHA com o β -mercaptoetanol **(C)** espectro do aduto formado pela incubação de DHA com β -mercaptoetanol. **(D)** espectro de MS/MS por MRM da massa 405 correspondente ao aduto da interação covalente do ácido graxo com o agente redutor β -mercaptoetanol. As incubações foram feitas a 37 °C por 24 h. Foram incubados DHA (250 μ M) com β -mercaptoetanol (1,43 M).

O espectro de massa do pico com tempo de retenção em 8 min mostrou um pico monoisotópico do íon molecular em m/z de 405,2447 (figura 21C) o qual está de acordo com o esperado (m/z 405, 2463). O padrão isotópico esperado para o aduto está representado na figura 20B. Este mesmo padrão isotópico foi observado na amostra (Figura 21C). Para confirmação da presença deste aduto, foi feita a fragmentação da molécula. Puderam-se observar as massas correspondentes à quebra da molécula de β -mercaptoetanol, restando a massa do ácido graxo (DHA) (m/z = 327, modo negativo) (Figura 21D). Outra fragmentação observada foi a perda de uma água da estrutura representada pelo m/z de 387 (Figura 21D). Estes dados

mostram que há uma possível reação do tipo “ene-tiol” e que este tipo de reação poderia estar contribuindo para o processo de agregação da proteína.

Observada a participação dos tiois na agregação de SOD1, experimentos foram realizados com o intuito de avaliar a participação das cisteínas livres na proteína (Cys6 e Cys111). Para esta finalidade, mutações sítio-dirigido foram feitas, substituindo as cisteínas 6 e 111 por serinas. Estas mutações foram feitas tanto para enzima antioxidante SOD1 na sua forma selvagem (WT), como para a enzima com a mutação G93A. Na figura 22, observa-se que foram obtidas as mutações desejadas. Na figura 22A e 22C, houve a troca de UGC (Cys) por uma UCC (Ser), confirmando-se a mutação C6S e C111S, respectivamente para enzima WT. Na figura 22D e F, obteve-se C6S e C111S para a enzima G93A, respectivamente. Nos retângulos em B e E, está representada a glicina que é trocada por alanina na mutação G93A não presente na WT.

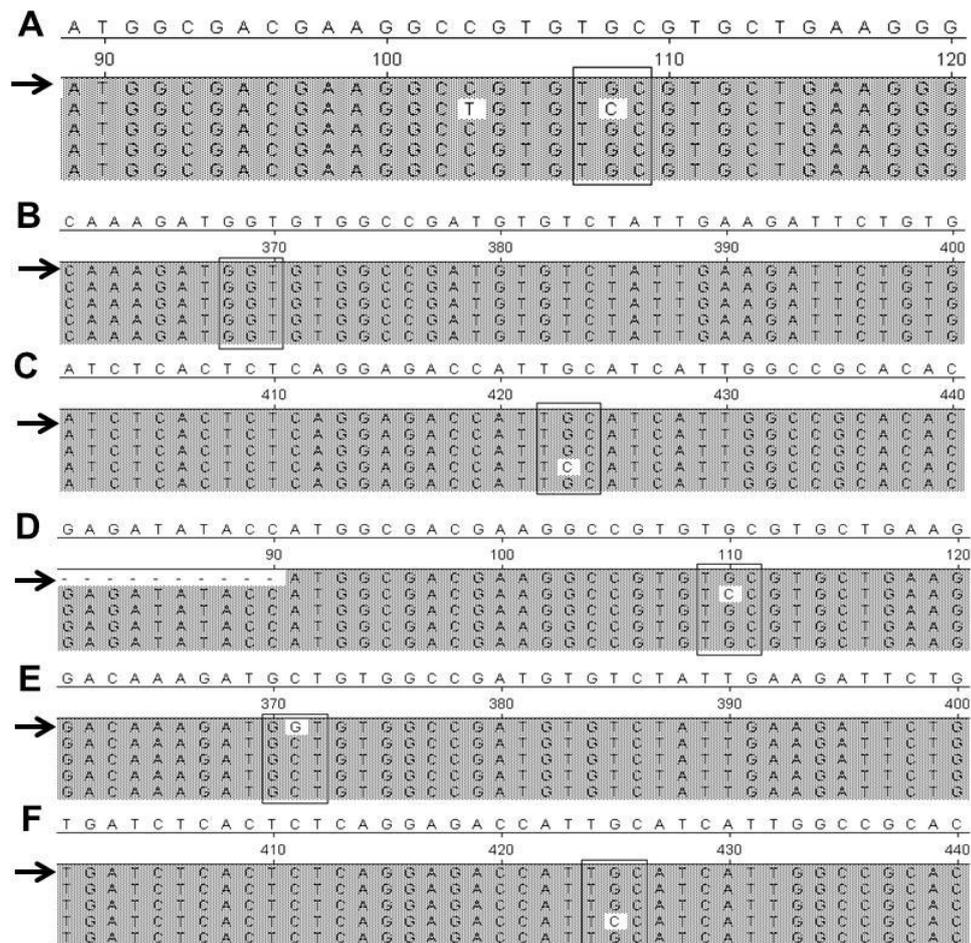


Figura 22. Resultado do sequenciamento para verificação da geração das mutações. Em (A) C6S WT e (C) C111S WT. Em (D) C6S G93A e (F) C111S G93A. O retângulo em (B) destaca a glicina que é trocada por alanina na mutação G93A (E) não presente na WT. Os retângulos em (A), (C), (D) e (F) destacam as mutações respectivas. As flechas indicam a sequência da enzima hSOD1.

4.5.6 Avaliação da participação das cisteínas livres na estrutura da enzima antioxidante SOD1

Através de diálise das enzimas mutadas, foi feita a remoção dos metais para obtenção das formas apo desejadas, a apo-SOD1 WT C6S, apo-SOD1 WT C111S, apo-SOD1 G93A C6S e apo-SOD1 G93A C111S. A partir disto, incubações controle (ausência de DHA) e na presença de DHA foram feitas para todas as proteínas, incluindo aqui as proteínas sem as mutações nas cisteínas (apo-SOD1 WT e apo-SOD1 G93A). O percentual da proteína que sofreu agregação foi analisado por cromatografia de exclusão e calculado com base na diminuição na intensidade do

pico correspondente à proteína intacta (representados por % de formação de agregados, figuras 23A e 23B). Na figura 23A, que representa a forma selvagem da proteína (WT), pode-se observar uma formação de agregados de SOD1 significativa apenas nas incubações contendo a proteína não mutada na presença de DHA. Estes dados nos levam a uma interpretação em que, ambas as cisteínas (Cys 111 e Cys 6) são importantes para a formação do agregado e que quando há a troca destas cisteínas livres por serina, a oligomerização/agregação da SOD1 é inibida e, de certa forma, há uma “proteção” à agregação. O mesmo não acontece com as enzimas “duplo mutantes” apo-SOD1 G93A C6S e apo-SOD1 G93A C111S. Para a SOD1G93A (Figura 23B), a mutação C6S inibiu a agregação enquanto a mutação C111S mostrou não afetar o mecanismo de formação dos agregados, sugerindo que a presença de apenas uma das cisteína livres (a Cys 6) é suficiente para que a agregação ocorra. As diferenças observadas na propensão a agregação entre os duplo mutantes WT e G93A deve-se à maior instabilidade estrutural da G93A principalmente na sua forma apo. A partir destes resultados pode-se concluir que a participação mais efetiva no processo de agregação é da cisteína 6, já que a formação de agregados mais significativa ocorreu com a apo-SOD1 G93A C111S.

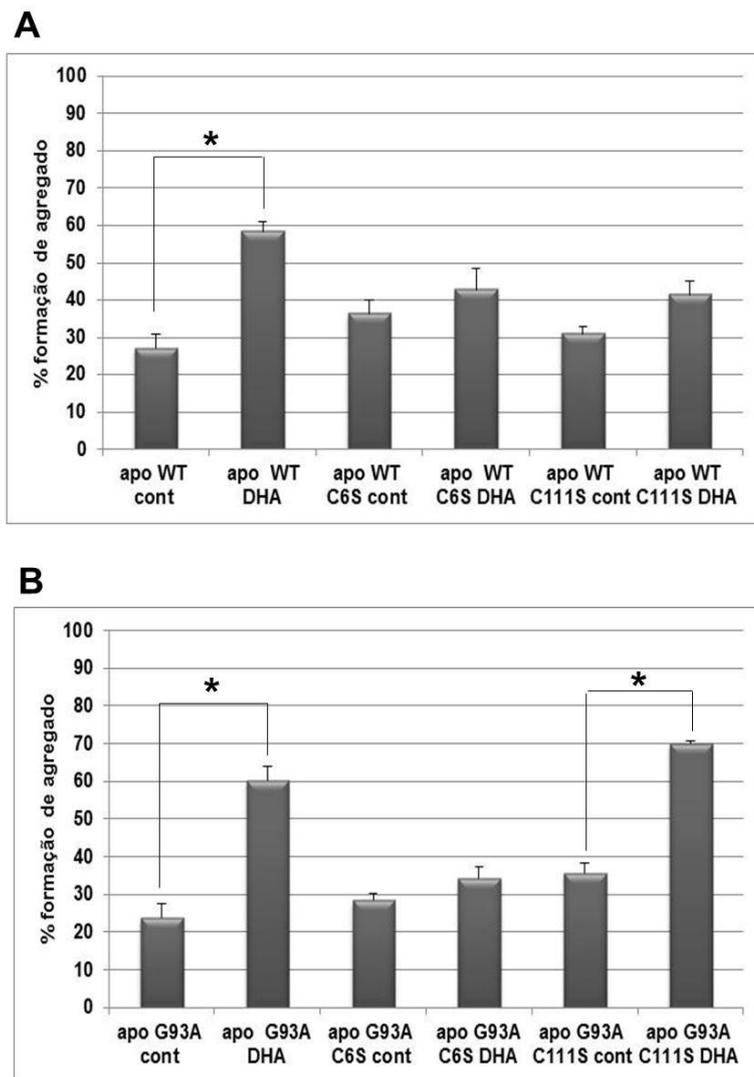


Figura 23. Ensaio de participação das cisteínas livres na oligomerização de SOD1 induzida por DHA. Em (A) gráfico de barras representando % de formação de agregados em incubações de apo-SOD1 WT e suas respectivas mutações (C6S e C111S), na ausência e presença de DHA. Em (B) apo-SOD1 G93A e suas respectivas mutações (C6S e C111S), em incubações na presença e ausência de DHA, representadas em % de formação de agregados em gráfico de barras. * $p < 0,001$.

Em resumo, os dados obtidos com as enzimas duplo-mutantes confirmam a participação das cisteínas livres no processo de agregação. Estudos anteriores mostram que a Cys 111 teria uma participação mais efetiva no processo de agregação da enzima selvagem por estar mais exposta ao solvente do que a cisteína 6 (CHEN *et. al.*, 2012; COZZOLINO *et. al.*, 2008; FUJIWARA *et. al.*, 2007). Porém, estes estudos analisaram a enzima na sua forma metalada (holo), o que pode explicar o resultado controverso ao obtido neste trabalho. A falta dos metais,

juntamente com a mutação (neste caso, a G93A) poderia levar a uma mudança na conformação da proteína, favorecendo a participação da cisteína 6.

Sendo assim, experimentos adicionais foram realizados com o objetivo de caracterizar a participação dos tiois e do DHA na agregação de SOD1.

4.5.7 Efeito do pH na agregação da SOD1

Estudos mostram que as cisteínas 111 e 6, apresentam-se livres na estrutura da enzima antioxidante Cu, Zn-SOD, sendo a Cys 111 mais exposta ao solvente e propensa à modificação oxidativa (CHEN *et. al.*, 2012; LIU *et. al.*, 2000). Também, sabe-se que a reatividade dos tiois é aumentada na sua forma desprotonada (S^-). Ainda, o grupo tiol é levemente ácido e o valor do pKa é dependente da estrutura e do ambiente local. Em peptídeos, o pKa é normalmente ~ 9 , mas em proteínas este valor pode apresentar-se tão baixo quanto 3,5 (REDDIE e CARROL, 2008). A esse respeito, ensaios foram realizados para avaliar a dependência das cisteínas da proteína na forma de tiolato (S^-) para que ocorra a interação entre o DHA e a SOD1.

Utilizando-se o mesmo tampão fosfato de todas as análises, diferentes pHs foram preparados (pH 3,5; 4,7; 5,5; 6,2; 7,4 e pH 8,4) para incubação das formas apo-SOD1 (WT e G93A) na presença do DHA. Os resultados mostram que mesmo nas incubações controle (na ausência de DHA) há formação de agregados, fato que ocorre pela instabilidade da proteína na sua forma apo. Isto ocorre tanto para apo-SOD1 WT (Figura 24A) como para apo-SOD1 G93A (Figura 24C). Para as incubações de apo-SOD1 WT (Figura 24B) na presença do DHA, a agregação é aumentada nos valores de pH 7,4 e 8,4, diferente do que ocorre em pH ácido. O mesmo foi observado com a forma apo-SOD1 G93A (Figura 24D). Estes dados

sugerem que o processo de agregação na presença do DHA é favorecido em $\text{pH} > 6.2$. Considerando que o pK dos tióis é mais baixo na proteína, em pH fisiológico os tióis provavelmente encontram-se desprotonados, favorecendo a formação de agregados na presença do DHA.

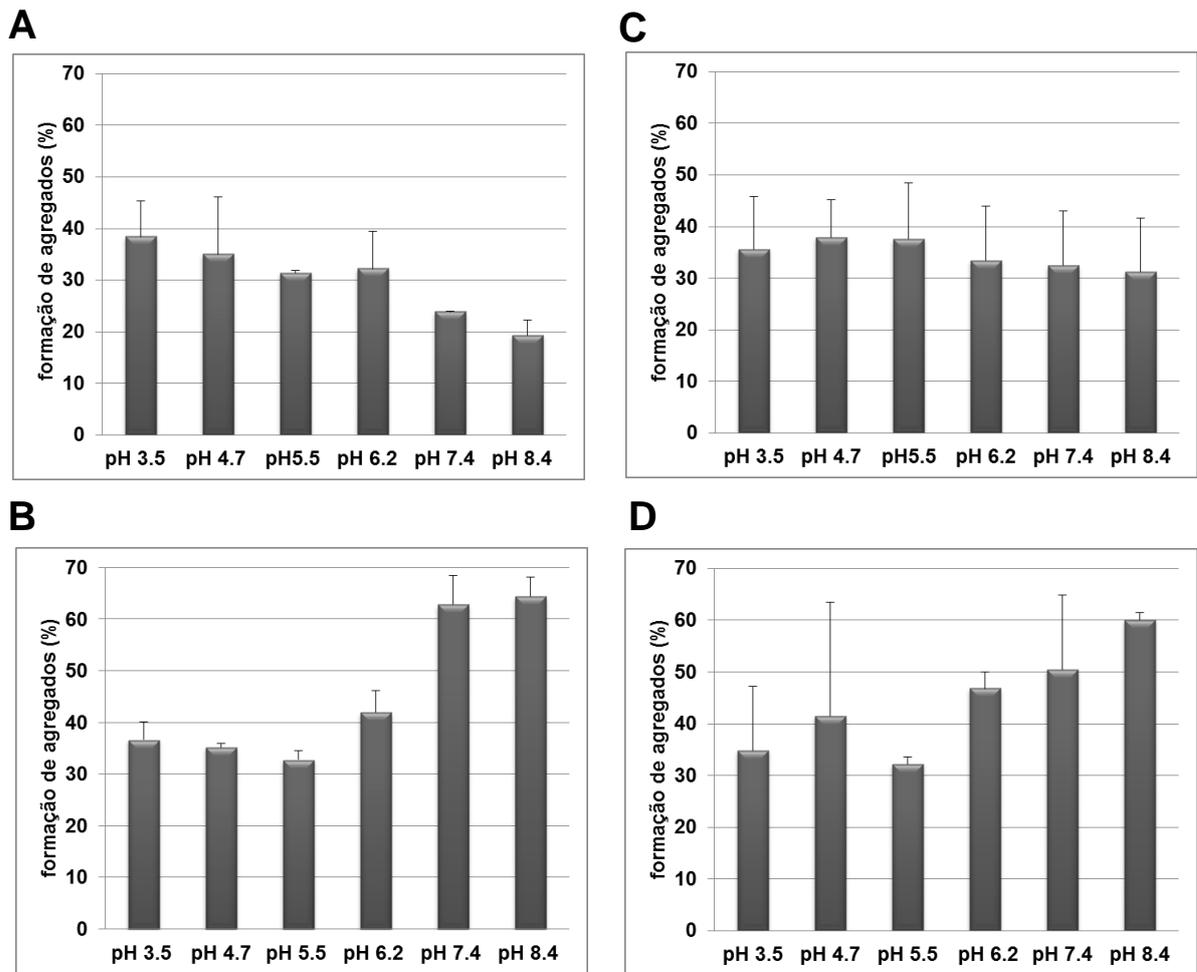


Figura 24. Gráficos em barra representativos da porcentagem de formação de agregados da SOD1 dependente dos resíduos de cisteína na forma de tiolato. As incubações foram feitas em uma faixa de pH de 3,5 a 8,4 na ausência e presença de DHA (**A**) % de agregação de apo-SOD1 WT na ausência de DHA (**B**) % de agregação de apo-SOD1 WT na presença de DHA (**C**) % de agregação de apo-SOD1 G93A na ausência de DHA (**D**) % of apo-SOD1 G93A na presença de DHA.

4.6 Ensaios de fluorescência para análise da formação de estruturas do tipo amilóide e ambiente hidrofóbico

A formação de agregados também pode estar relacionada à exposição de resíduos hidrofóbicos da proteína, o que favorece a formação de agregados do tipo

β -amilóide (KIM *et. al.*, 2005). Para analisar o DHA e DHAOOH neste contexto, foram utilizadas as probes fluorescentes bis-ANS, cuja fluorescência é intensificada em ambientes hidrofóbicos (MUSCI *et. al.*, 1985) e o benzotiazol, Tioflavina S, que aumenta a intensidade de fluorescência quando se liga a estruturas do tipo β -amilóide (LEVINE III, H., 1999). Os ensaios com a probe Tioflavina S mostraram que, de fato, a apo-SOD1 WT e apo-SOD1 G93A (Figura 25E e 25F) são mais propensas à agregação quando tratadas com DHA, sugerindo a formação de estruturas β -amilóide sob estas condições. Em paralelo, a probe fluorescente bis-ANS (Figura 25B e 25C) mostrou que houve um aumento na superfície hidrofóbica de ambas as proteínas após a exposição ao DHA. O aumento em termos de exposição do ambiente hidrofóbico foi mais pronunciado na apo-SOD1 G93A (Figura 25C) do que na apo-SOD1 WT (Figura 25B). A interação da proteína com o DHA faz com que a proteína sofra alterações conformacionais que levam a exposição de regiões hidrofóbicas e este processo culmina com a formação de estruturas do tipo beta-amilóide.

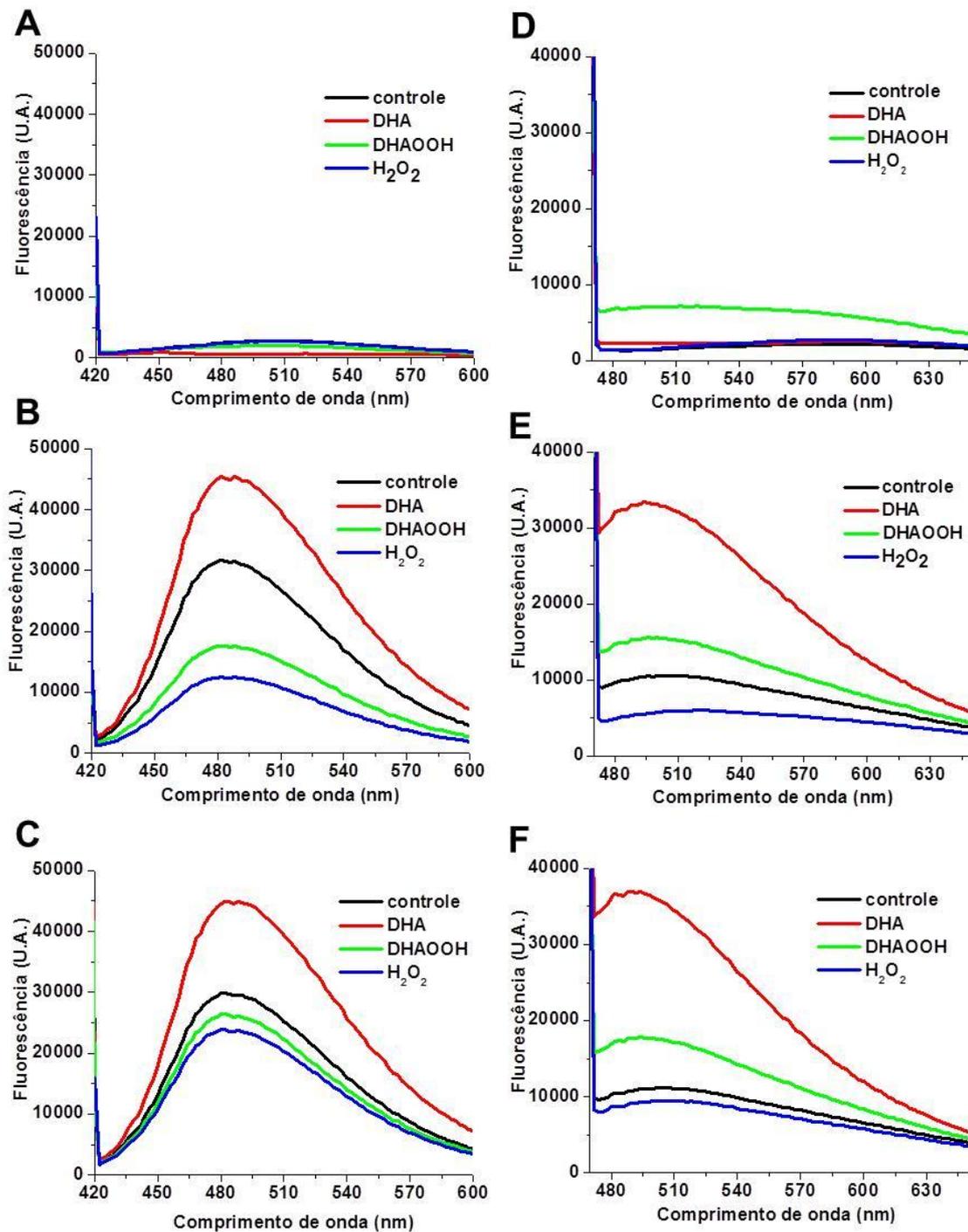


Figura 25. Efeito do DHA, DHAOOH e H₂O₂ em relação ao aumento de superfície hidrofóbica e formação de agregados β -amilóide de hapo-SOD1 WT e hapo-SOD1 G93A. **(A)** mostra o espectro de fluorescência da probe bis-ANS incubada com 250 μ M de DHA, DHAOOH ou H₂O₂ sem a proteína, **(B)** com 10 μ M da apo-SOD1WT; ou **(C)** com 10 μ M da apo-SOD1 G93A. **(D)** mostra o espectro de fluorescência da tioflavina S de incubações contendo 250 μ M de DHA, DHAOOH ou H₂O₂ sem proteína; **(E)** com 10 μ M da hapo-SOD1 WT; ou **(F)** com 10 μ M da hapo-SOD1 G93A. Todas as reações foram incubadas por 24h a 37°C.

4.7 Análise morfológica dos agregados de SOD1 induzidos por DHA

Em algumas doenças neurodegenerativas, incluindo a ELA, proteínas mutantes formam materiais insolúveis, que são agregados proteicos fibrilosos chamados “amiloide” (FURUKAWA *et. al.*, 2008). Alguns trabalhos analisaram esses agregados morfológicamente, buscando uma explicação para formação desses agregados e a possível participação destes na degeneração neuronal (KIM *et. al.*, 2005; FURUKAWA *et. al.*, 2008; CHOI *et. al.*, 2010). Com este intuito, para análise morfológica dos agregados formados, incubações de apo-SOD1 WT e apo-SOD1 G93A (Figura 26) foram feitas a 37°C em tampão fosfato 50 mM, pH7.4, contendo 150mM de NaCl e 100 µM de DTPA por 24 horas na presença (painéis D e F) e ausência de DHA (painéis C e E). Também foram preparadas amostras branco para esse experimento (1) tampão fosfato 50 mM, pH 7.4, contendo 150 mM de NaCl e 100 µM de DTPA, adicionando-se MeOH (painel A) (2) tampão fosfato 50 mM, pH 7.4, contendo 150 mM de NaCl e 100 µM de DTPA, adicionando-se DHA (painéis B). Todas as amostras foram aplicadas (10 µL) em uma base de latão e analisadas por MEV. Os dados obtidos mostram a formação de estruturas granulares quando há a presença do DHA (Figura 26, painel D e F), com um perfil diferente de imagem encontrado nos brancos ou controles. Devido à instabilidade da forma mutante da proteína (G93A), pode-se observar a formação de uma estrutura granular na ausência de DHA após as 24h de incubação. Porém, a formação destas estruturas é mais pronunciada na incubação da forma apo-SOD1 G93A com DHA (Figura 26, painel F). Estes dados corroboram com estudos que compararam a estabilidade entre as formas holo e apo da SOD1 na presença de lipídios. Estes estudos mostraram que a forma apo da proteína é mais instável e, quando incubada com

lipídios insaturados, formam-se grandes estruturas amorfas (KIM *et. al.*, 2005; CHOI *et. al.*, 2010).

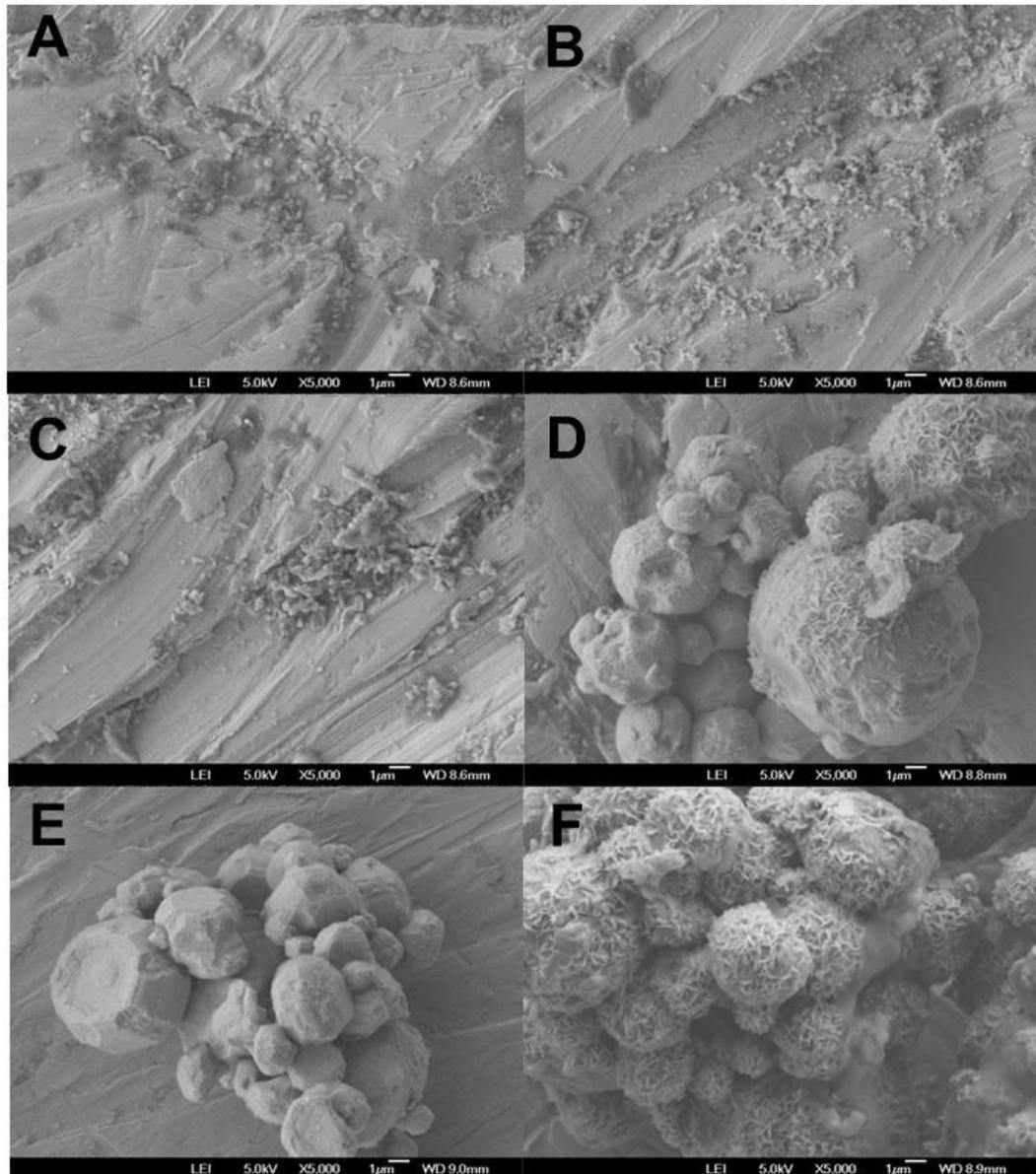


Figura 26. Imagem de MEV das amostras incubadas. (A) branco com MeOH (B) branco com DHA (C) apo-SOD1 WT (10 μ M) na ausência de DHA (D) apo-SOD1 WT (10 μ M) na presença de DHA (250 μ M) (E) apo-SOD1 G93A (10 μ M) na ausência de DHA (F) apo-SOD1 G93A (10 μ M) na presença de DHA. A barra de escala é de 1 μ m.

A propensão para agregação da proteína nativa é uma propriedade complexa que envolve uma série de parâmetros biofísicos e físico-químicos incluindo, carga líquida, hidrofobicidade da superfície e estrutura secundária intrínseca. Portanto,

seria esperado que espécies de SOD1 agregadas apresentassem propriedades físico-químicas e estruturais diferentes das proteínas no estado nativo (SHAW E VALENTINE, 2007). Visando avaliar a mudança na estrutura secundária das proteínas apo SOD1 WT e mutante (G93A), quando tratadas com DHA, foi feita análise em CD.

4.8 Dicroísmo circular (CD)

Os resultados mostram um pico característico de uma estrutura folha- β para as formas apo sem o tratamento (controle) (Figura 27A e B, em preto), compreendendo 40% de estruturas folha- β e 60% random coil (Figura 27C). Ao tratar com DHA a apo-SOD1 WT (Figura 27A, em vermelho e Figura 27C) apresenta uma modificação de estrutura correspondente a um aumento de 40% de folhas- β para 90%. Para a forma apo-SOD1 G93A (Figura 27B, em vermelho e Figura 27C), o aumento foi de 40% para 60% de folhas- β . Juntamente com os resultados anteriores, estes dados mostram uma mudança estrutural nas formas apo da enzima antioxidante SOD1 induzida por DHA, resultando em um aumento de hidrofobicidade da superfície, formando estruturas granulares de SOD1.

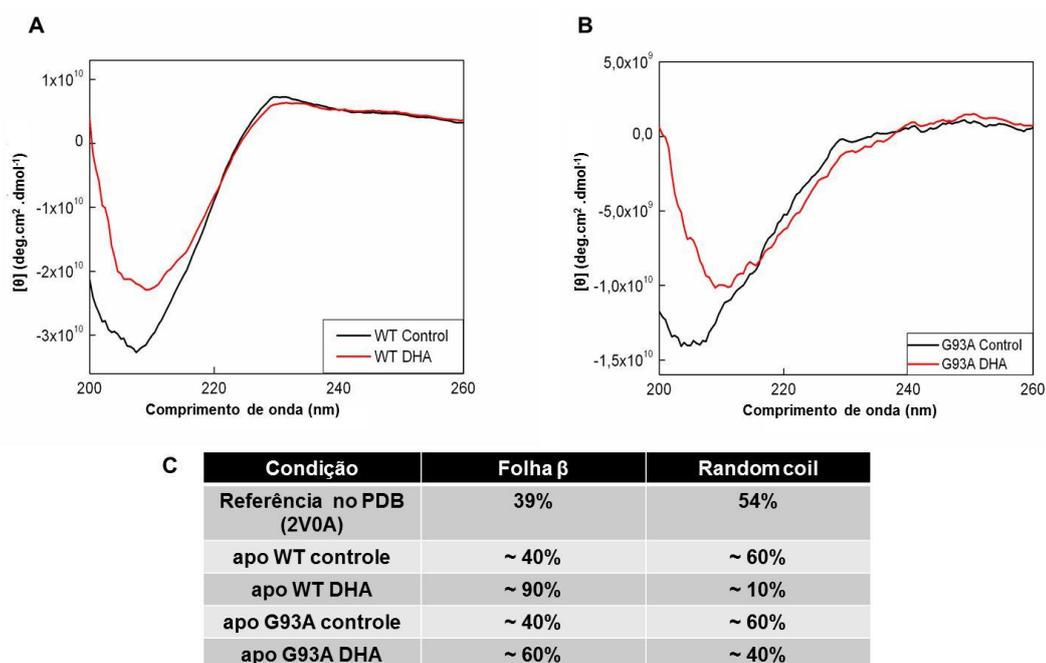


Figura 27. Espectro de CD UV-distante. **(A)** modificação da estrutura secundária da apo-SOD1 WT tratada com DHA (vermelho) em relação ao controle (preto). **(B)** mostra o efeito do DHA na estrutura secundária da apo-SOD1 G93A (vermelho) em relação ao controle (preto). Em **(C)** tabela representativa dos valores em porcentagem de folhas e random coil presentes nas proteínas apo WT e apo G93A.

4.9 Agregação da SOD1 induzida por ácidos graxos e dependência de insaturação.

Em estudo realizado por Kim e colaboradores, foi observada agregação da SOD1 na presença de ácidos graxos poliinsaturados (KIM *et. al.*, 2005). Estes autores testaram a agregação da SOD1 na presença dos ácidos graxos esteárico (18:0), linoléico (18:2) e araquidônico (20:4) e verificaram um aumento na agregação associada a um aumento na insaturação.

Com o intuito de confirmar estas observações e também comparar o efeito de outros ácidos graxos menos insaturados com o DHA, foram realizadas incubações da apo-SOD1 WT (10 μ M) ou G93A(10 μ M) por 2, 6 e 24 h, a 37°C, pH 7,4 com diferentes ácidos graxos, entre eles, ácido esteárico (18:0), ácido oléico (18:1), ácido

linoléico (18:2), ácido araquidônico (20:4) e DHA (22:6), todos na concentração de 250 μ M.

Os resultados obtidos a partir da análise em cromatografia de exclusão mostraram um perfil diferente de agregação entre as formas apo WT (Figura 28A) e G93A (Figura 28B). Estes cromatogramas são representativos da incubação de 24 h para ambas as proteínas. Para todas as incubações contendo ácidos graxos e para todos os tempos de incubação ocorreu agregação apenas com os ácidos graxos insaturados, como mostrado no primeiro pico dos cromatogramas (tempo de retenção de 5 minutos que corresponde a aproximadamente 1400 kDa). Portanto, com o ácido esteárico, um ácido saturado, o mesmo não ocorreu.

Os dados cromatográficos foram tratados e apresentados na forma de gráficos de barras indicando a porcentagem de SOD1 intacta remanescente após 2h, 6h e 24 h de incubação (Figuras 28C e 28D). Os dados mostram uma diminuição tempo-dependente da proteína intacta. Estes resultados podem ser observados pela intensidade do pico (% relativa) obtido nas incubações das apo-SOD1 com diferentes ácidos graxos em tempos diferentes, onde, com o aumento do tempo de incubação há uma diminuição na intensidade do pico relativo à apo-SOD1 WT (Figura 28C) e apo-SOD1G93A (Figura 28D). Esta diminuição está diretamente relacionada com o aumento da formação de agregados. Analisados os resultados, pode-se observar que a agregação é mais pronunciada na enzima mutante (apo-SOD1 G93A), nos gráficos claramente observa-se mais de 50% de formação de agregados já a partir de 2 h de incubação (Figura 28D). Importante destacar, novamente, que esta agregação acontece apenas na presença de ao menos uma insaturação, sendo a incubação com o DHA, que possui 6 insaturações, uma das mais propensas à agregação.

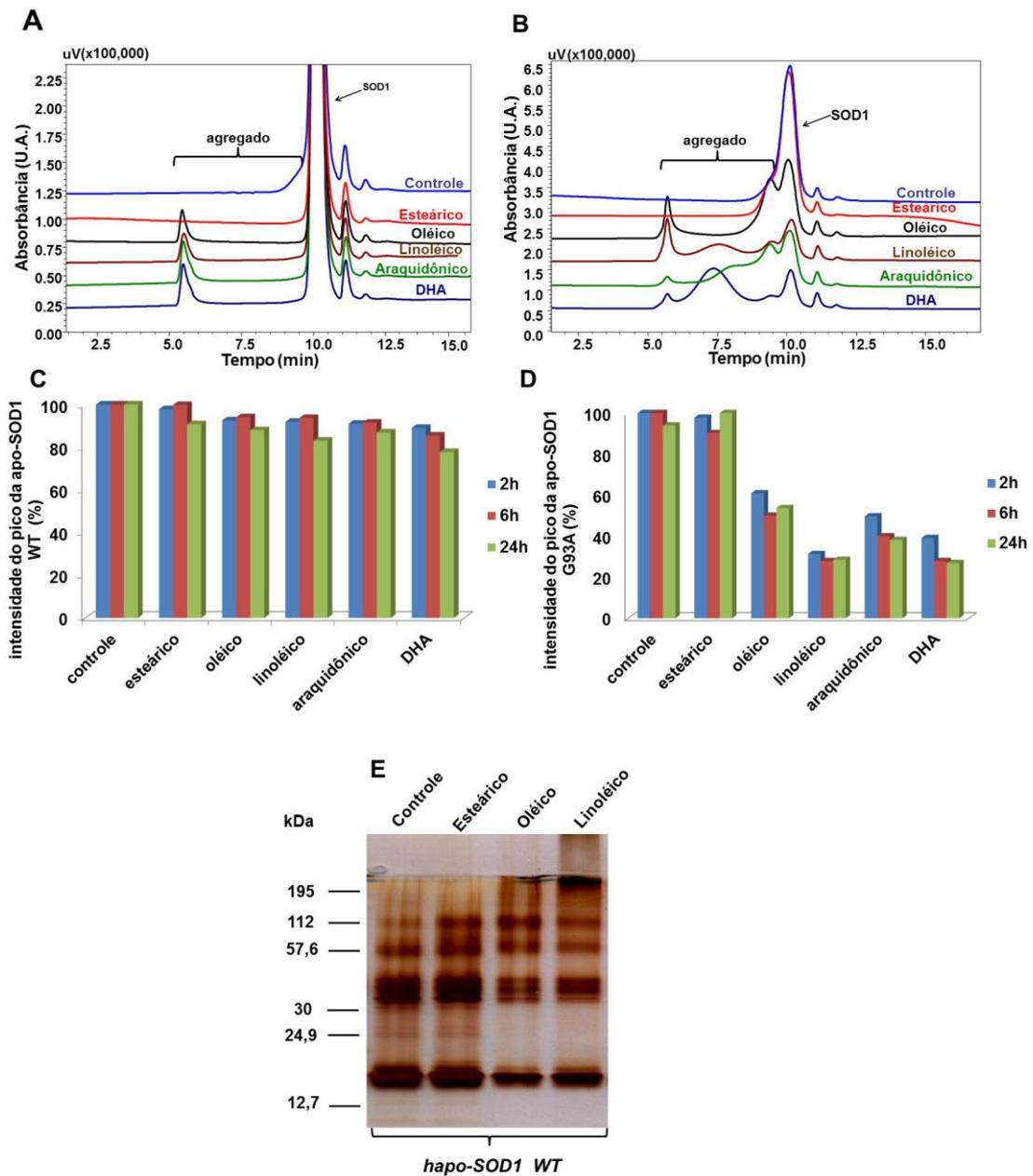


Figura 28. Efeito dos diferentes ácidos graxos (ácido esteárico, linoléico, araquidônico, DHA) na oligomerização da apo-SOD1 WT e G93A por cromatografia de exclusão e SDS-PAGE. Em (A) cromatogramas das incubações de 24 h da hapo-SOD1 WT com diferentes ácidos graxos (B) cromatogramas da hapo-SOD1 G93A incubada com diferentes ácidos graxos por 24 h (C) gráfico em barras representando a intensidade do pico da hapo-SOD1 WT em % em diferentes tempos, 2 h (em azul), 6 h (em vermelho) e 24 h (em verde) (D) intensidade do pico da hapo-SOD1 G93A em % após incubação com diferentes ácidos graxos em diferentes tempos representadas em gráfico de barras (E) SDS-PAGE das incubações de hapo-SOD1 WT com diferentes ácidos graxos e com mesmo número de carbonos, esteárico (18:0), oléico (18:1) e linoleico (18:2).

Incubações de ácidos graxos com o mesmo número de carbonos, porém com número de insaturações diferentes, foram feitas com a apo-SOD1 WT. Os ácidos graxos utilizados foram o ácido esteárico (18:0), o ácido oleico (18:1) e o ácido

linoleico (18:2) e as incubações analisadas por SDS-PAGE (Figura 28E). Estes dados mostraram a formação de espécies de alto peso molecular a partir de ao menos uma insaturação, visto que, novamente, a incubação com o ácido esteárico (18:0), sendo saturado, mostrou-se tal como a incubação controle.

4.10 Efeito da conformação *cis* e *trans* na oligomerização das formas hapo-SOD1 WT e hapo-SOD1 G93A

Após análise da participação das insaturações na cadeia dos ácidos graxos na formação de agregados, foi analisado o papel da conformação dos ácidos graxos. Para tanto, análises foram feitas incubando as formas apo (SOD1 WT e G93A) com o ácido oleico (*cis*-9 -18:1) e também com o seu análogo, o ácido elaídico (*trans*-9 -18:1). As amostras foram analisadas por cromatografia de exclusão, sendo que somente na incubação com o ácido oleico (linha verde em ambos cromatogramas) observou-se a formação de agregados (tempo de retenção de ~ 5,5 a 9 minutos.) tanto na incubação com a forma apo-SOD1 WT (Figura 29A) como com a apo-SOD1 G93A (Figura 29B). A incubação das proteínas na presença do ácido elaídico (linha vermelha em ambos cromatogramas) compara-se à incubação controle (linha preta), ou seja, não houve efeito na agregação de SOD1. Estes dados mostram claramente a dependência do ácido graxo na sua forma *cis* para que a agregação ocorra. A linha azul (Figuras 29A e 29B) mostra o resultado da agregação induzida pelo DHA, como um controle para observação da agregação dependente da conformação dos ácidos graxos.

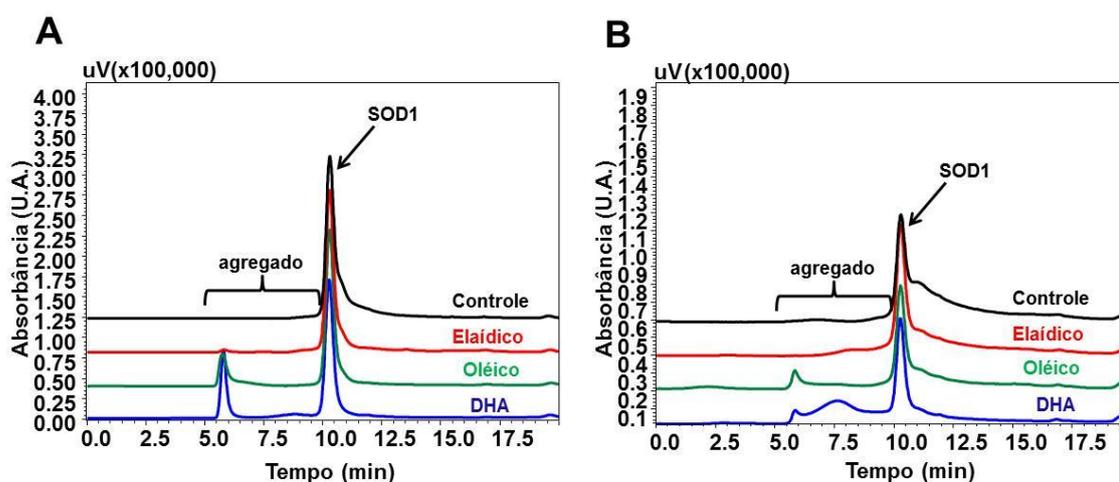


Figura 29. Cromatografia de exclusão para análise da conformação do ácido graxo. **(A)** incubações da apo-SOD1 WT com os ácidos oleico (em verde) e eláidico (em vermelho). Como controle somente a proteína (em preto). **(B)** incubações da apo-SOD1 G93A com os ácidos oleico (em verde) e eláidico (em vermelho). Como controle somente a proteína (em preto). Em azul **(A)** e **(B)** cromatograma da incubação da proteína com o DHA na forma cis confirmando a formação de agregado.

4.11 Caracterização do dímero covalente de SOD1

A oxidação de proteínas implica na geração de diferentes tipos de ligações cruzadas (inter e intra-proteína). Estas podem ser formadas: (a) pela adição de amino grupos de lisina ao grupo carbonila de uma proteína oxidada, (b) por interação de dois radicais centrados no carbono obtido pela abstração $\cdot\text{OH}$ -dependente de átomos de hidrogênio a partir do esqueleto polipeptídico ou cadeias laterais de aminoácidos (na ausência de oxigênio), (c) por adições de Michael de cadeias laterais de histidina, lisina e cisteína à ligações duplas insaturadas de aldeídos formados na oxidação de ácidos graxos poli-insaturados e/ou (d) a oxidação de grupos sulfidríla de resíduos de cisteína para formar ligações cruzadas ($-\text{S}-\text{S}-$) (STADTMAN, 2004).

Os DHAOOH, a partir de dados obtidos nesse trabalho, não foram capazes de formar agregados de SOD1, porém foi observada a formação de um dímero resistente à ação do agente redutor, o β -mercaptoetanol. Não há estudos que

mostram a formação de dímero covalente de apo-SOD1 induzido por DHAOOH. Apenas há um estudo que caracterizou um dímero covalente da Cu, Zn-SOD *in vitro* que envolve a recombinação dos radicais triptofanila provenientes do ataque do radical carbonato no resíduo Trp32 (MEDINAS, 2010).

4.11.1 Experimentos de EPR

Com o objetivo de caracterizar este dímero, experimentos de EPR foram conduzidos usando PBN como captador de spin, em busca de identificar a participação de radicais livres de lipídios na dimerização de SOD1. Estes ensaios identificaram um aduto radical centrado em carbono ($a_H=3,79$ G e $a_N=15,55$ G) (Figura 30A) (STOLZE *et. al.*, 2000) após 24 h de incubação do DHAOOH (250 μ M) em PBS a 37°C. Sendo o rendimento deste aduto de apenas 20 nM. Entretanto, nas incubações contendo apo-SOD1 G93A (10 μ M) e DHAOOH (250 μ M), os níveis do aduto foram bastante diminuídos, sugerindo que a proteína agiria como varredora do radical formado. Outros dados obtidos (Figura 30B) mostraram que o hidroperóxido de lipídeo sofre termólise quando incubado à temperatura de 37°C por 24h, confirmando dado da literatura (SEVANI e HOCHSTEIN, 1985).

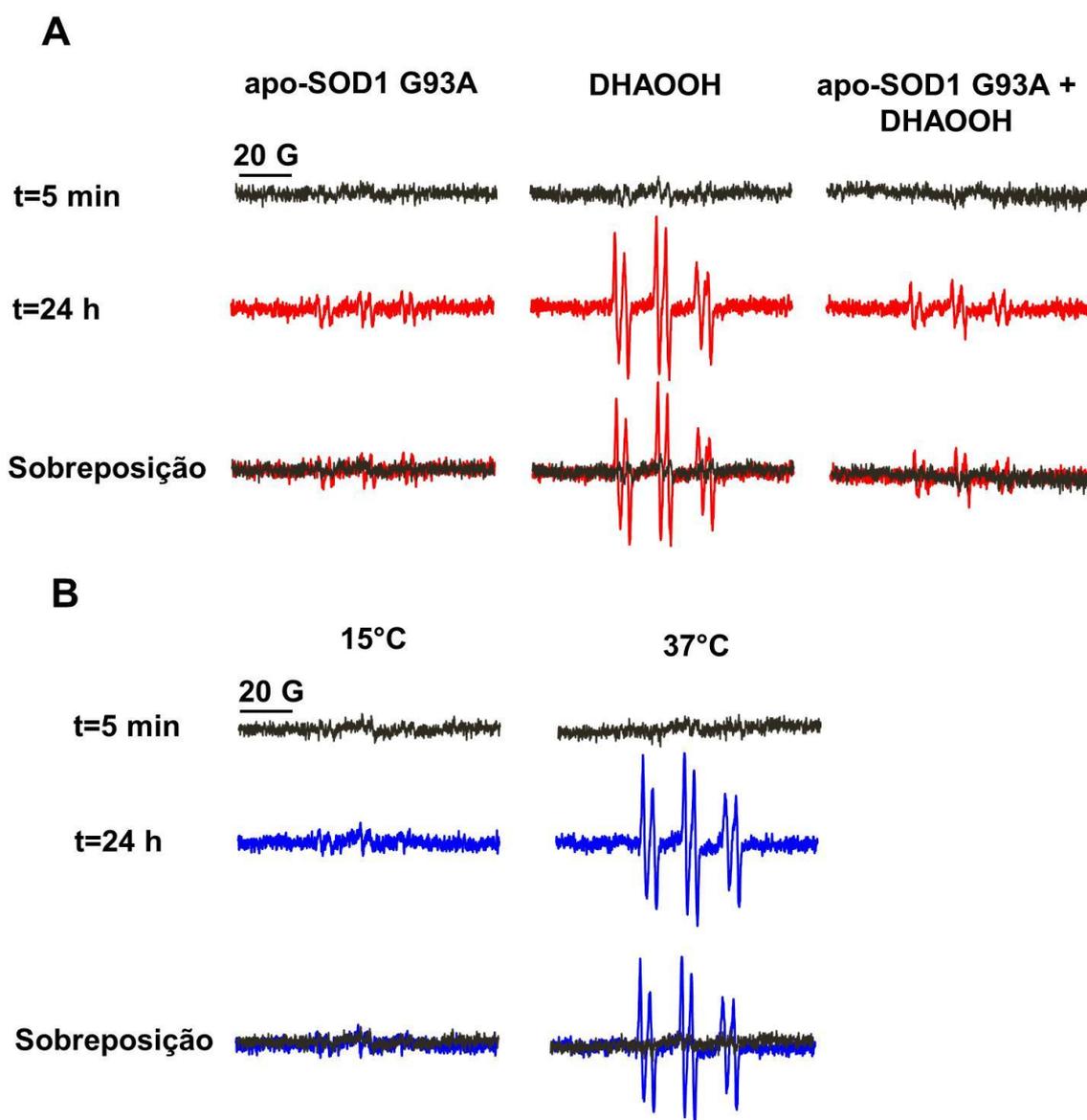


Figura 30. Experimentos de EPR utilizando o captador de spin PBN. Em **(A)** incubações controle de apo-SOD1 G93A 10 μ M e a outra de DHAAOH 250 μ M, ambas com tampão fosfato 50 mM, DTPA 100 μ M, NaCl 150 mM, chelex e PBN 50mM e incubação da apo-SOD1 G93A com o DHAAOH e PBN 50 μ M. Todas incubações à 37°C por 5 min e 24 h **(B)** incubações de DHAAOH com tampão descrito anteriormente em diferentes temperaturas (15°C e 37°C) por 5 min e 24 h.

4.11.2 Relevância do peróxido orgânico para dimerização de SOD1

Para avaliar se a formação do dímero covalente da SOD1 é especificamente induzida pelos hidroperóxidos do DHA (DHAAOH), primeiramente foi avaliada a incubação da proteína mutada com o produto da redução do DHAAOH, o hidróxido do DHA (DHAOH). Como esperado, não houve formação de dímero covalente de

SOD1 (Figura 31A). O mesmo foi observado para o H_2O_2 e para o terti-butil hidroperóxido (Figura 31B). Para os hidroperóxidos do ácido linoleico, uma discreta banda de tamanho referente ao dímero de SOD1 pode ser observada, porém para o DHAOOH esta banda é bem mais pronunciada. Estes dados em conjunto reforçam um mecanismo de formação do dímero de SOD1 dependente dos DHAOOH. Porém, para comprovar que este dímero não é um artefato da análise em SDS-PAGE, tratamentos foram feitos após as 24 h de incubação da apo-SOD1 G93A na ausência e presença do DHAOOH, utilizando-se guanidina, DTT e IAA (como descrito no item 3.24). Como mostra a figura 31C, mesmo após os tratamentos há formação efetiva do dímero covalente.

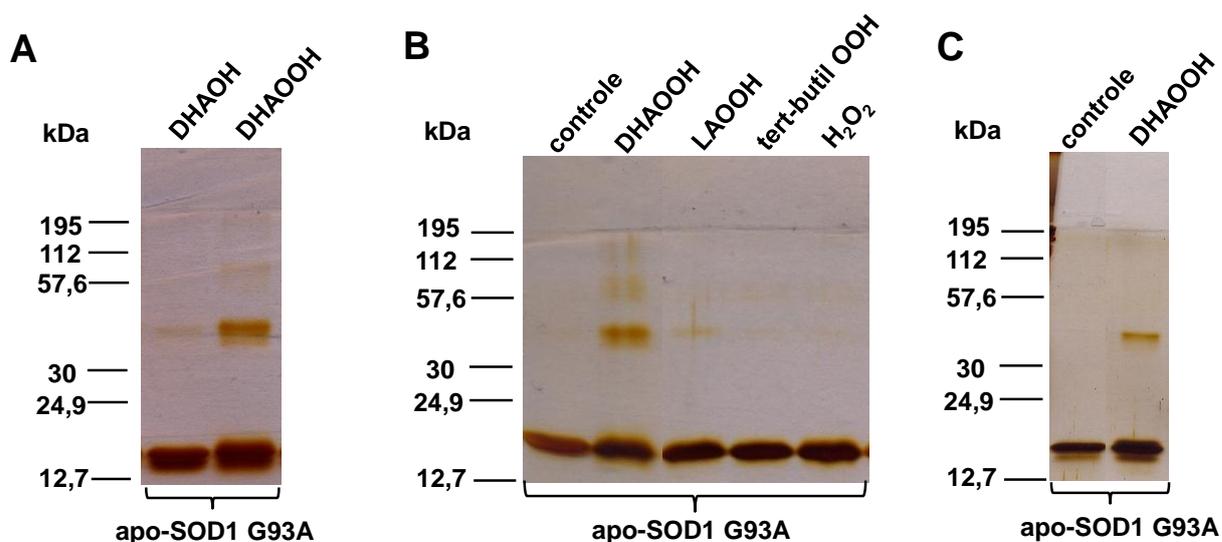


Figura 31. SDS-PAGE sob condição redutora para análise da relevância do peróxido orgânico para dimerização de SOD1. Em (A) incubação de apo-SOD1 G93A (10 μ M) com DHAOH (250 μ M) e DHAOOH (250 μ M). Em (B) incubações com diferentes peróxidos, sendo eles hidroperóxidos do ácido linoléico (LAOOH), DHAOOH, tert-butil hidroperóxido e H_2O_2 , todos na concentração de 250 μ M. (C) Incubações de apo-SOD1 G93A durante 24 h à 37°C na ausência e presença de DHAOOH após tratamento com agentes redutores (DTT) e alquilantes (IAA).

4.11.3 Análise do dímero covalente de SOD1 por espectrometria de massas.

Tendo por objetivo sequenciar esse dímero resistente à ação do agente redutor, foi feita a digestão trípica. Após digestão, realizou-se a análise por espectrometria de massas com o objetivo de sequenciar o dímero covalente. Os resultados mostraram que o protocolo de digestão utilizado não foi adequado. Os cromatogramas (Figura 32A) mostram o perfil de peptídeos da SOD1 digerida apresentando poucos picos, tanto para o monômero como para o dímero. O espectro de massas correspondente aos peptídeos tanto da reação controle (monômero), como para o dímero covalente, apresentou massas muito altas, de sítios de clivagem perdidas, onde a enzima não conseguiu acessar o sítio de digestão (m/z entre 1800-3700 Da), não permitindo uma análise mais detalhada da proteína dado a baixa variabilidade de peptídeos (Figura 32B). Foi observado que íons na região de 560-2160 Da indicam uma digestão ineficiente, sendo assim, não foi possível obter informações da estrutura tridimensional, a partir da sequência primária. Porém, as análises destes dados propiciaram a comparação dos peptídeos obtidos com a digestão das amostras (monômero e dímero) com a sequência mutada G93A da proteína (release 2013_01, número de acesso P00441).

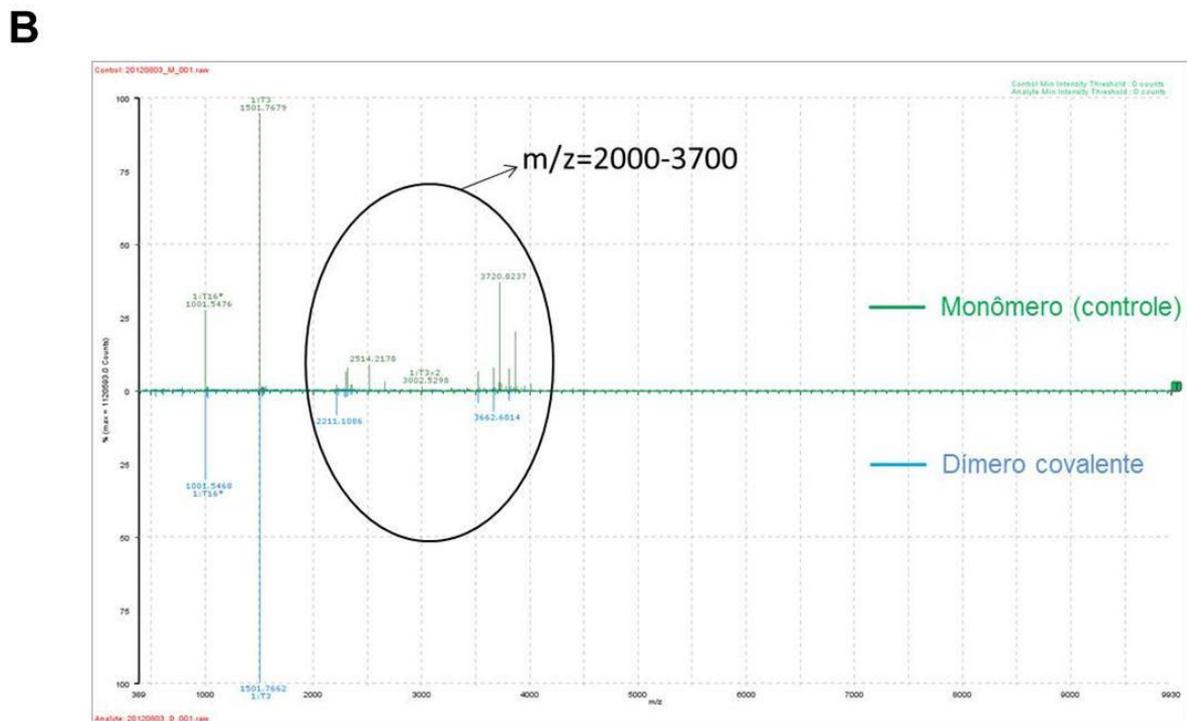
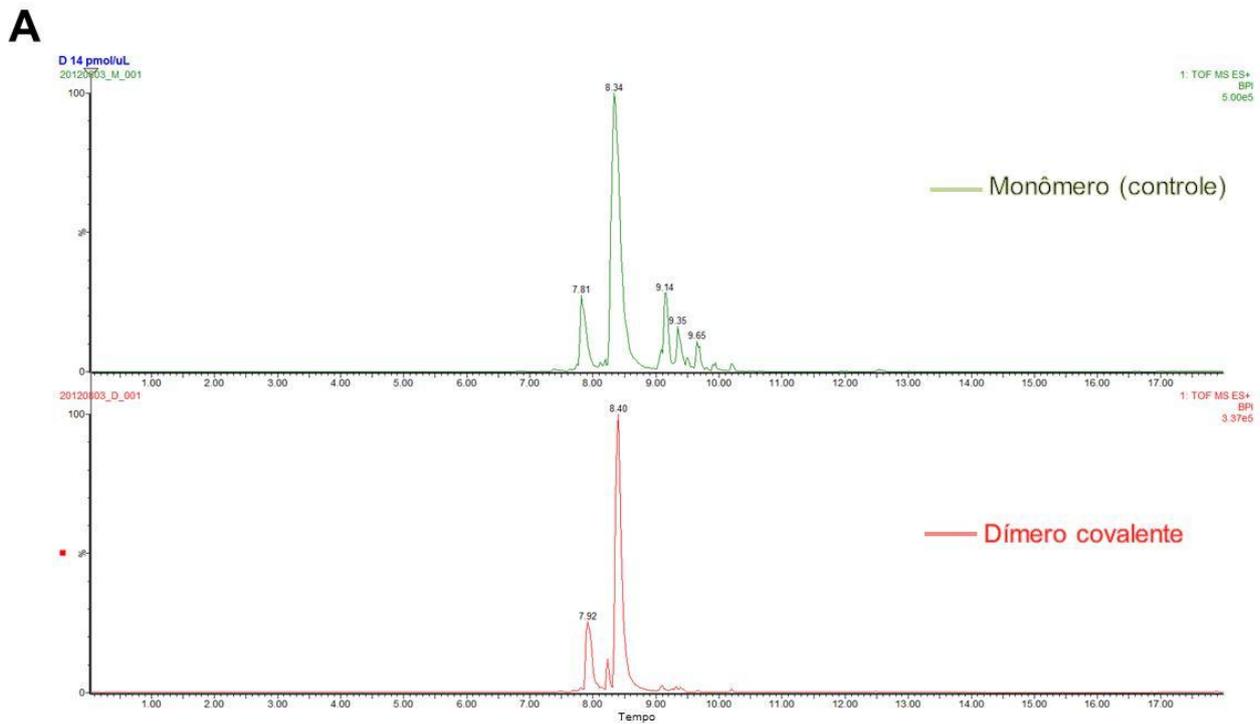


Figura 32. Cromatograma e espectro de amostras de apo-SOD1 G93A digeridas. Em (A) o cromatograma na cor verde representa a incubação controle (monômero); o cromatograma na cor vermelha representa o dímero covalente. Em (B) o espectro na cor verde representa a incubação controle (monômero). Em azul está representado o espectro do dímero covalente. O círculo marca as massas altas em ambos espectros ($m/z=2000-3700$ Da).

Com o auxílio do software BioPharmalyNX v.1.3.1, fornecido pela empresa Waters do Brasil, a qual colaborou com estes dados de espectrometria de massas, foi possível observar dois peptídeos candidatos a apresentar modificação conformacional. Estes dois peptídeos (MATKAVC: 722,3455 Da e KGGNEESTK: 948, 4512 Da) (Figura 33) aparecem como sendo exclusivos na amostra do monômero digerido, ou seja, não aparece na amostra de dímero indicando que pode ter ocorrido algum tipo de modificação na conformação. Novos protocolos estão sendo aplicados para obtenção de uma melhor digestão da SOD1 e confirmação da modificação por outros métodos como mobilidade iônica.

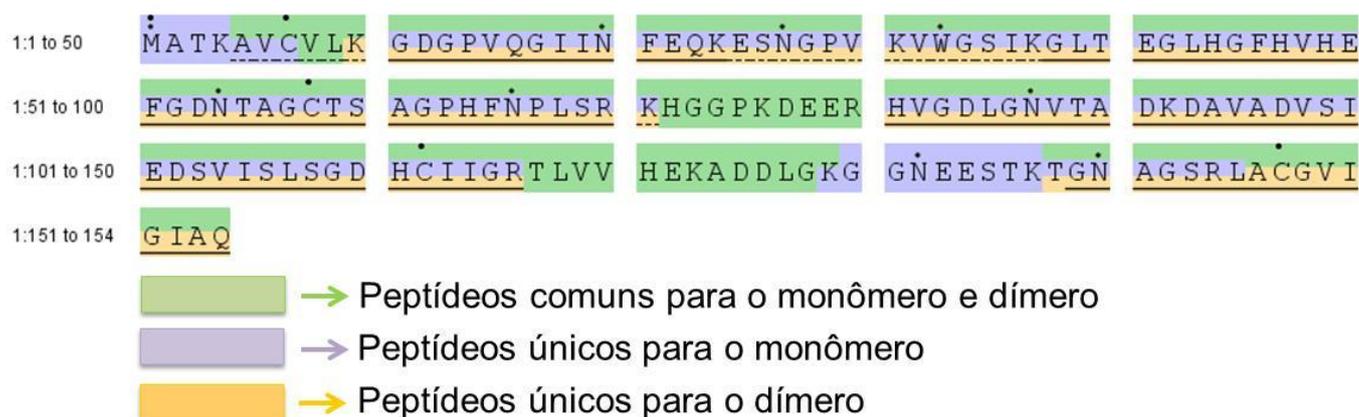


Figura 33 Análise comparativa dos peptídeos da apo-SOD1 G93A controle (monômero), dímero e banco de dados de proteínas (PDB, código 3GZO). Em verde, estão representados os peptídeos comuns ao monômero e ao dímero. Em lilás, estão representados os peptídeos encontrados somente no monômero e em amarelo estão representados os peptídeos únicos para o dímero.

5. Discussão geral

5.1 Agregação de SOD1 induzida por DHA

Sabe-se que 20% dos casos familiares da doença esclerose lateral amiotrófica (fELA) são causados por mutações no gene que codifica a enzima antioxidante citosólica, a Cu, Zn superóxido dismutase (SOD1) (BANCI *et. al.*, 2008; FURUKAWA *et. al.*, 2008). Esta mutação resulta em um ganho de função tóxica pela enzima, cuja origem bioquímica ainda é desconhecida (JIANJUN *et. al.*, 2009). Alguns estudos sugerem que o ganho de função tóxica está relacionado ao efeito pró-oxidante da SOD1 mutante (RAKHIT *et. al.*, 2002) e / ou a formação de agregados citotóxicos de SOD1 (KIM *et. al.*, 2005; RAKHIT *et. al.*, 2002; VALENTINE *et. al.*, 2005). Um estudo recente mostrou que o tipo selvagem (WT) de SOD1 humana, na falta de ambos os íons de metal, forma oligômeros da proteína do tipo amilóide. Esta oligomerização parece acontecer entre os dois resíduos de cisteínas livres (Cys 6 e Cys 111) presentes na estrutura da SOD1 (BANCI *et. al.*, 2008).

O ácido docosahexaenoico é um ácido graxo ômega-3, altamente insaturado e presente em altas concentrações no cérebro, especialmente na substância cinzenta. A oxidação do DHA gera produtos potencialmente citotóxicos e genotóxicos, como os hidroperóxidos (KAWAI *et. al.*, 2006; GARDNER, 1989; PORTER *et. al.*, 1995). Estudos já mostraram que a interação entre o DHA e outras proteínas está envolvida em doenças, como a doença de Parkinson (DE FRANCESCHI *et. al.*, 2009; SHARON *et. al.*, 2003), mas a relação com a fELA ainda não é conhecida.

Este estudo investigou os efeitos e a importância do DHA e seus hidroperóxidos na etiologia da Esclerose Lateral Amiotrófica familiar (fELA). Confirmando a dependência dos tióis da proteína para formação de agregados induzidos pelo DHA foi feita a alquilação das cisteínas livres pelo agente alquilante ácido iodoacético (NalAc) (SCOTT e BAZAN, 1989). Como esperado, não houve formação de agregados quando a proteína foi pré-incubada com NalAc. Além disto, a incubação com IAF revelou uma possível interação forte entre as cisteínas da SOD1 e o DHA, já que 38% das cisteínas permaneceram comprometidas mesmo após o tratamento com β -mercaptoetanol.

A participação das cisteínas livres foi confirmada a partir de mutações sítio dirigida nas formas apo de SOD1 WT e G93A. Para a WT, ambas as cisteínas livres devem estar expostas para a agregação, enquanto para a enzima mutante G93A, apenas uma é suficiente para formação de agregados, sendo a mais efetiva a cisteína 6 que, provavelmente, está mais exposta para interação com o DHA. Estes agregados tem a participação efetiva do DHA interagindo de forma covalente com a proteína, como mostraram os dados de recuperação de DHA. Apenas 48% do DHA incubado foram recuperados da incubação com a apo-SOD1 WT e 57% recuperados da incubação com a apo-SOD1 WT. A partir dos dados obtidos, propõe-se que o mecanismo geral da reação entre o DHA e os tióis livres (na forma de tiolato) da proteína seja do tipo “ene-tiol”, onde o tiolato reage com a dupla ligação (neste caso do ácido graxo) em uma reação catalisada por uma base segundo proposto por SHOSTAKOVSKII *et. al.*(1968). Esta proposta foi previamente confirmada no ensaio utilizando o β -mercaptoetanol. Observou-se um aduto formado pela reação entre o DHA e o β -mercaptoetanol, aduto este confirmado por espectrometria de massas apresentando um m/z de 405. Todos os dados corroboram para um mecanismo de

interação covalente entre a proteína antioxidante SOD1 na sua forma apo com o ácido graxo (DHA) dependente de tiol (“ene-tiol”), formando agregados granulares da proteína. Esta agregação é dependente das cisteínas livres da SOD1, especialmente a cisteína 6 e é induzida apenas pelo ácido graxo, não sendo induzida pelos hidroperóxidos de DHA. Além disso, o fato de parte do monômero da SOD1 ser regenerado a partir do agregado na presença do redutor β -mercaptoetanol sugere o envolvimento de pontes de disulfeto na formação do agregado. Portanto, em conjunto os dados sugerem um mecanismo de agregação de DHA, através de um processo envolvendo a exposição de superfícies hidrofóbicas, formação de pontes de disulfeto e também de possíveis cross-links envolvendo reações do tipo “ene-tiol”.

5.2 Dimerização covalente de SOD1 induzida por DHAOOH

Os hidroperóxidos de DHA não foram capazes de formar agregados de SOD1, porém foi observada a formação de um dímero resistente à ação do agente redutor, o β -mercaptoetanol. Não há estudos que mostram a formação de dímero covalente de SOD1 induzido por DHAOOH. Algumas análises foram feitas com o objetivo de caracterizar este dímero covalente. Primeiramente, ensaios de EPR buscaram observar a participação de radicais de lipídio na dimerização de SOD1. Estes dados mostraram a formação de um aduto radicalar centrado no carbono com rendimento de 20 nM. Porém, o sinal representante destes adutos foi bem diminuído na presença da proteína. Outro fato relevante foi a dependência da temperatura para observação do sinal relativo aos radicais, indicando uma termólise dos DHAOOH em 24 horas a 37°C, confirmando dado da literatura (SEVANI e HOCHSTEIN, 1985).

Este fato é relevante, pois as condições utilizadas de temperatura correspondem às condições fisiológicas. Juntamente com o resultado observado, em que a proteína diminuiu o sinal de EPR, estes dados podem indicar uma formação *in situ* dos radicais a partir da termólise dos DHAOOH. Outra informação obtida foi a especificidade do hidroperóxido de DHA para levar à formação do dímero resistente à ação do agente redutor. Outros hidroperóxidos orgânicos foram incubados com a apo-SOD1, porém somente os DHAOOH foram capazes de induzir a formação do dímero covalente com maior intensidade. Para confirmar o mecanismo de formação deste dímero, foi feita a digestão trípica da incubação de apo-SOD1 G93A com o DHAOOH. Porém, os resultados mostraram uma digestão ineficiente, sendo necessária a aplicação de outros protocolos para obtenção de resultado conclusivo, mesmo assim foram obtidas informações importantes, sendo encontrados dois peptídeos candidatos a modificações. Estes peptídeos podem ter sofrido alguma modificação, pois não foram encontrados nas amostras de dímero digerido.

6 Conclusões

Globalmente, os resultados obtidos nesse trabalho, mostram que a agregação de SOD1 é induzida por DHA através de um mecanismo envolvendo tiois livres, sendo a cisteína 6 particularmente importante na agregação da mutante G93A. A participação dos tíois no processo de oligomerização se dá possivelmente através da formação de pontes dissulfeto intercadeia e/ou também através de uma reação “ene-tiol” envolvendo tiolato e a dupla ligação do ácido graxo. Este agregado possui morfologia granular e sua formação ocorre através de um processo em que a proteína sofre um desdobraimento com exposição de regiões hidrofóbicas e formação de estruturas do tipo beta-amilóide. Ao contrário do DHA, os hidroperóxidos induzem formação de dímeros covalentes de SOD1. O dímero parece ser formado por peróxidos orgânicos, sendo os hidroperóxidos do DHA os mais efetivos. Apesar dos ensaios terem sido realizados com a forma apo na presença de quelantes, análises por EPR identificaram a presença de radicais centrados no carbono, provavelmente gerados a partir da termólise do DHAOOH. Desta forma, apesar de ainda não elucidado a formação do dímero covalente induzido por DHAOOH é um dado novo que merece ser estudado em mais detalhes para compreender o papel do DHA no desenvolvimento da doença Esclerose Lateral Amiotrófica.

7 Perspectivas

Para melhores esclarecimentos em relação aos mecanismos envolvidos e o papel biológico do dímero covalente e dos agregados de SOD1, temos como planos de prosseguimento:

- 1 Caracterizar a reação “ene-tiol” entre a SOD1 e o DHA, começando por reações *in vitro* de DHA e Glutathione, em seguida analisar com a proteína. As análises serão feitas por espectrometria de massas;
- 2 Aplicar novo protocolo de digestão trípica, utilizando um surfactante para melhorar acessibilidade da tripsina à proteína;
- 3 Caracterização dos dímeros formados por DHAOOH através de espectrometria de massas (Q-Tof-MS/MS);
- 4 Analisar a citotoxicidade (morte celular) e degradação pelo proteassoma dos agregados/dímero de SOD1 induzidos por DHA/DHAOOH.
- 5 Avaliar os tipos de agregados (solúveis e insolúveis)

8 Referências Bibliográficas

AKI, T. et al. Molecular cloning and functional characterization of rat delta-6 fatty acid desaturase. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 255, p. 575-9, 1999.

ALESSANDRI, J-M. et al. Incorporation of docosahexaenoic acid into nerve membrane phospholipids: bridging the gap between animals and cultured cells. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, p. 702-710, 2003.

ALVAREZ, B. et al. Inactivation of human Cu,Zn superoxide dismutase by peroxynitrite and formation of histidiny radical. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, p. 813-822, 2004.

ARNESON, K. O.; ROBERTS II, L. J.; BROWN, H. A. Measurement of Products of Docosahexaenoic Acid Peroxidation, Neuroprostanes, and Neurofurans. **Methods of Enzymology**, v. 433, p. 127-143, 2007.

ARNESON, K. O.; ROBERTS, L. J. Measurement of products of docosahexaenoic acid peroxidation, neuroprostanes, and neurofurans. **Lipidomics and Bioactive Lipids**, v. 433, p. 127-143, 2007.

AYALA, S. Fate of linoleic, arachidonic, and docosa-7,10,13,16-tetraenoic acids in rat testicles. **The Journal of Lipid Research**, v. 14, p. 296-305, 1973.

BANCI, L. et al. SOD1 and Amyotrophic Lateral Sclerosis: Mutations and Oligomerization. **PLoS ONE**, v. 3, p. e1677, 2008.

BANCI, L. et al. Structural and dynamic aspects related to oligomerization of apo SOD1 and its mutants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, p. 6980-5, 2009.

BANCI, L. Metal-free superoxide dismutase forms soluble oligomers under physiological conditions: A possible general mechanism for familial ALS. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, p. 11263-11267, 2007.

BARNHAM, K. J.; MASTERS, C. L.; BUSH, A. I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 205-214, 2004.

BATY, J. W.; HAMPTON, M. B.; WINTERBOURN, C. C. Detection of oxidant sensitive thiol proteins by fluorescence labeling and two-dimensional electrophoresis. **Proteomics**, v. 2, p. 1261-1266, 2002.

BENOV et. al. Purification and characterization of the Cu,Zn SOD from *Escherichia coli*. **Free Radical Biology and Medicine**, v.21, p. 117-121, 1996.

BERNOUD-HUBAC, N. et al. Formation of Highly Reactive gamma -Ketoaldehydes (Neuroketals) as Products of the Neuroprostane Pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 30964-30970, 2001.

BOILLÉE, S.; VANDE VELDE, C.; CLEVELAND, D. ALS: A Disease of Motor Neurons and Their Nonneuronal Neighbors. **Neuron**, v. 52, p. 39-59, 2006.

BOSCO D.A. et al. Mutant FUS proteins that cause amyotrophic lateral sclerosis incorporate into stress granules. **Human Molecular Genetics**, v. 19, p. 4160–4175, 2010.

BRECKENRIDGE, W. C. et al. Adult rat brain synaptic vesicles II Lipid composition. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 320, p. 681-686, 1973.

BROERSEN, K. et al. α -Synuclein Adopts an α -Helical Conformation in the Presence of Polyunsaturated Fatty Acids To Hinder Micelle Formation. **Biochemistry**, v. 45, p. 15610-15616, 2006.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods of Enzymology**, v. 52, p. 302-10, 1978.

CARBALLAL, S. et al. Sulfenic Acid Formation in Human Serum Albumin by Hydrogen Peroxide and Peroxynitrite. **Biochemistry**, v. 42, p. 9906-9914.

CHANG, M. et al. Dynamics of Docosahexaenoic Acid Metabolism in the Central Nervous System: Lack of Effect of Chronic Lithium Treatment. **Neurochemical Research**, v. 24, p. 399-406, 1999.

CHEN, X. et al. Oxidative Modification of Cysteine 111 Promotes Disulfide Bond-Independent Aggregation of SOD1. **Neurochemical Research**, v. 37, p. 835-845, 2012.

CHINTA, S. J.; ANDERSEN, J. K. Redox imbalance in Parkinson's disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1780, p. 1362-1367, 2008.

CHISOLM, G. M.; STEINBERG, D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, p. 1815-26, 2000.

CHOI, I. Lipid molecules induce the cytotoxic aggregation of Cu/Zn superoxide dismutase with structurally disordered regions. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1812, p. 41-8, 2010.

COLE, S. L.; VASSAR, R. BACE1 structure and function in health and Alzheimer's disease. **Current Alzheimer research**, v. 5, p. 100-120, 2008.

COUTHOUIS, J. Evaluating the role of the FUS/TLS-related gene EWSR1 in amyotrophic lateral sclerosis. **Human Molecular Genetics**, v. 21, p. 2899-911, 2012.

COZZOLINO, M. et al. Cysteine 111 affects aggregation and cytotoxicity of mutant Cu,Zn-superoxide dismutase associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 866-874, 2008.

CROW, J. P. et al. Decreased zinc affinity of amyotrophic lateral sclerosis-associated superoxide dismutase mutants leads to enhanced catalysis of tyrosine nitration by peroxynitrite. **Journal of Neurochemistry**, v. 69, p. 1936-1944, 1997.

DE FRANCESCHI, G. et al. Molecular Insights into the Interaction between [alpha]-Synuclein and Docosahexaenoic Acid. **Journal of Molecular Biology**, v. 394, p. 94-107, 2009.

DE ZWART, L. L. et al. Biomarkers of free radical damage : Applications in experimental animals and in humans. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 202-226, 1999.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 11, p. 81-128, 1991.

FAROOQUI, A.; HORROCKS, L.; FAROOQUI, T. Deacylation and reacylation of neural membrane glycerophospholipids. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 14, p. 123-135, 2000.

FAROOQUI, A.; HORROCKS, L.; FAROOQUI, T. Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 106, p. 1-29, 2000.

FERDINANDUSSE, S. et al. Identification of the peroxisomal β -oxidation enzymes involved in the biosynthesis of docosahexaenoic acid. **Journal of Lipid Research**, v. 42, p. 1987-1995, 2001.

FORMAN, H. J.; DICKINSON, D. A. Introduction to serial reviews on 4-hydroxy-2-nonenal as a signaling molecule. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, p. 594-596, 2004.

FRANKEL, E. N. Chemistry of free radical and singlet oxidation of lipids. **Progress in Lipid Research**, v. 23, p. 197-221, 1984.

FRANKEL, E. N. Review. Recent advances in lipid oxidation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 54, p. 495-511, 1991.

FRIDOVICH, I. The biology of oxygen radicals. **Science**, v. 201, p. 875-880, 1978.

FUJIWARA, N. et al. Oxidative modification to cysteine sulfonic acid of cys111 in human copper-zinc superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 35933-35944, 2007.

FURUKAWA, Y. et al. Complete Loss of Post-translational Modifications Triggers Fibrillar Aggregation of SOD1 in the Familial Form of Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Journal of chemical biology**, v. 283, p. 24167–24176, 2008.

GAMOH, S. et al. Chronic administration of docosahexaenoic acid improves reference memory-related learning ability in young rats. **Neuroscience**, v. 93, p. 237-41, 1999.

GARCIA, M. C. et al. Effect of Docosahexaenoic Acid on the Synthesis of Phosphatidylserine in Rat Brain Microsomes and C6 Glioma Cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 70, p. 24-30, 1998.

GARDNER, H. W. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 7, p. 65-86, 1989.

GIROTTI, A. W. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. **The Journal of Lipid Research**, v. 39, p. 1529-1542, 1998.

GORDON, W. C.; BAZAN, N. G. Docosahexaenoic acid utilization during rod photoreceptor cell renewal. **The Journal of Neuroscience**, v. 10, p. 2190-2202, 1990.

GRIMM, M. O. W. et al. Docosahexaenoic Acid Reduces Amyloid β Production via Multiple Pleiotropic Mechanisms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 14028-14039, 2011.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3.ed. New York: Oxford University Press, 1999.

HOLMAN, R. T. Control of polyunsaturated acids in tissue lipids. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 5, p. 183-211, 1986.

HOLUB, B. J. Differential utilization of 1-palmitoyl and 1-stearoyl homologues of various unsaturated 1,2-diacyl-sn-glycerols for phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine synthesis in rat liver microsomes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 253, p. 691-696, 1978.

HORROCKS, L. A.; FAROOQUI, A. A. Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 70, p. 361-72, 2004.

HSIEH, R.J, KINSELLA, J.E. Oxidation of polyunsaturated fatty acids: mechanisms, products, and inhibition with emphasis on fish. **Advances in food and nutrition research**, v.33, p.233-341, 1989.

ISRAELI, E.; SHARON, R. β -Synuclein occurs in vivo in lipid-associated oligomers and forms hetero-oligomers with α -synuclein. **Journal of Neurochemistry**, v. 108, p. 465-474, 2009.

IUPAC-IUB. The nomenclature of lipids (recommendations 1976). IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. **The Journal of Lipid Research**, v. 19, p. 114-128, 1978.

JIANJUN, Z. et al. Proteomic Characterization of Lipid Raft Proteins in ALS Mouse Spinal Cord. **The FEBS journal**, v. 276, p. 3308-3323, 2009.

JICHA, G. A.; MARKESBERY, W. R. Omega-3 fatty acids: potential role in the management of early Alzheimer's disease. **Clinical interventions in aging**, v. 5, p. 45-61, 2010.

JOMOVA, K. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 345, p. 91-104, 2010.

KALANT, D.; CIANFLONE, K. Regulation of fatty acid transport. **Current Opinion in Lipidology**, v. 15, p. 309-314, 2004.

KARUBE, H. et al. N-terminal region of α -synuclein is essential for the fatty acid-induced oligomerization of the molecules. **FEBS Letters**, v. 582, p. 3693-3700, 2008.

KAWAI, Y. Formation of N{epsilon}-(succinyl)lysine in vivo: a novel marker for docosahexaenoic acid-derived protein modification. **The Journal of Lipid Research**, v. 47, p. 1386-1398, 2006.

KAWAI, Y. Toward peroxy lipidomics: Simultaneous and comprehensive analysis for lipid peroxidation products. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, p. S109-S109, 2004.

KIM, H. -Y et al. Inhibition of Neuronal Apoptosis by Docosahexaenoic Acid (22:6n-3). Role of phosphatidylserine in antiapoptotic effect. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 35215-35223, 2000.

KIM, H. -Y. Novel Metabolism of Docosahexaenoic Acid in Neural Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 18661-18665, 2007.

KIM, Y. J. et al. Unsaturated Fatty Acids Induce Cytotoxic Aggregate Formation of Amyotrophic Lateral Sclerosis-linked Superoxide Dismutase 1 Mutants. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 21515-21521, 2005.

KLENK, E.; MOHRHAUER, H. Studies on the metabolism of polyenoic fatty acids in the rat. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie**, v. 320, p. 218-232, 1960.

KOVAL, I. Reactions of thiols. **Russian Journal of Organic Chemistry**, v. 43, p. 319-346, 2007.

LAJTHA, A. et al. Energy Consumption by Phospholipid Metabolism in Mammalian Brain. In: **Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology**. New York: Springer US, 2007. cap. 4.6, p. 401-427.

LARSSON, S. C. et al. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 935-945, 2004.

LAURITZEN, L. et al. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. **Progress in Lipid Research**, v. 40, p. 1-94, 2001.

LEINWEBER, B. et al. Aggregation of ALS mutant superoxide dismutase expressed in Escherichia coli. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 36, p. 911-918, 2004.

LEVANON, D. et al. Architecture and anatomy of the chromosomal locus in human chromosome 21 encoding the Cu/Zn superoxide dismutase. **The EMBO Journal**, v. 4, p. 77-84, 1985.

LeVINE III, H. Quantification of β -sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. **Methods in Enzymology**, In: Amyloid, Prions, and Other Protein Aggregates, v. 309, p. 274-284, 1999.

LIU, H. Copper²⁺ binding to the surface residue cysteine 111 of His46Arg human copper-zinc superoxide dismutase, a familial amyotrophic lateral sclerosis mutant. **Biochemistry**, v. 39, p. 8125-8132.

LUKIW, W. J. et al. A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 115, p. 2774-2783, 2005.

LUKIW, W. J.; BAZAN, N. G. Docosahexaenoic Acid and the Aging Brain. **The Journal of Nutrition**, v. 138, p. 2510-2514, 2008.

LUSIS, A. J. Atherosclerosis. **Nature**, v. 407, p. 233-41, 2000.

LYBERG, A. M.; ADLERCREUTZ, P. Monitoring monohydroperoxides in docosahexaenoic acid using high-performance liquid chromatography. **Lipids**, v. 41, p. 67-76, 2006.

MARSZALEK, J. R. LODISH, H. F. Docosahexaenoic acid, fatty acid interacting proteins, and neuronal function: breastmilk and fish are good for you. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 21, p. 633-657, 2005.

MCGAHON, B. M. Age-related changes in synaptic function: analysis of the effect of dietary supplementation with [omega]-3 fatty acids. **Neuroscience**, v. 94, p. 305-314, 1999.

MEAD, J. F. The metabolism of the polyunsaturated fatty acids. **Progress in the Chemistry Fats and Other Lipids**, v. 9, p. 159-62, 1971.

MEDINAS et al. A ditryptophan cross-link is responsible for the covalent dimerization of human superoxide dismutase 1 during its bicarbonate-dependent peroxidase activity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, p. 1046-1053, 2010.

MIRNIKJOO, B. et al. Protein Kinase Inhibition by omega -3 Fatty Acids. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 10888-10896, 2001.

MIYAMOTO, S. et al. Singlet molecular oxygen generated from lipid hydroperoxides by the Russell mechanism: Studies using ¹⁸O-labeled linoleic acid hydroperoxide and monomol light emission measurements. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, p. 6172-6179, 2003.

MONTINE, T. J. et al. Lipid peroxidation in aging brain and Alzheimer's disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, p. 620-626, 2002.

MONTINE, T. J.; MORROW, J. D. Fatty acid oxidation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **American Journal of Pathology**, v. 166, p. 1283-1289, 2005.

MONTINE, T. J.; MORROW, J. D. Fatty acid oxidation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **American Journal of Pathology**, v. 166, p. 1283-1289, 2005.

MOORE, S. A. Astrocytes, not neurons, produce docosahexaenoic acid (22:6 ω -3) and arachidonic acid (20:4 ω -6). **Journal of Neurochemistry**, v. 56, p. 518-524, 1991.

MÜNCH, C.; O'BRIEN, J.; BERTOLOTTI A. Prion-like propagation of mutant superoxide dismutase-1 misfolding in neuronal cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, p. 3548–3553, 2011.

MUSCI, G. et al. 4,4_-bis[8- (phenylamino)naphthalene-1-sulfonate] binding to human thrombins: a sensitive exo site fluorescent affinity probe. **Biochemistry**, v. 24, p. 2034–2039, 1985.

NAKAMURA, M. T.; NARA, T. Y. Structure, function, and dietary regulation of Delta 6, Delta 5, and Delta 9 desaturases. **Annual Review of Nutrition**, v. 24, p. 345-376, 2004.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

NOUROOZ-ZADEH, J. et al. F₄-isoprostanes as specific marker of docosahexaenoic acid peroxidation in Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 72, p. 734-740, 1999.

OKADO-MATSUMOTO, A.; FRIDOVICH, I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 38388-93, 2001.

OKSMAN, M. et al. Impact of different saturated fatty acid, polyunsaturated fatty acid and cholesterol containing diets on beta-amyloid accumulation in APP/PS1 transgenic mice. **Neurobiology of Disease**, v. 23, p. 563-572, 2006.

PAN, X. et al. Oxidation of all-cis-7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid ethyl ester. Hydroperoxide distribution and volatile characterization. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 107, p. 228-238, 2005.

PHILLIS, J. W.; HORROCKS, L. A.; FAROOQUI, A. A. Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: Their role and involvement in neurological disorders. **Brain Research Reviews**, v. 52, p. 201-243, 2006.

PLOURDE, M.; CUNNANE, S. C. Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 32, p. 619-634, 2007.

PORTER, N. A.; CALDWELL, S. E.; MILLS, K. A. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. **Lipids**, v. 30, p. 277-290, 1995.

RAKHIT, R. Oxidation-induced Misfolding and Aggregation of Superoxide Dismutase and Its Implications for Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 47551-47556, 2002.

RAPOPORT, S. I.; RAO, J. S.; IGARASHI, M. Brain metabolism of nutritionally essential polyunsaturated fatty acids depends on both the diet and the liver. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 77, p. 251-261, 2007.

RAPOPORT, S. In vivo approaches to quantifying and imaging brain arachidonic and docosahexaenoic acid metabolism. **Journal of Pediatrics**, v. 143, p. 26-34, 2003.

RAPOPORT, S. In Vivo Fatty Acid Incorporation into Brain Phospholipids in Relation to Signal Transduction and Membrane Remodeling. **Neurochemical Research**, v. 24, p. 1403-1415, 1999.

RAPOPORT, S.; CHANG, M. C. J.; SPECTOR, A. A. Delivery and turnover of plasma-derived essential PUFAs in mammalian brain. **Journal of Lipid Research**, v. 42, p. 678-685, 2001.

REDDIE, K. G.; CARROL, K. S. Expanding the functional diversity of proteins through cysteine oxidation. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, p. 746-754.

REICH, E. E. et al. Formation of Novel D-Ring and E-Ring Isoprostane-like Compounds (D4/E4-Neuroprostanes) in Vivo from Docosahexaenoic Acid. **Biochemistry**, v. 39, p. 2376-2383, 2000.

ROBERTS II, L. J. et al. Formation of Isoprostane-like Compounds (Neuroprostanes) in Vivo from Docosahexaenoic Acid. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 13605-13612, 1998.

ROBERTS, B. R. et al. Structural Characterization of Zinc-deficient Human Superoxide Dismutase and Implications for ALS. **Journal of Molecular Biology**, v. 373, p. 877-890, 2007.

RODRIGUEZ DE TURCO, E. B. et al. Systemic fatty acid responses to transient focal cerebral ischemia: influence of neuroprotectant therapy with human albumin. **Journal of Neurochemistry**, v. 83, p. 515-524, 2002.

ROSS, C. A.; POIRIER, M. A. Protein aggregation and neurodegenerative disease. **Nature Medicine**, v. 10, p. S10-17, 2004.

SALEM, N. et al. Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. **Lipids**, v. 36, p. 945-959, 2001.

SCHMITZ, G.; ECKER, J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. **Progress in Lipid Research**, v. 47, p. 147-155, 2008.

SCOTT, B. L.; BAZAN, N. G. Membrane docosahexaenoate is supplied to the developing brain and retina by the liver. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, p. 2903-2907, 1989.

SEVANIAN, A.; HOCHSTEIN, P. Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. **Annual Review of Nutrition**, v. 5, p. 365-390, 1985.

SHAW, B. F.; VALENTINE, J. S. How do ALS-associated mutations in superoxide dismutase 1 promote aggregation of the protein? **Trends in biochemical sciences**, v. 32, p. 78-85, 2007.

SHOSTAKOVSKII, M. F. et al. Synthesis of Vinyl Ethers Containing Functional Groups and Heteroatoms. **Russian Chemical Reviews**, v. 37, p. 907-919, 1968.

SIMONIAN, N. A.; COYLE, J. T. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 36, p. 83-106, 1996.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 56, p. 365-379, 2002.

SODERBERG, M. et al. Fatty acid composition of brain phospholipids in aging and in Alzheimer's disease. **Lipids**, v. 26, p. 421-425, 1991.

SONG, W-L. et al. Neurofurans: Novel indices of oxidant stress derived from docosahexaenoic acid. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 6-16, 2007.
SPILLANTINI, M. G. et al. [alpha]-synuclein in Lewy bodies. **Nature**, v. 388, p. 839-840, 1997.

SPITELLER, P., SPITELLER, G. Strong dependence of lipid peroxidation product spectrum whether Fe²⁺/O₂ or Fe³⁺/O₂ is used as oxidant. **Biochimica et biophysica acta.**, v.1392, p.23-40, 1998.

SPRECHER, H et al. Reevaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. **Journal of Lipid Research**, v. 36, p. 2471-7, 1995.

SPRECHER, H. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipid**, v. 1486, p. 219-231, 2000.

STADTMAN, E. R. Role of Oxidant Species in Aging. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 1105-1112, 2004.

STOLZE, K.; UDILOVA, N.; NOHL, H. Lipid radicals: properties and detection by spin trapping. **Acta biochimica Polonica**, v. 47, p. 923-930, 2000.

STURTZ, L. A. et al. A Fraction of Yeast Cu,Zn-Superoxide Dismutase and Its Metallochaperone, CCS, Localize to the Intermembrane Space of Mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 38084-38089, 2001.

TERAO, J.; MATSUSHITA, S. Products formed by photosensitized oxidation of unsaturated fatty acid esters. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 54, p. 234-238, 1977.

TERAO, J.; MATSUSHITA, S. The isomeric compositions of hydroperoxides produced by oxidation of arachidonic acid with singlet oxygen. **Agricultural Chemical Society of Japan**, v. 45, p. 587-593, 1981.

TRUMBULL, K. A.; BECKMAN, J. S. A role for copper in the toxicity of zinc-deficient superoxide dismutase to motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, p. 1627-1639, 2009.

UAUY, R.; CASTILLO, C. Lipid Requirements of Infants: Implications for Nutrient Composition of Fortified Complementary Foods. **The Journal of Nutrition**, v. 133, p. 2962S-2972S, 2003.

VALENTINE, J. S.; DOUCETTE, P. A.; ZITTIN POTTER, S. Cooper-Zinc Superoxide Dismutase and Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 74, p. 563-593, 2005.

VOSS, A. The metabolism of 7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid to 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid in rat liver is independent of a 4-desaturase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 19995-20000, 1991.

VUCIC, S.; KIERNAN, M. C. Pathophysiology of neurodegeneration in familial amyotrophic lateral sclerosis. **Current Molecular Medicine**, v. 9, p. 255-272, 2009.

WANG, J. W. et al. The ALS-associated proteins FUS and TDP-43 function together to affect Drosophila locomotion and life span. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, p. 4118-4126, 2011.

WILLEM, M.; LAMMICH, S.; HAASS, C. Function, regulation and therapeutic properties of β -secretase (BACE1). **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 20, p. 175-182, 2009.

WILLIARD, D. E et al. Comparison of 20-, 22-, and 24-carbon n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid utilization in differentiated rat brain astrocytes. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 67, p. 99-104, 2002.

WU, G.; RAO, N.A. Activation of NADPH oxidase by docosahexaenoic acid hydroperoxide and its inhibition by a novel retina pigment epithelial protein. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 40, p. 831-839, 1999.

YIN, H. et al. Regiochemistry of Neuroprostanes Generated from the Peroxidation of Docosahexaenoic Acid in Vitro and in Vivo. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 26600-26611, 2005.

ZHAO, Y. et al. Docosahexaenoic Acid-Derived Neuroprotectin D1 Induces Neuronal Survival via Secretase- and PPAR γ -Mediated Mechanisms in Alzheimer's Disease Models. **PLoS One**, v. 6, p. e15816, 2011.

Lista de Anexos

Tabela A-1. *Rendimento da SOD1 após expressão e purificação.*

Tabela A-2. *Dosagem de metais por Espectrometria de Emissão Atômica (ICP-AES) após remoção dos metais das proteínas hSOD1 WT e hSOD1 G93A.*

Figura A-1. *Análise da apo-SOD1 WT (A) e apo-SOD1 WT (B) por espectrometria de massas (MALDI-TOF) após purificação e remoção dos metais.*

SUMULA CURRICULAR

Tabela A-1. Rendimento da SOD1 após expressão e purificação.

holo -SOD1 WT (mg de proteína)	holo -SOD1 G93A (mg de proteína)
20-30	4-8

Tabela A-2. Dosagem de metais por Espectrometria de Emissão Atômica (ICP-AES) após remoção dos mesmos das proteínas hSOD1 WT e hSOD1 G93A.

	Proteína	Cobre	Zinco
holo-SOD1 WT	1 mol	0,08 mol	0,12 mol
apo-SOD1 WT	1 mol	0,0000025 mol	0,00288 mol
holo-SOD1 G93A	1 mol	0,02 mol	0,04 mol
apo-SOD1 G93A	1 mol	0,0000003 mol	0,017 mol

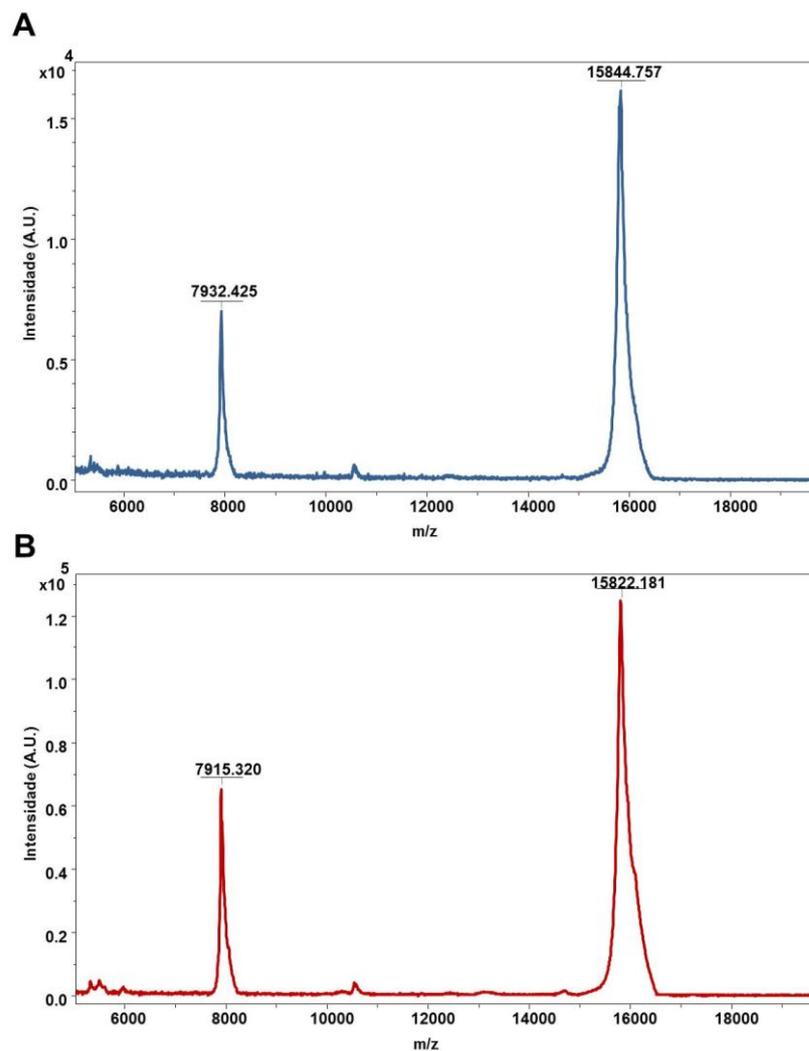


Figura A-1. Análise da apo-SOD1 WT (**A**) e apo-SOD1 G93A (**B**) por espectrometria de massas (MALDI-TOF) após purificação e remoção dos metais.

SUMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: **Patricia Postilione Appolinário**

Local e data de nascimento: Bebedouro, SP, 4 de outubro de 1979.

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Ensino médio: Colégio SETA, São José do Rio Preto, SP.

Graduação: Bacharelado em Nutrição no Centro Universitário de Rio Preto, UNIRP, São José do Rio Preto, SP. 2001-2005.

Especialização em Nutrição Clínica, 2006. Centro Universitário de Rio Preto, UNIRP, São José do Rio Preto, SP.

Especialização em Aspectos Fisiológicos e Biomecânicos do Exercício, 2006. Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP, São José do Rio Preto, SP.

Doutorado Direto em Ciências Biológicas (Bioquímica), 2007-presente. Universidade de São Paulo, USP, SP.

OCUPAÇÃO

Doutorado Direto no Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, USP, SP. 2007-presente.

Professora Especialista nas Faculdades Integradas Torricelli - Grupo Anhanguera Educacional, Guarulhos, SP. 2012-presente.

PUBLICAÇÕES (Disponíveis no CD-ROM)

S-1 Artigos aceitos para publicação

S-1-1 Appolinário, P.P.; Derogis, P.B.M.C; Yamaguti, T. H.; Miyamoto, S.. *Metabolismo, oxidação e implicações biológicas do ácido docosahexaenoico em doenças neurodegenerativas. Química Nova, v. 34, p. 1409-1416, 2011.*

S-3 Artigos em preparo

S-3-1 Appolinário, P.P., Medinas, D.M., Genaro-Mattos, T.C., Cussiol, J.R., Kazaoka, R.M., Augusto, O., Netto, L.E.S., Miyamoto, S. *Oligomerization of SOD1 Familial ALS Mutant by Docosahexaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid Hydroperoxides in vitro. Em fase final de preparação para ser submetido à revista Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS).*

S-2 Artigos Submetidos

S-2-1 Genaro-Mattos, T.C., Appolinário, P.P., Mugnol, K.C.U., Nantes, I.L., Bloch Jr, C., Di Mascio, P., Miyamoto, S. *Cytochrome c modifications promoted by cholesterol carboxyaldehyde – implications to cytochrome c release. Submetido à revista Free Radical Biology and Medicine.*

S-2-2 Derogis, P.B.M.C, Freitas, F.P., Marques, A.S.F., Cunha, D., Appolinário, P.P., Paula, F.de, Lourenço, T.C., Murgu, M., Di Mascio, P., Medeiros, M.H.G. and Miyamoto, S.. *Development of a specific and sensitive method for detection and quantification of hydroperoxy- and hydroxydocosahexaenoic acid as tool for lipidomic analysis. Submetido à revista Analytical Chemistry.*

S-2-3 Luévano-Martínez, L.A., Appolinário, P.P., Miyamoto, S., - Carvajal, S.U., Kowaltowski, A.J. *Deletion of the Transcriptional Regulator Opi1p decreases cardiolipin content and disrupts mitochondrial metabolism. Submetido à revista Fungus Genetics and Biology.*

PRÊMIOS E DISTINÇÕES

2011: Prêmio viagem da Society of Free Radical Biology and Biology (SFRBM) para apresentar o trabalho “Characterization of SOD1 aggregation induced by docosahexaenoic acid hydroperoxides”, São Pedro, SP (**comunicação oral**)

2011: Prêmio viagem da 52nd International Conference on the Bioscience of Lipids (ICBL) - Expanding the Horizons of Lipidomics para apresentar o trabalho “Docosahexaenoic acid induced SOD1 aggregation: The role of fatty acid conformation and the cysteine residues”, Varsóvia, Polônia. (**comunicação oral**)

2009: Prêmio de melhor poster apresentado na XXXVIII Anual Meeting of the Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society (SBBq), Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society (SBBq), Águas de Lindóia, SP.

2007: Certificado de Reconhecimento de Mérito Acadêmico dado pelo Centro Universitário de Rio Preto - Ingresso em Programa de Mestrado.

2005: Certificado de Distinção nos Programas de Estágios Supervisionados do curso de Nutrição da Turma de 2004, Centro Universitário de Rio Preto.

2005: Certificado de Distinção no Desenvolvimento do Trabalho de Conclusão de Curso da Turma de 2004 do curso de Nutrição, Centro Universitário de Rio Preto.

RESUMOS EM CONGRESSOS

Internacionais

APPOLINÁRIO, P.P.; Medinas, Danilo; Genaro-Mattos, Thiago; Augusto, Ohara; Miyamoto, Sayuri. Docosahexaenoic acid induced SOD1 aggregation: The role of fatty acid conformation and the cysteine residues. In: 52nd International Conference on the Bioscience of Lipids - Expanding the Horizons of Lipidomics, 2011, Varsóvia. CHEMISTRY AND PHYSICS OF LIPIDS. v. 164. p. S-19-S-19.

APPOLINÁRIO, P.P.; Medinas, D.B.; Genaro-Mattos, T. C.; Miyamoto, S.. Characterization of SOD1 aggregation induced by docosahexaenoic acid hydroperoxides. In: VII Meeting of the South American Group of the SFRBM, 2011,

São Pedro. Livro de Resumo, 2011. p. 50-50.

APPOLINÁRIO, P.P.; MEDINAS, D.B.; AUGUSTO, O.; MIYAMOTO, S.. SOD1 Aggregation Induced by Docosahexaenoic acid and Docosahexaenoic acid Hydroperoxides. In: 17th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine, a joint meeting with the Society for Free Radical Research International, 2010, Orlando. Livro de Resumos, 2010. p. S162.

APPOLINÁRIO, P.P.; Medinas, D.B.; AUGUSTO, O.; MIYAMOTO, S.. Oligomerization of SOD1 familial ALS mutant by docosahexaenoic acid and docosahexaenoic acid hydroperoxides in vitro. In: Free Radicals and Antioxidants in Chile 2009 VI Meeting of SFRBM South American Group, 2009, Santiago. Livro de Resumos, 2009. p. 98

APPOLINÁRIO, P.P.; DEROGIS, P.B.M.C; MEDEIROS, M.H.G.; MASCIO, P.; TERAQ, J.; MIYAMOTO, S.. Characterization of docosahexaenoic acid photo-oxidation products and their aldehydes. In: SFRBM's 16th Annual Meeting, 2009, San Francisco. FREE RADICAL BIOLOGY & MEDICINE, 2009. v. 47. p. S190.

Rafaella, R.M.A ; YAMAGUTI, T. H.; Mansano, F.V.; APPOLINÁRIO, P.P.; DEROGIS, P.B.M.C; Genaro-Mattos, T. C.; FREITAS, F. P.; MEDEIROS, M.H.G.; MIYAMOTO, S.. Evaluation of cholesterol and its aldehydes in a transgenic rat model for amyotrophic lateral sclerosis. In: VII Meeting of the South American Group of the SFRBM, 2011, São Pedro. Livro de Resumos, 2011. p. 141-142.

Genaro-Mattos, T. C.; APPOLINÁRIO, P.P.; NANTES, I. L.; Bloch Jr, C.; MASCIO, P.; MIYAMOTO, S.. Oxidative modifications to cytochrome c induced by cholesterol hydroperoxides and aldehydes. In: VII Meeting of the South American Group of the SFRBM, 2011, São Pedro. Livro de Resumos, 2011. p. 142-142.

DEROGIS, P.B.M.C; APPOLINÁRIO, P.P.; MEDEIROS, M.H.G.; MASCIO, P.; TERAQ, J.; MIYAMOTO, S.. Development of an HPLC-MS/MS method for the detection and quantification of docosahexaenoic acid photooxidation products in biological samples. In: VII Meeting of the South American Group of the SFRBM, 2011, São Pedro. Livro de resumos, 2011. p. 142-142

Genaro-Mattos, Thiago; Appolinário, Patricia; Nantes, Iseli; Bloch, Carlos; Di Mascio, Paolo; Miyamoto, Sayuri. Cytochrome c modifications promoted by cholesterol hydroperoxides and aldehydes. In: 52nd International Conference on the Bioscience of Lipids, 2011, Varsóvia. Chemistry and Physics of Lipids, 2011. v. 164. p. P 61-P 61.

Nacionais

APPOLINÁRIO, P.P.; MEDINAS, D.B.; AUGUSTO, O.; MIYAMOTO, S. Fatty Acid Induced Aggregation and its Dependency on Unsaturation. In: XXXIX Annual Meeting of SBBq, 2010, Foz do Iguaçu. Livro de Resumos, 2010. p. 97.

APPOLINÁRIO, P.P., MEDINAS, D.B.; AUGUSTO, O.; MIYAMOTO, S. Oligomerization of SOD1 familial ALS mutant by docosahexaenoic acid and docosahexaenoic acid hydroperoxides in vitro. In: XXXVIII Annual Meeting of the Brazilian Biochemistry and Biology Society (SBBq), 2009, Águas de Lindóia. Livro de Resumos, 2009. p. 118.

APPOLINÁRIO, P.P.; MASCIO, P. ; MIYAMOTO, S. . Síntese e caracterização dos hidroperóxidos do ácido docosahexaenóico gerados por oxigênio singlete usando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa. In: XXXVII Annual Meeting of Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) and XI Congress of the Pan American Association for Biochemistry and Molecular Biology (PABMB), 2008, Águas de Lindóia. Livro de Resumos, 2008. p. 124.

YAMAGUTI, T. H.; APPOLINÁRIO, P.P.; SIGOLO, C.A.O. ; MEDEIROS, M.H.G. ; MIYAMOTO, S. . Alterations in brain mitochondrial fatty acid profile in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. In: XXXIX Annual Meeting of SBBq, 2010, Foz do Iguaçu. Livro de Resumos, 2010. p. 35.

DEROGIS, P.B.M.C; APPOLINÁRIO, P.P.; MEDEIROS, M.H.G.; MASCIO, P.; TERAU, J. ; MIYAMOTO, S.. Chromatographic Separation of Docosahexaenoic Acid Hydroperoxides and Characterization of Their Aldehydes. In: XXXIX Annual Meeting of SBBq, 2010, Foz do Iguaçu. Livro de Resumos, 2010. p. 133.

YAMAGUTI, T. H.; APPOLINÁRIO, P.P.; SIGOLO, C.A.O.; MEDEIROS, M.H.G.; MIYAMOTO, S. Avaliação do perfil de ácidos graxos de cérebro de ratos transgênicos modelo para esclerose lateral amiotrófica. In: 17º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2009, Ribeirão Preto. CD, 2009.

ORIENTAÇÕES

Em andamento

Gledsa Estefânia de Oliveira Silva. Diabetes Mellitus Gestacional. (2012). Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) - Faculdades Integradas Torricelli-Anhanguera.

Concluídas

Bruna Jennifer Arruda e Daiane Laís de Souza. Abordagem terapêutica nutricional no diabetes. (2012). Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) - Faculdades Integradas Torricelli- Anhanguera.

Tamires Larissa Prates Barreto. Obesidade e doenças cardiovasculares na infância. (2012). Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) - Faculdades Integradas Torricelli- Anhanguera.

Sandra Xavier Cardoso. Alimentação do recém-nascido prematuro internado em unidade de terapia intensiva neonatal. (2012). Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) - Faculdades Integradas Torricelli- Anhanguera.