

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUIMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

(Bioquímica)

ADRIANA PEREIRA DOMARQUES DE MENEZES

*Modificações em Proteínas Induzidas por Compostos
Eletrofílicos. Possível Papel em Esclerose Lateral
Amiotrófica.*

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 5890

O original se encontra disponível na Secretária de Pós-graduação do IQ-USP

São Paulo

Data de Depósito na SPG:

28/07/2017

ADRIANA PEREIRA DOMARQUES DE MENEZES

*Modificações em Proteínas Induzidas por Compostos
Eletrofílicos. Possível Papel em 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. Marisa Helena Gennari de Medeiros

São Paulo

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Menezes, Adriana Pereira Domarques de
M543m Modificações em proteínas induzidas por compostos
eletrofílicos. Possível papel em Esclerose Lateral Amiotrófica /
Adriana Pereira Domarques de Menezes. -- São Paulo, 2017.
123p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Bioquímica
Orientador: Medeiros, Marisa Helena Gennari

1. Radical livre : bioquímica 2. Macromolécula : bioquímica.
I. T. II. Medeiros, Marisa Helena Gennari, orientador.

574.192 CDD

Título: Modificações em proteínas induzidas por compostos eletrofílicos. Possível papel em esclerose lateral amiotrófica.

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

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

*Dedico esse trabalho aos meus pais e meu irmão, João e
Hilda e André Pereira Domarques de Menezes pelo voto de confiança.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria primeiramente de agradecer ao Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**), a Coordenação de Aperfeiçoamento Científico e Tecnológico (**CAPES**) INCT em Processos Redox em Biomedicina (**CNPq/FAPESP**) CEPID-Redoxoma (**FAPESP**; Proc. 2013/07937-8) NAP-Redoxoma (**PRPUSP**; Proc. 2011.1.9352.1.8), pelo suporte financeiro.

Gostaria de agradecer a Marisa pela parceria e principalmente pela tolerância diante dos conflitos, deixou as diferenças de lado, e ficou do meu lado todo o momento, e ainda sim, manteve o entusiasmo até o último minuto. A Graziella Ronsein e Flávia Winck pelos valiosos ensinamentos científicos e pelo bom humor sincero. Obrigada Edson pela sua compaixão nos momentos difíceis e boas conversas, obrigada!!

Gostaria de agradecer aos bons amigos que contribuíram muito para elaboração desse trabalho, Darlene Pena e Elisabela ajuda valiosa nos experimentos imunoprecipitação e western blot, pelas risadas e bom humor sempre. As panteras (Carolina Parga, Maira Nagai) pela cumplicidade, científica e pessoal. Arquimedes Cheffer (gêmeo siamês) pela intensa amizade e por dividir a paixão por conhecimento e cultura, a Gustavo Carvalho e Felipe Godoy pela lealdade e humor sarcástico. Ao Vanderson e Nachito pelas aulas de *western blot*, companheirismo e amizade. A Adriano Brito, Lucas Dantas e Isabela Pinto pelo time que formamos na condução dos experimentos com animais. Obrigada Sayuri pela ajuda na condução do trabalho, e sugestões criativas. A angélica Sanches pela paciência e gentileza ao me introduzir no laboratório. A Lucas Ferreira pelas substanciosas explicações e contribuições durante a formulação dos resultados proteômicos. E a Fernando Coelho e Verônica Paviani pela amizade, ajuda científica e conversas agradáveis no almoço.

Ao time de alunos mais “antigos” do grupo, Florêncio Freitas, Priscila Derogis, Thiago Mattos, pelos ensinamentos múltiplos e companhia agradável durante o curto tempo de convívio. E um agradecimento especial a Izaura Toma e a Emerson Marques que me ajudou de bom grado nas análises de citocromo c e na experimentação animal, e nas análises no Lumos, obrigada. A Flavia Meotti e Eliziane Patricio primeiramente pela

amizade, ajuda e por ter compartilhado de momentos alegres de diferentes maneiras. Ao Fred Gueiros por ter me permitido assistir suas aulas como ouvinte antes da prova de ingresso, risadas e cervejas nas festinhas na praça, ao Carlos FuFu Gomes, e Cícero Batata, pelas inúmeras quinta e brejas e corridinhas que tanto sinto falta.

E por fim gostaria de agradecer a minha família que suportou longos períodos de saudades, pelo suporte financeiro, pelo sacrifício mútuo, obrigada Pai e Mãe!!! obrigada André, sem você esse momento seria impossível, obrigada Aline pelo apoio e muitas risadas, obrigada, Ellen e Erick pelas pouca oportunidade de participação que me deram em suas vidas. E por fim a Karine de Lucas, Dolores e Rui Tavares da Fonseca e pela ajuda crucial, e boa convivência durante minha estadia em SP. E obrigada a todos que me falhou na memória

RESUMO

(MENEZES, A.P.D) **Modificações em proteínas induzidas por compostos eletrofilicos. Possível papel em esclerose lateral amiotrófica.** 2017. 121p.Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

Danos em biomoléculas podem ocorrer a partir de uma interação direta entre as biomoléculas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio como também, pela reação de produtos secundários dessas espécies como eletrófilos gerados na peroxidação lipídica. Alguns desses produtos secundários possuem estabilidade química maior que as espécies reativas das quais foram derivadas e podem se ligar covalentemente as biomoléculas comprometendo o funcionamento normal das mesmas. Portanto, modificações em proteínas por aldeídos gerados na lipoperoxidação têm sido investigadas por suas implicações com desordens patológicas relacionadas à agregação proteica, e modificações em diversas vias de sinalização amplificando os efeitos deletérios em sistemas biológicos. Os objetivos desse trabalho foi contribuir na elucidação dos mecanismos moleculares associados ao desenvolvimento da esclerose lateral amiotrófica (ELA) através da identificação, caracterização e quantificação de modificações pós-traducionais em proteínas pelos aldeídos 4-hidroxi-2-hexenal (HHE) e *trans*-4-hidroxi-2-nonenal (HNE) *in vitro* (citocromo c) e *in vivo* (modelo ELA) a partir de técnicas de *Western blot*, imunoprecipitação e espectrometria de massa com abordagem proteômica de “*shotgun*” em ratos SOD1^{G93A} modelo de esclerose lateral amiotrófica (ELA). Estudos com citocromo c mostraram a ligação dos aldeídos ao citocromo c e mecanismos de reação foram propostos. Foram encontrados seis peptídeos modificados por HHE e um para o HNE, e o peptídeo TGPLHGLFGR se mostrou modificado pelos dois aldeídos paralelamente. Foi demonstrado que a histidina 33 é um “*hot spot*” frente as adições pelos aldeídos. Nas análises por *western blot* das proteínas ligadas a aldeídos foi possível observar uma tendência de aumento na concentração de proteínas ligadas ao HNE nos animais ELA, mais acentuada nas amostras de 70 dias comparadas ao controle. Com relação aos resultados obtidos com HHE tanto os animais pré-sintomáticos quanto os sintomáticos não apresentaram diferenças de HHE-proteína, tanto

nos controles quanto nos animais ELA. Nas amostras dos animais sintomáticos não detectamos diferença significativa na concentração de aldeído-proteína entre os grupos. Já as análises proteômicas revelaram 24 proteínas diferencialmente expressas, com destaque para proteínas com os maiores valores de significância (*p-value*), como a ubiquitina no grupo dos pré-sintomáticos e a neurogranina, no grupo dos animais sintomáticos e várias proteínas de metabolismo energético, de neurofilamentos, proteínas de processos redox e proteínas ligadas ao metabolismo de cálcio (fundamentais na fisiopatologia em ELA). Algumas proteínas importantes foram encontradas com exclusividades nos grupos pré-sintomáticos e sintomáticos pelo diagrama de Venn. Com relação a proteínas modificadas pelos aldeídos, foram encontradas algumas relevantes como a proteína 2 de interação com a polimerase delta que foi modificada por HNE via adição de Michael encontrada nos animais ELA pré-sintomáticos e sintomáticos, a catalase que foi encontrada modificada por HNE via base de Schiff apenas nos ELA pré-sintomáticos, e a tiol redutase induzível por interferon gama no grupo dos animais ELA sintomáticos. Com relação a proteínas modificadas por HHE, foram encontradas a Janus quinase e proteína 3 de interação com microtúbulo, modificadas tanto por adição de Michael quanto via base de Schiff nos animais ELA sintomáticos. É interessante ressaltar que algumas modificações encontradas em proteínas não caracterizadas podem indicar proteínas novas ainda não descritas como modificadas por esses aldeídos. Os resultados mostram que algumas das proteínas modificadas por HNE e HHE encontradas neste trabalho, estão relacionadas ao estresse redox, vias metabólicas energéticas, proteínas envolvidas na resposta a danos oxidativos, e processos inflamatórios. Tais modificações ocorrem não só no modelo de neurodegeneração, mas foram previamente descritas em outros processos patológicos, como doença cardiovascular, lesão hepática por uso crônico de álcool.

Palavras-chave: estresse redox, aldeídos, HNE, HHE, adutos de proteínas, proteômica, biomarcadores, Esclerose Lateral Amiotrófica, SOD1^{G93A}

ABSTRACT

(MENEZES, A. P. D.) **Modifications in proteins induced by electrophilic compounds. Possible role in amyotrophic lateral sclerosis.** 2017. 121p. PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Damage to biomolecules can occur from a direct interaction between biomolecules and reactive oxygen and nitrogen species as well as from the reaction of secondary products of these species as electrophiles generated in lipid peroxidation. Some of these by-products have greater chemical stability than the derived reactive species and can bind to biomolecules compromising their normal function. Therefore, protein modifications by aldehydes generated during lipoperoxidation have been investigated for their implications with pathological disorders related to protein aggregation and modifications in signaling pathways amplifying the deleterious effects in biological systems. The aim of this work was to contribute to the elucidation of the molecular mechanisms associated with the development of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) through the identification, characterization and quantification of post-translational modifications in proteins by 4-hydroxy-2-hexenal (HHE) and trans-4-hydroxy-2-nonenal (HNE) *in vitro*, cytochrome c, and *in vivo*, rat model (SOD1G93A) of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), through Western blot techniques, and mass spectrometry with shotgun proteomics approach. The results showed the binding of aldehydes to cytochrome c. Six peptides were modified by HHE and one by HNE. The peptide TGPLHGLFGR was modified by the two aldehydes. Histidine 33 has been shown to be a hot spot against aldehydes additions. By western blot analysis of the aldehyde-bound proteins, it was possible to observe a tendency of increase in the concentration of HNE-bound proteins in the ALS animals, more pronounced in the samples of 70 days compared to control samples. Regarding the results obtained with HHE, both pre-symptomatic and symptomatic animals did not show HHE-protein differences, both in controls and in ALS animals. We did not detect a significant difference in the aldehyde-protein concentration between the groups in the samples of the symptomatic animals. Proteomic analysis revealed 24 differentially expressed proteins, with emphasis on proteins with the

highest values of significance (p-value), such as the ubiquitin in the pre-symptomatic group and neurogranin in the group of the symptomatic animals and several proteins of the energetic metabolism pathways, neurofilaments, proteins of redox processes and proteins linked to calcium metabolism (fundamental in the pathophysiology of ALS). Some important proteins were found exclusively in the pre-symptomatic and symptomatic groups by the Venn diagram. With regard to aldehyde-modified proteins, some relevant ones such as Delta-2 polymerase interaction protein, that was modified by HNE via the addition of Michael found in pre-symptomatic and symptomatic ELA animals, catalase that was found to be modified by HNE via Schiff's base only in pre-symptomatic ALS, and gamma interferon-inducible thiol reductase in the group of symptomatic ALS animals. Janus kinase and microtubule interaction protein 3, were found to be modified by Michael addition and Schiff base pathway respectively in symptomatic ALS animals. It is interesting to note that some modifications found in uncharacterized proteins may indicate new proteins not yet described as modified by these aldehydes. The results show that some of the proteins modified by HNE and HHE found in this work are related to redox stress, energetic metabolic pathways, proteins involved in the response to oxidative damage, and inflammatory processes. Such modifications occur not only in the neurodegeneration model, but were previously described in other pathological processes, such as cardiovascular disease, liver injury due to chronic alcohol use.

Key words: redox stress, aldehydes, HNE, HHE, protein adducts, proteomics, biomarkers, Amyotrophic Lateral Sclerosis, SOD1^{G93A}

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação esquemática das reações de iniciação e propagação da peroxidação lipídica. Modificado de Freitas 2014..... 25*
- Figura 2 - Formação de HNE a partir do hidroperóxido 13 (S) e 9(S)-HPODE derivado do ácido linoléico. (Modificado de acordo com Schaur, 2003)..... 27*
- Figura 3 - Estrutura química dos aldeídos 4-hidroxi-2-hexenal (HHE) com 114 unidades de massa e o 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) com 156 unidades de massa. 29*
- Figura 4 - Representação esquemática das reações de adição dos aldeídos HNE e HHE frente as cadeias laterais de aminoácidos nucleofílicos (modificada de acordo com Jacobs & Marnett, 2010). O grupo R1 corresponde a porção alifática dos aldeídos HNE contendo 9 carbonos e do HHE contendo 6 carbonos, respectivamente. 30*
- Figura 5– Representação esquemática sobre os eventos moleculares envolvidos na ELA. A interação entre os neurônios durante a excitotoxicidade do glutamato, com o bloqueio da recaptação de glutamato pelos astrócitos afeta o neurônio motor (cinza) levando aos efeitos deletérios do influxo de cálcio. Geração de radicais livres e agregação proteica (SOD1, TARBP e FUS) agravam os danos neuronais. A ativação da micróglia resulta em secreções de citocinas pró-inflamatórias. Modificado de acordo com Kiernan, et al, 2011. 39*
- Figura 6 - O esquema acima ilustra o método elaborado na otimização da intensidade dos peptídeos (MS) modificados por NanoLC/ESI/MSMS (Q-TOF Maxis 3G, Bruker Daltonics). Tanto a exclusão como a exclusão, foi realizada através da criação de listas de massas, durante o processamento de dados. 48*

Figura 7 – Esquema ilustrativo da divisão dos dois grupos: 4 pares de irmãs Pré sintomáticas e Sintomáticas (Controle - e ELA +). Os círculos representam as linhagens distintas entre os pares.....56

Figura 8 - Espectros obtidos por MALDI –ToF do ensaio cinético entre citocromo c e aldeídos. 2,5 mM de citocromo c foram incubados com 2 mM de HHE em PBS (25 mM), pH 7,4 a 37°C. De cima para baixo: Controle, 10 min, 20 min, 30 min, 1 h, 2 h e 24 h...64

Figura 9 - Espectros obtidos por MALDI –ToF do ensaio cinético entre citocromo c e aldeídos. 2,5 mM de citocromo c foram incubados com 2 mM de HNE em PBS (25 mM), pH 7,4 a 37°C. De cima para baixo: Controle, 10 min, 20 min, 30 min, 1 h, 2 h e 24 h...65

Figura 10 - Visualização das modificações nos aminoácidos na sequência primária do citocromo c mediada pelos aldeídos. Em vermelho está a sequência obtida experimentalmente e em azul os peptídeos com seus respectivos aminoácidos modificados (*) 69

Figura 11 - Peptide Fragment Fingerprinting da digestão citocromo c + HHE. A) Peptídeos de massas na sequência de cima para baixo: A) 1283.6988 Da, B) 1747.8874 Da, C) 1021.6114 Da. D) 1697.828 Da, E) 920.545 Da, F) 763.5632 Da. As setas e círculos vermelho, indicam os íons modificados por HHE. 71

Figura 12 - Peptide Fragment Fingerprinting da digestão citocromo c + HNE. G) Peptídeo de massa 1324.737 H) Iôn imônio da histidina 33 do citocromo c $[H+156]^+ = 266$. As setas indicam os íons modificados por HNE. 72

Figura 13 - Gel de agarose representativo dos produtos (200 pb) de PCR obtido a partir das orelhas dos filhotes, a banda clara (canto direito inferior) presente apenas no portador da ELA é resultante da amplificação do gene mutante da $SOD1^{G93A}$ humana, a esquerda representa o animal controle ausente para este gene..... 74

Figura 14 - Análise do peso corporal dos animais ELA sintomáticos e respectivos controles. * idade em que os sintomáticos apresentaram o peso máximo. 75

Figura 15 - Detecção de proteínas ligadas ao HNE por Western blot das proteínas obtidas do córtex cerebral de animais controles e ELA, em **A)** e **B)** Immunoblot representativo de alguns animais controles e ELA pré-sintomáticos (n=6) e **C)** e **D)** animais controle e ELA pré-sintomáticos (n=6) anti-HHE. 78

Figura 16 - Detecção de proteínas ligadas ao HNE por Western blot das proteínas obtidas do córtex cerebral de animais controles e ELA, em **A)** e **B)** Immunoblot representativo de alguns animais controles e ELA sintomático (n=6) e **C)** e **D)** animais controle e ELA sintomáticos (n=7) anti-HHE.80

Figura 17 - Label Free Quantification(LFQ) dos ratos transgênicos SOD^{G93A} (obtidos através do Perseus) resultante das 1,965 proteínas encontradas em cada amostra, mostrando uma boa correlação entre as amostras (através do R quadrado satisfatório, número azul no canto esquerdo de cada gráfico). 81

Figura 18 - Análise dos componentes principais (duas dimensões) entre os indivíduos com relação ao perfil de distribuição das proteínas por LFQ nos grupos (n=4). Em azul estão os animais do grupo pré-sintomático e em vermelho estão representados os animais do grupo sintomático. 82

Figura 19 - Agrupamento hierárquico das proteínas diferencialmente significantes. Em vermelho estão as proteínas com expressão aumentada e em verde diminuída. Os retângulos amarelos e azuis destacam os agrupamentos de proteínas e os retângulos rosa mostram a expressão dessas proteínas nos grupos.*os espaços vazios são de proteínas não foram identificadas. 85

Figura 20 - Volcano plot dos grupos Ctl/ELA pré-sintomáticos (1) e Ctl/ELA sintomáticos (2) as proteínas em vermelho mais afastadas do centro, representam as proteínas mais

significantes ($-\log_{10}$ do p-value, eixo y). A linha preta mostra o $p=0,05$, pontos acima dessa linha representam os $p<0,05$ e abaixo $p>0,05$, as demais proteínas (sem significância estatística) estão representadas pelos quadradinhos cinza, já os e quadrados vermelhos em branco são das proteínas não identificadas.....89

Figura 21 - Diagrama de venn dos grupos sintomáticos e pré-sintomáticos utilizando um filtro de exclusão de no mínimo 2 peptídeos únicos. Os círculos vermelhos representam o número total de proteínas compartilhadas entre os grupos ELA sintomáticos/ELA pré-sintomáticos (28) e exclusivas do ELA sintomáticos (67) e exclusivas em ELA pré-sintomáticos (58).....90

Figura 22 - Algumas das proteínas exclusivas relevantes no cenário bioquímico da ELA, dos grupos de animais portadores da ELA. Em verde algumas proteínas interessantes das 58 encontradas apenas nos ELA pré-sintomáticos, em vermelho algumas das 28 compartilhadas entre ELA pré-sintomáticos/ELA sintomáticos e em lilás algumas das 67 encontradas somente no grupo dos ELA sintomáticos.....91

Figura 23 - Representação esquemática dos peptídeos das proteínas relevantes modificadas por HNE, de acordo com a relação entre os grupos, via adição de Michael (HNE) e base de Schiff (HNE-H₂O). Em destaque, nas cores azul e vermelha as relações mais interessantes. 96

Figura 24 - Representação esquemática dos peptídeos das proteínas relevantes modificadas por HHE, de acordo com a relação entre os grupos, via adição de Michael (HHE) e base de Schiff (HHE-H₂O). Em destaque, nas cores azul e vermelha as relações mais interessantes. 96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Valores experimentais de m/z obtidos por MALDI – ToF dos adutos de citocromo c com aldeídos. Todas as reações abaixo ocorreram via adição de Michael e foram obtidas através da soma das massas de 114 e 156 Da para o HHE e a HNE (perda neutra), respectivamente, por cada molécula de citocromo c, proveniente de 2h de incubação a 37°C, à 350 rpm..... 67

Tabela 2– Peptídeos do citocromo c modificados() por HHE e HNE, provenientes da digestão com tripsina e detectados por NanoLC – ESI – MS/MS. 73*

*Tabela 3– Aspectos clínicos dos sintomas, peso e idade dos portadores (n=4) da ELA observados. *o peso final se refere ao peso de cada indivíduo ao atingir 20% de perda de peso com relação ao seu peso máximo. 76*

Tabela 1 - Proteínas diferencialmente expressas de todos os grupos, encontradas na análise global do proteoma (FDR 0,05).....84

Tabela 5 - Peptídeos de proteínas dos animais pré-sintomáticos modificados via adição de Michael HNE (A) e por base de Schiff (B). Em destaque lilás estão as proteínas biologicamente relevantes.....93

Tabela 6 - Peptídeos dos animais sintomáticos modificados via adição de Michael HNE (A) e por base de Schiff (B). Em destaque lilás estão as proteínas biologicamente relevantes.....94

Tabela 7– Peptídeos dos animais pré-sintomáticos modificados via adição de Michael HHE (A) e por base de Schiff (B).....96

Tabela 8– Peptídeos dos animais sintomáticos modificados via adição de Michael HHE (A) e por base de Schiff (B). Em destaque lilás estão as proteínas biologicamente relevantes.....96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: análise de variância

EDTA: ácido etilenodiaminotetraacético

ELA: Esclerose Lateral Amiotrófica

ELA pre: animal ELA pré-sintomático

ELA sin: animal ELA sintomático

ERN: espécies reativas de nitrogênio

EROs: espécies reativas de oxigênio

ERs: espécies reativas

G93A: mutação da glicina por alanina

HNE: 4-hidroxi-2-nonenal

HHE: 4-hidroxi-2-hexenal

HPLC: cromatografia líquida de alta performance

HPLC/ESI/MS-MS: HPLC acoplado à espectrometria de massa em tandem com ionização por *eletrospray*

L[•]: radical de lipídeo

LOO[•]: radical de peróxido de lipídeo

LOOH: hidroperóxido de lipídeo

MDA: malondialdeído

PBS: tampão fosfato salino

pH: potencial de hidrogênio

PMSF: fenilmetilsulfonil fluoreto

SDS: dodesilsulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de acrilamida na presença de SDS

SNC: sistema nervoso central

NMI: neurônio motor inferior

NMS: neurônio motor superior

SOD: superóxido dismutase

SOD1: Cu,Zn-superóxido dismutase

SOD2: Mn-superóxido dismutase

TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamida

Tris: 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

Tween : polioxietileno sorbitan monooleato

SUMÁRIO

1. Introdução	21
1.1 Lipoperoxidação	22
1.1.1 Danos em lipídeos promovidos por estresse redox	22
1.1.2 Processo de peroxidação lipídica	23
1.1.3 Aldeídos	26
1.2 Danos em proteínas por aldeídos reativos	28
1.2.1 Mecanismo de reação entre aldeídos e aminoácidos	28
1.2.2 Modificações em proteínas	31
1.3 Esclerose Lateral Amiotrófica	35
1.3.1 Mecanismo fisiopatológico de ELA	36
1.3.2 Superóxido Dismutase	39
2. Objetivo geral	42
2.2 Específicos	42
3. Materiais e Métodos	44
3.1 Ensaios in vitro com citocromo c	44
3.1.1 Digestão do citocromo c	45
3.1.2 Método de obtenção de MS e MS/MS por NanoLC/ESI/MSMS	45
3.1.3 Processamento dos dados e método de otimização dos peptídeos modificados por NanoLC/ESI/MSMS	46
3.2 Ensaios in vivo com modelo animal de ratos transgênicos Sprague Dawley SOD1^{G93A}	48
3.2.1 Modelo Animal Utilizado	48
3.2.2 Genotipagem	49
3.2.3 Seleção dos grupos experimentais	50
3.2.4 Avaliação neurológica dos ratos e acompanhamento dos sintomas	51
3.2.5 Eutanásia dos animais e obtenção dos tecidos	52
3.3 Preparo das amostras biológicas	52
3.3.1 Tecidos	52
3.4 Ensaios de imunoafinidade	53
3.4.1 SDS Page e Western Blot	53
3.5. Ensaios proteômicos de córtex motor	55
3.5.1 Seleção dos grupos experimentais	55
3.5.2 SDS-Page das proteínas obtidas do córtex motor do cérebro de ratos da linhagem Sprague Dawley SOD1^{G93A} para as análises proteômicas	55

3.6 Análises das proteínas corticais por “Shotgun” dos ratos da linhagem Sprague 3Dawley SOD1^{G93A} método de obtenção dos MS/MS por NanoLC/ESI-Orbitrap	58
3.6.1 Método de obtenção dos MS/MS por NanoLC/ESI-Orbitrap	58
3.6.2 Processamento dos dados de MS/MS	59
4. Resultados	63
4.1 Modificação de citocromo c por HNE e HHE	63
4.1.2 Identificação dos aminoácidos modificados	68
4.2 Estudos in vivo	73
4.2.1 Genotipagem	73
4.2.2 Avaliação dos ratos e acompanhamento dos sintomas	74
4.3 Ensaio de imunofluorescência	77
4.3.1 Detecção de proteínas ligadas ao HNE e HHE	77
4.4 Proteômica de córtex motor	80
4.4.1 Análise proteômica integrativa global	80
4.4.2 Modificações pós-traducionais mediadas por HNE e HHE	91
5. Discussão	97
5.1 Citocromo c	97
5.2 Proteínas modificadas por aldeídos reativos no modelo ELA	98
5.3 Proteômica de córtex motor	100
5.3.1 Análise proteoma global e proteínas modificadas pelos aldeídos	100
6. Conclusões	105
7. Referências	107

1. Introdução

Espécies reativas (ERs) de oxigênio e nitrogênio são formadas em diversos processos biológicos. O termo ERO designa um grupo heterogêneo de espécies formadas pela redução do oxigênio, e produtos reativos (Winterbourn, 2008). Fazem parte dessas espécies reativas os radicais livres, compostos que possuem elétrons desemparelhados e espécies não radicalares. Entretanto, essas espécies diferem com respeito a reatividade, localização celular, solubilidade, etc (Ferguson, *et al*, 2005; Halliwell & Gutteridge, 2007; Valko *et al*, 2007; Gueraud *et al.*, 2010).

Pela dificuldade experimental de medir várias dessas espécies, diretamente, em modelos *in vivo* devido à alta reatividade e curto tempo de vida dessas espécies, modificações provocadas em biomoléculas e processos redox como a peroxidação lipídica, são comumente utilizados. Lipídeos são alvos importantes de processos redox não só pela sua abundância, distribuição em todos os tecidos, bem como, por seu papel em processos fisiopatológicos relevantes como, por exemplo, mediadores de inflamação (Zarkovic, *et al*, 2013; Yin, *et al*, 2011).

Os danos as macromoléculas podem ocorrer a partir de uma interação direta entre as biomoléculas e as espécies reativas, mencionadas acima, como também pela reação de produtos secundários como eletrófilos gerados na peroxidação lipídica (Marnett *et al*, 2003; Guo *et al*, 2016, Shoeb *et al*, 2014). Um grande número de dados sobre modificações em DNA promovidas por produtos da lipoperoxidação vem sendo acumulado nos últimos anos (Medeiros, 2009; Zhong & Yin, 2015; Yin, *et al*, 2011).

O processo de peroxidação lipídica pode gerar uma grande variedade desses produtos secundários, dentre os mais estudados estão os aldeídos α,β -insaturados utilizados como biomarcadores de processos redox, como por exemplo, o malonaldeído (MDA) um dos mais abundantes e mutagênico, *trans*-4-hidroxi-2-nonenal (HNE), um dos mais tóxicos (frente as células), como também, o *trans,trans*-decadienal (DDE) e a acroleína (2-propenal) (Marnett *et al*, 2003; Esterbauer, *et al*, 1991). Esses produtos eletrofílicos possuem estabilidade química maior que as espécies reativas das quais foram derivadas, são lipossolúveis, e podem se ligar covalentemente à biomoléculas comprometendo o funcionamento normal das mesmas. Portanto, modificações em proteínas por aldeídos têm sido investigadas por suas implicações com desordens patológicas relacionadas à agregação proteica, e modificações em diversas vias de sinalização amplificando ainda mais os efeitos deletérios em sistemas biológicos (Jacobs & Marnett, 2010; Reed, *et al*, 2009)

Os aldeídos utilizados nesse estudo, o *trans*-4-hidroxi-2-nonenal (HNE) e o 4-hidroxi-2-hexenal (HHE) (figura 3) são produtos secundários (**Item 1.1.3**) formados durante a lipoperoxidação. O HNE é derivado do ácido linoleico e ácido araquidônico (ômega 6). Já o HHE pode ser formado a partir do ácido eicosapentanóico (EPA) e docosahexanóico (DHA) (Yamanda, *et al*, 2004; Isom, *et al*, 2004; Zhong & Yin, 2015).

1.1 Lipoperoxidação

1.1.1 Danos em lipídeos promovidos por estresse redox

A perda do equilíbrio entre os níveis de pró-oxidante e antioxidante, nas células, tecidos, e órgãos leva ao aumento de danos promovidos pelo estresse oxidativo. Já é

bem aceito na literatura que espécies reativas podem promover danos aos lipídeos (Halliwell e Gutteridge, 2007; Ayala, 2014; Gueraud *et al.*, 2010). Uma das principais fontes primárias endógena dessas espécies reativas são as mitocôndrias, o retículo endoplasmático e os peroxisomos (Reed, *et al.*, 2009; Valko, *et al.*, 2007). O processo de transferência de elétrons pelos complexos da cadeia respiratória durante a fosforilação oxidativa nas mitocôndrias pode produzir uma redução parcial do seu aceptor final dos elétrons: o oxigênio, gerando várias espécies reativas endógenas (Valko, *et al.*, 2007; Gueraud *et al.*, 2010), como por exemplo o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila (HO^{\bullet}) e o radical hidroperoxila (HO_2^{\bullet}). Por outro lado, diferentes estímulos exógenos como radiação ionizante, raios ultravioleta, fumaça de cigarro, infecções, toxinas ambientais e exposição a herbicidas/inseticidas, são fontes *in vivo* da produção de ERO. O radical hidroxila é quimicamente uma das espécies mais reativas produzidas a partir do oxigênio, é extremamente solúvel em água, possui um curto tempo de meia vida e pode ser produzido a partir do O_2 consumido durante o metabolismo celular, e sob uma intensa variedade de condições de estresse. Uma célula pode produzir por volta de 50 radicais hidroxila a cada segundo, por exemplo, durante um dia inteiro cada célula é capaz de gerar 4 milhões de radicais hidroxila (principalmente através da cadeia de transporte de elétrons), que podem ser neutralizados por sistemas antioxidantes (Ayala *et al.*, 2014; Halliwell & Gutteridge, 2007; Gueraud *et al.*, 2010).

1.1.2 Processo de peroxidação lipídica

Resumidamente o processo de lipoperoxidação é caracterizado pelo ataque das ERO (mais comuns são HO^{\bullet} ou HO_2^{\bullet}) às duplas ligações entre carbono-carbono dos

lipídeos das membranas biológicas: preferencialmente os ácidos graxos poli-insaturados PUFA's (*Poli-Unsaturated Fatty Acids*). De modo geral esse processo envolve três etapas: a iniciação, propagação e a terminação (figura 1) (Ayala, *et al*, 2014; Sultana, *et al*, 2013).

A primeira etapa envolve a abstração de um átomo de hidrogênio de um carbono bis-alílico do PUFA, gerando um radical lipídico (L^{\bullet}) centrado no carbono (estabilizado por ressonância), que por sua vez pode reagir com o oxigênio molecular do meio, originando o radical lipídico peroxila (LOO^{\bullet}) que por sua vez, pode abstrair outro hidrogênio de um carbono bis-alílico de uma nova molécula de ácido graxo, formando um peróxido lipídico ($LOOH$), e outro radical alquila (L^{\bullet}) e de maneira similar a etapa anterior, esse composto pode reagir com oxigênio molecular gerando outro radical centrado no carbono, e este estágio reacional caracteriza a propagação. Esses radicais podem reagir entre si, e eliminando os compostos radicalares. Moléculas capazes de doar elétrons aos radicais formados durante a propagação, também podem caracterizar o processo de terminação de maneira análoga a reação de eliminação por dois radicais, essas moléculas doadoras de elétrons são chamadas de antioxidantes, como por exemplo vitamina E, glutathiona entre outras (Gaschler & Stockwell, 2017).

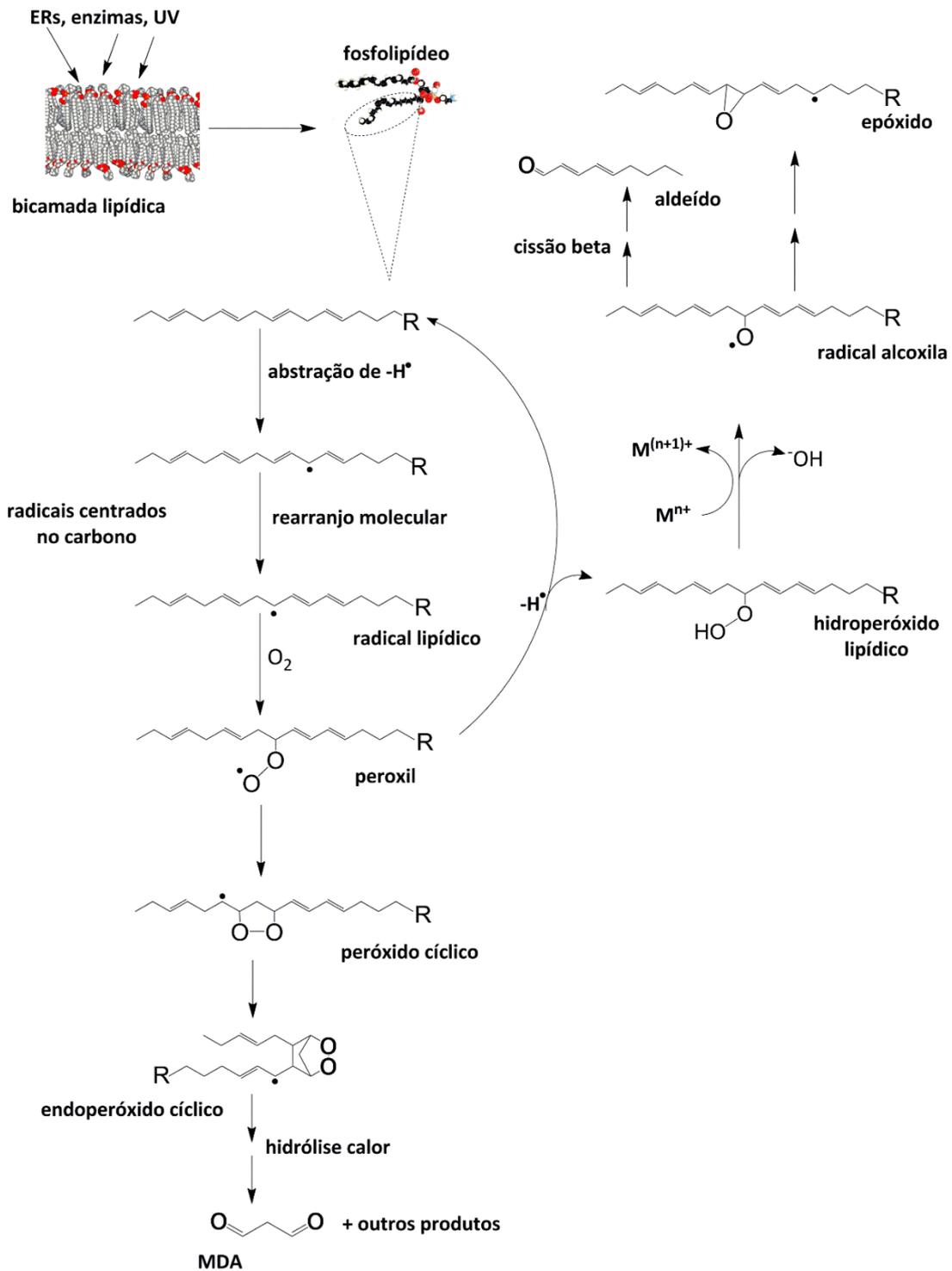


Figura 3 - Representação esquemática das reações de iniciação e propagação da peroxidação lipídica. Modificado de Freitas 2014.

1.1.3 Aldeídos

O HNE (figura 2) é um dos aldeídos reativos mais estudados, e foi descrito como um segundo mensageiro tóxico de processos mediados por radicais livres. O termo tóxico vem sendo frequentemente omitido, já que tem sido demonstrado que esse aldeído pode atuar também como modulador da diferenciação, proliferação, apoptose e na sinalização celular (Esterbauer, *et al*, 1991; Citipak, *et al*, 2006; Zarkovic, *et al*, 2013).

Os aldeídos derivados da lipoperoxidação do DHA, como por exemplo, o 4-hidroxi-*trans*-2-*cis*-6-nonadienal, acroleína e o HHE, merecem atenção devido a elevada abundância do DHA (22:6;n-3) em muitas regiões do cérebro. Nesse tecido, o DHA compreende cerca de 30-50% (níveis mais elevados que o ácido araquidônico). Ainda que o HHE possa ser gerado a partir de outros PUFA's, a concentração de DHA no cérebro é 30 vezes superior aos outros PUFA's, demonstrando assim a relevância do aldeído HHE nesse tecido (Lim, *et al*, 2005). Long *et al*, 2008, mostraram o efeito neurotóxico do HHE em neurônios do córtex.

Os hidroperóxidos lipídicos (figura 2) se decompõem em endoperóxidos e radicais alcóxila (LO*) e em vários compostos não radicalares, o que os tornam mais estáveis e difusíveis no meio celular. A cisão beta e a clivagem de Hock (figura 2) são responsáveis pela produção dos aldeídos reativos, cetonas, álcoois e etc (Schaur, 2003; Gaschler & Stockwell, 2017).

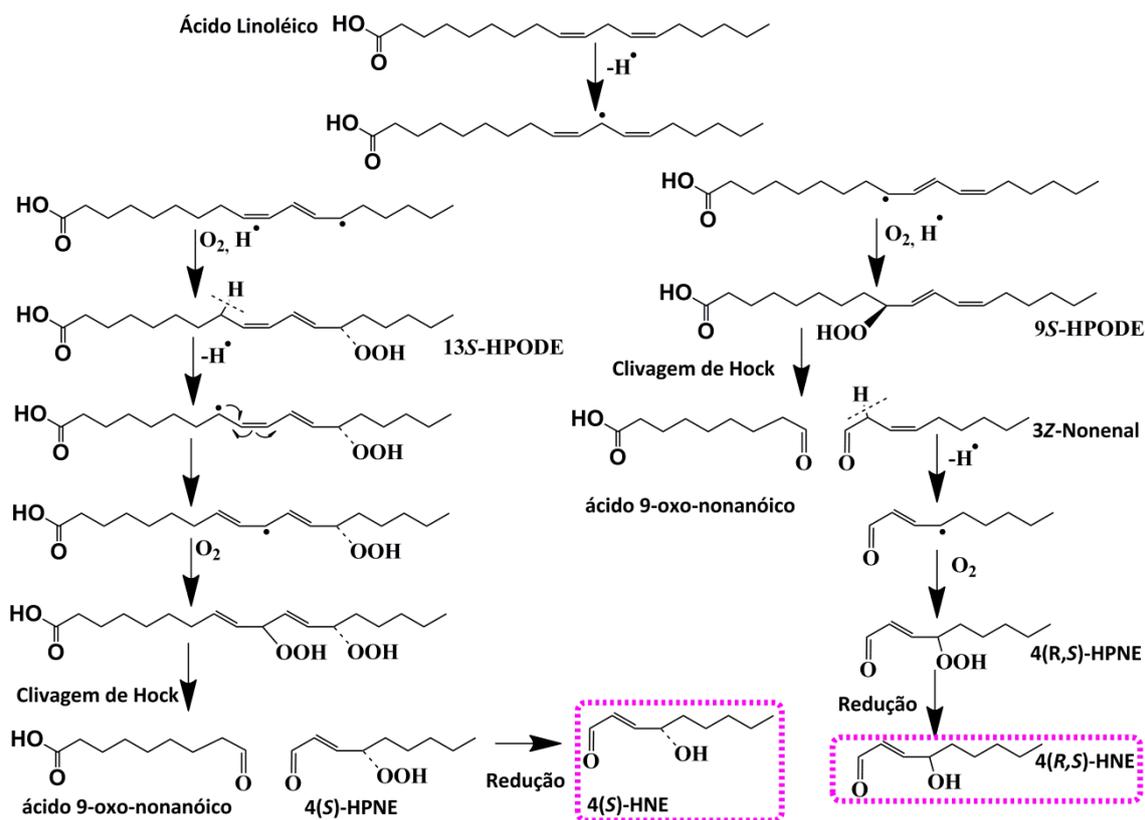


Figura 4 - Formação de HNE a partir do hidroperóxido 13 (S) e 9(S)-HPODE derivado do ácido linoléico. (Modificado de acordo com Schaur, 2003)

É interessante destacar que esses segundos mensageiros produzidos durante a formação do HNE muitas vezes se confundem com mensageiros da sinalização celular, que atuam em diversos processos biológicos, ampliando ainda mais a complexidade sobre o papel do equilíbrio redox na homeostase (Gueraud *et al*, 2010). Muitas enzimas geram mediadores da sinalização lipídica como as lipoxigenases, produzindo mediadores como o ácido hidroperoxieicoisanoico (HPETEs), lipoxinas, leucotrienos, ou a produção das hepoxilinas depois da oxidação do ácido araquidônico, ciclooxygenases que produzem as prostaglandinas e o citocromo P-450(CYP) que gera os seguintes produtos: ácido epoxieicosatrienóico, leucotoxinas, tromboxanos e prostracilinas (Massey & Nicolaou, 2011; Ayala *et al*, 2014).

Os resultados encontrados por Je *et al*, 2004 sugerem que o HHE induz a ativação do fator NF- κ B através da via IKK/NIK e/ou pela ativação da p38 MAPK e ERK associada com o estresse redox nas células endoteliais. Os resultados desse estudo indicam que a exposição ao HHE induz estresse redox nas células endoteliais (Je *et al*, 2004). O fator NF- κ B é conhecido por ser extremamente sensível ao estado redox celular e desta forma, pode desempenhar um papel crucial na modulação da expressão de uma variedade de genes envolvidos nas respostas inflamatórias, aderência, ciclo celular, sobrevivência e apoptose em vários tecidos (Je *et al*, 2004).

Esses aldeídos eletrofílicos podem reagir com grupos nucleofílicos presentes na cadeia lateral de aminoácidos modificando proteínas. Esse aspecto será discutido no próximo tópico.

1.2 Danos em proteínas por aldeídos reativos

1.2.1 Mecanismo de reação entre aldeídos e aminoácidos

Em termos de reatividade tanto o HNE quanto o HHE (figura 3) possuem três grupos funcionais, que atuam de maneira sinérgica, a dupla ligação entre os carbonos 3 e 2 e a dupla ligação do grupo funcional aldeído promovem uma aquisição de caráter parcialmente positivo (δ^+) ao carbono 3, além disso, a hidroxila no carbono 4 também contribui para o aumento dessa carga positiva parcial, culminando no ataque nucleofílico das cadeias laterais de aminoácidos (ex. grupos tióis, e etc) que ocorre primariamente pelo carbono 3 e em seguida pelo carbono 1 (Schaur, 2003; Schneider, *et al*, 2005).

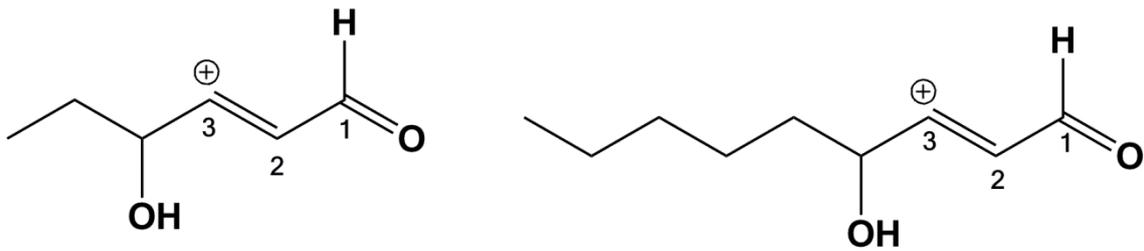


Figura 5 - Estrutura química dos aldeídos 4-hidroxi-2-hexenal (HHE) com 114 unidades de massa e o 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) com 156 unidades de massa.

A cadeia lateral de um aminoácido nucleofílico como a lisina, pode reagir com um aldeído eletrofílico, como na figura abaixo (figura 4), podendo gerar anéis pirrólicos fluorescentes formados após a ciclização de uma base de Schiff inicial, e finalizando com a via de adição de Michael, esta última via reacional é responsável pela formação da grande maioria dos produtos finais das reações de formação dos adutos de proteínas ligadas ao HNE, a razão para essa preferência reside na estabilidade química da ligação covalente formada via adição de Michael, e também porque a reação via base de Schiff pode ser reversível. Em termos de reatividade frente às cadeias laterais dos aminoácidos, a lisina e histidina são um bom alvo desses aldeídos eletrofílicos, mas a cisteína apesar de ser bem mais reativa, a ligação do grupamento sulfidril não é muito estável, podendo se reverter (Schaur, 2003; Jacobs & Marnett, 2010).

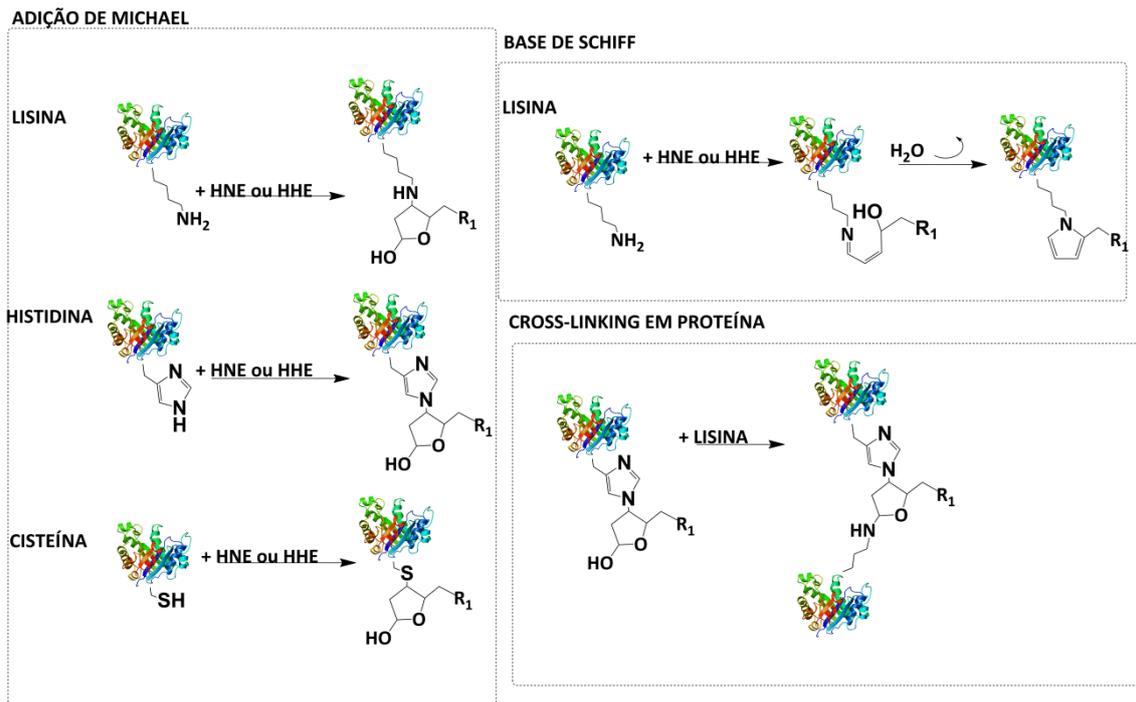


Figura 6 - Representação esquemática das reações de adição dos aldeídos HNE e HHE frente as cadeias laterais de aminoácidos nucleofílicos (modificada de acordo com Jacobs & Marnett, 2010). O grupo R1 corresponde a porção alifática dos aldeídos HNE contendo 9 carbonos e do HHE contendo 6 carbonos, respectivamente.

Doorn e Petersen (2003), observaram que os aldeídos (endógenos ou exógenos) possuem mecanismo de formação de adutos de proteínas (proteínas ligadas aos aldeídos) que diferem de acordo com a natureza química desses compostos reativos, como por exemplo o ONE (4-oxo-2-nonenal) além de ser mais reativo que o HNE, reage preferencialmente via base de Schiff, enquanto que o HNE via adição de Michael. Além das diferenças químicas, Uchida (Uchida, 2003) observou que enquanto a lisina pode originar vários produtos (adutos de proteína) quando exposta a cetoaldeídos e diversos alcenais, a histidina reage preferencialmente por mecanismo de adição de Michael para formar adutos de proteínas.

A formação de ligações cruzadas (*cross-linking*) promovidas pelos aldeídos promove grandes contribuições para a agregação de proteínas, Amarnath e colaboradores (Armanath, *et al*, 1998) observaram esse fenômeno ao incubar HHE e o 4-oxopentanal com BSA, e verificaram a presença de ligações cruzadas entre as iminas dos resíduos de lisina ou a formação de outros produtos fluorescentes.

1.2.2 Modificações em proteínas

O sistema proteassomal é responsável pela degradação de proteínas que apresentam sua estrutura química alterada, e, portanto, a perda de sua conformação nativa, culminando na perda de função. A degradação direta de proteínas carboniladas ocorre por meio de pelo menos dois mecanismos diferentes. O primeiro ocorre pela ubiquitina proteassomal independente 20S, que degrada as proteínas de conformação inadequada com base em sua capacidade de detectar resíduos hidrofóbicos expostos, esse processo é responsável pela degradação de muitas proteínas carboniladas (Grune & Davies, 2003; Grimsrud *et al*, 2008). Também foi demonstrado um papel na degradação das proteínas modificadas, depois de serem ubiquitinadas, pelo segundo mecanismo realizado pela proteína proteassomal 26S. Apesar da eficiência da remoção dessas proteínas funcionalmente comprometidas dentro das células, esse processo é altamente sensível a situações de desequilíbrio redox, em níveis que superam a concentração basal de HNE, este aldeído inibe a maquinaria do sistema proteassomal, levando a um acúmulo de proteínas modificadas sob elevados níveis de espécies reativas (Grimsrud, *et al*, 2008). Obviamente, quando ligado as proteínas, o HNE tem uma certa tendência de torná-las mais sensíveis a degradação proteassomal, responsável pela maior parte da proteólise intracelular. Em geral, conforme já discutido no parágrafo

anterior, o sistema proteossomal é capaz de remover a maior parte das proteínas com danos oxidativos e modificadas, porém, em uma situação de forte estresse redox ocorre um acúmulo de proteínas modificadas (Shaur, 2015; Grimsrud *et al*, 2008). Em situações de aumento do estresse redox, um fator transcricional de resposta antioxidante pode ser ativado, esse fator é chamado de Nrf2 (*NF-E2-related factor 2*) esse fator promove a ativação de genes de elementos de natureza antioxidante, em resposta aos níveis aumentados de compostos eletrofílicos como o HNE, por exemplo. O Nrf2 está presente no citoplasma ligado ao seu inibidor, um outro fator denominado de Keap 1 (*Kelch-like ECR-associated protein 1*), a alquilação dessa ligação entre esses dois fatores pelo HNE ou outro composto eletrofílico, leva a dissociação de ambos, e uma vez livre o Nrf2 segue em direção ao núcleo e ativa a expressão de genes dos elementos antioxidantes, aumentando as defesas antioxidantes (Levonen *et al*, 2004; Taguchi *et al*, 2011;Uruno *et al*, 2015).

Em 2015, Shaur e colaboradores (Shaur, *et al*, 2015) apresentaram uma extensa revisão sobre a atividade biológica de proteínas modificadas, e as consequências dos efeitos biológicos deste composto eletrofílico (aldeídos) ligados em algumas proteínas individuais com maior chance de formar aduto com HNE, em uma condição de aumento do estresse redox. Na paralisia progressiva supranuclear, uma desordem neurodegenerativa que é possivelmente induzida por estresse oxidativo, dois terços do total de glutathione peroxidase (GPx) no fluido cérebroespinal foi encontrada alquilada com HNE, comprometendo esse sistema antioxidante de funcionar adequadamente já que uma grande parte da glutathione peroxidase (enzima que oxida a glutathione reduzida) está conjugada com o HNE (Shaur, *et al*, 2015).

Algumas dessas proteínas revisadas por Shaur merecem destaque pelo papel biológico que exercem, como por exemplo as tioredoxinas (TRXs), que participam do sistema antioxidante da retina. Depleções nesse sistema levam a perda de função do pigmento epitelial das células (RPE), acelerando o desenvolvimento da degeneração macular ligada ao envelhecimento (AMD “*age macular disease*”). Para avaliar o efeito da superexpressão das tioredoxinas na viabilidade celular nesse modelo de degeneração macular, mediada pelo stress redox induzido pelo HNE. Os autores encontraram que a superexpressão de TRXs reduz a morte celular mediada por HNE (esse aldeído causa acúmulo perinuclear de NFkB), essa superexpressão de TRXs impede a despolarização da membrana mitocondrial, essas proteínas tem papel fundamental na fisiopatologia desse modelo de RPE (Shaur, *et al*, 2015).

De modo geral, a proteína membrana de transporte de glutamato é fundamental para o funcionamento adequado do tecido nervoso. Em pacientes portadores da esclerose lateral amiotrófica esporádica, encontrou-se um aumento de proteínas modificadas por HNE em amostras de medula espinhal quando comparadas ao controle neurologicamente saudável. Esse trabalho revelou que uma das proteínas modificadas por HNE foi o transportador de glutamato em astrócitos (EAAT2) (Shaur, *et al*, 2015). Em outro trabalho com amostras de portadores do mal de Alzheimer foi demonstrado que os agregados de proteína β -amilóide podem induzir a lipoperoxidação e a formação de HNE, além de bloquear o funcionamento dos transportadores de glutamato e glicose, através das proteínas de membranas ATPases (porção ionica), e ainda estimular o influxo de cálcio através dos canais ligantes de cálcio dependentes de voltagem (Lovell, *et al*, 2012; Mattson & Chan, 2003; Shaur, 2015). Através da relação próxima entre os efeitos deletérios que o estresse redox possui com a agregação de

proteínas em modelos de neurodegeneração; a α -sinucleína é uma proteína estudada por sua alta abundância em muitas regiões do cérebro, é foco de estudo, não só pela pouca compreensão de seu papel fisiológico nas células do sistema nervoso. Sabe-se que a α -sinucleína atua no funcionamento da liberação e recaptção dos neurotransmissores das vesículas pré-sináptica mas, também existe um grande interesse pelo seu envolvimento direto na formação dos corpos de Lewy, que são agregados proteicos, formando inclusões intracelulares (Jomova *et al*, 2010; Xiang, *et al*, 2013; Bae, *et al*, 2013). Esses agregados são característicos para o diagnóstico da doença de Parkinson (PD – *Parkinson Disease*), e ao olhar atentamente para as modificações nesses agregados, induzidas por marcadores de estresse redox (HNE, nitração, e oxidação) percebeu-se que a polimerização dos agregados dessa proteína também é promovida por mediadores de estresse redox (Xiang *et al*, 2013; Bae, *et al*, 2013; Shaur, *et al*, 2015;). Almandoz-Gil, *et al*, em 2017 observaram que aldeídos como ONE e HNE podem modificar a alfa-sinucleína e induzir a oligomerização mesmo em baixas concentrações molares desses aldeídos.

E por fim uma proteína importante no controle pró-homeostase dos processos redox, é a proteína dissulfeto isomerase (PDI), rica no retículo endoplasmático. É uma chaperona e possui atividade catalítica de oxidoreductase na formação e rearranjo das pontes de sulfeto, além de participar da organização conformacional correta das proteínas. Modificações em sua própria estrutura por adição de HNE, por exemplo, ou lipoproteína de baixa densidade oxidada (oxiLDL), inibe a sua atividade enzimática e potencializa o estresse redox no reticulo endoplasmático e a apoptose mediada por LDL oxidada, que leva ao aumento da expressão de mRNA para fatores de transcrição que regulam o estresse oxidativo (CHOPC/EBP homólogo de proteína) (Shaur, *et al*, 2015).

1.3 Esclerose Lateral Amiotrófica

A esclerose lateral amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa que leva à destruição progressiva dos neurônios motores, afeta neurônios localizados em toda extensão do trato corticoespinhal, medula e o tronco cerebral, os sintomas clínicos envolvem fraqueza muscular progredindo rapidamente para atrofia e paralisia muscular generalizada, a expectativa de vida após diagnóstico é de 3 a 5 anos (Thonhoff, *et al*, 2007; Kiernan *et al*, 2011). A taxa de incidência média (número de novos casos por ano) de ELA no mundo todo é de 2 casos por ano em uma população de 100.000 habitantes e a média de idade dos portadores diagnosticados fica entre 55 e 65.1 anos e a prevalência (número de pessoas vivendo com ELA) (é de 1,9 – 11,3 casos por 100.000 habitantes), já na Europa a incidência é 1,47 – 2,43/ 100.000 habitantes, (e a prevalência de 5.40 casos (4.06 – 7.89) por 100.000 habitantes), e a ELA acomete mais homens (1,6) do que mulheres(Chio, *et al*, 2011; 2013; Metha, *et al*, 2014).

A ELA é considerada uma doença idiopática, porque não possui uma causa pontual, única e possui um comportamento esporádico, por isso, 90% dos casos são chamados clinicamente de ELA esporádica, e os 10% restantes dos casos de ELA possuem herança genética autossômica dominante: ELA familiar. Dentro da classe de ELA familiar, em 20% dos casos, o fenótipo neurodegenerativo está ligado ao cromossomo 21 que gera mutações na proteína cobre-zinco superóxido dismutase (SOD1). Existem mais de 160 modificações possíveis, a maioria *missense* (nos 153 códons do gene da SOD) (Vucic, *et al*, 2009; kiernan, *et al*, 2011). Atualmente o tratamento consiste na administração de riluzol, um inibidor da liberação de glutamato, esse medicamento dá uma sobrevida aos pacientes de apenas 3 meses. Em 2017, um

medicamento foi recém aprovado pelo FDA, o radicava (edaravone) que atua como antioxidante (Yoshino, *et al*, 2006)

1.3.1 Mecanismo fisiopatológico de ELA

Como já mencionado anteriormente o comportamento dos eventos fisiopatológicos em ELA é multifatorial, com grandes evidências de uma complexa interação entre vias de sinalização moleculares e características genéticas (Vucic, *et al*, 2009; Pasinelli, *et al*, 2006; Kiernan, *et al*, 2011). A ELA é uma forma mais comum da doença do neurônio motor (DNM), e se caracteriza pela paralisia neuronal progressiva [dos neurônios motores superiores (NMS)], através de clônus (contrações involuntárias) e sinais de babinski (teste clínico de reflexos) e da atrofia muscular acompanhada de fasciculações (cãimbras) [dos neurônios motores inferiores (NMI)] (Kiernan, *et al*, 2011). Inicialmente a doença foi descrita de acordo com a observação de Charcot dos sinais de danos nos NMS e nos NMI simultaneamente, mas atualmente ainda não se estabeleceu quais dos dois tipos (NMS e NMI) de disfunção neuronal isoladamente inicia de fato a doença, é importante ressaltar que a ELA também pode se manifestar com danos neuronais motores puramente via NMS (é uma manifestação clínica mais rara) que danos puramente via NMI, que representa a maioria dos casos clínicos (ligadas a atrofia muscular) (Kiernan, *et al*, 2011).

Uma revisão abrangente sobre os aspectos fisiopatológicos na ELA (Kiernan, *et al*, 2011) sugere duas hipóteses com fundamentos moleculares distintos: 1) Hipótese dos danos iniciais em NMS – propõe que o início da desordem neurocorticomotora seja causada pela excitotoxicidade mediada por glutamato, provocando degeneração dos

neurônios motores corticais que se conectam monosinápticamente com neurônios dos cornos anteriores. Os resultados que suportam essa hipótese vêm de estudos com estimulação magnética transcranial, os quais mostraram que a hiperexcitabilidade cortical é uma das primeiras evidências na ELA esporádica e familiar (Eisen, *et al*, 1992; Kiernan, *et al*, 2011; Wong, *et al*, 1995). Curiosamente, neurônios motores sem conexões monosinápticas com neurônios motores corticais, como por exemplo, os nervos oculomotores, abducentes, e etc, são poupados durante o desenvolvimento da ELA; 2) Hipótese dos danos iniciais nos NMI – propõe que a ELA inicia nas células musculares ou nas junções neuromotoras, devido a deficiência de um fator hormonal neutrófico motor, que é liberado por células pós-sinápticas e transmitido (estímulo retrógrado) até o axônio pré-sináptico para o corpo celular onde ele exerce efeitos biológicos, as evidências dessa hipótese incluem o fato de que a degeneração do neurônio motor inicia-se através da perda de inervação sináptica, e que esse processo é mediado pelo acúmulo da proteína mutante SOD1 nas células de Schwann, apesar dessas duas hipóteses, parece que tanto a degeneração do NMS e do NMI, ocorrem de maneira independente (Lederer, *et al*, 2007; Vuic, *et al*, 2008).

Com relação aos processos moleculares e genéticos envolvendo a neurodegeneração na ELA, a figura 5 mostra a interação complexa entre a excitotoxicidade do glutamato, geração de radicais livres, agregados de proteínas citoplasmáticas, enzimas como a SOD1, combinadas as disfunções mitocondriais e interrupção do transporte axonal através do acúmulo de agregados intracelulares neurotóxicos (Vuic, *et al*, 2008)

É importante frisar que a excitotoxicidade do glutamato ocorre quando há estimulação excessiva por glutamato aos receptores do tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) para este aminoácido excitatório, níveis elevados de glutamato aumentam os níveis de cálcio (Ca^{2+}) intracelular, e esse influxo de cálcio ativa uma série de fosfolipases, endonucleases e proteases que comprometem importantes biomoléculas de citoesqueleto, membranas e DNA (Jaiswal *et al*, 2009; Manec,*et al*,1989). De acordo com a figura 5 sobre o glutamato, de fato há uma redução dos receptores de glutamato (EAAT2) nos astrócitos (responsáveis por remover o glutamato da fenda sináptica) em portadores de ELA (Zarei, *et al*, 2015).

Mutações nos genes TARDBP (*Dna Binding Protein*) e FUS (*fused in sarcoma*) também foram identificados na ELA, as mutações em TARDBP e FUS, que codificam para a proteína TDP-43, e para a proteína FUS estão envolvidas com a disfunção no processamento de RNA (Van Deerlin, *et al*, 2008; Rutherford,*et al*, 2008).

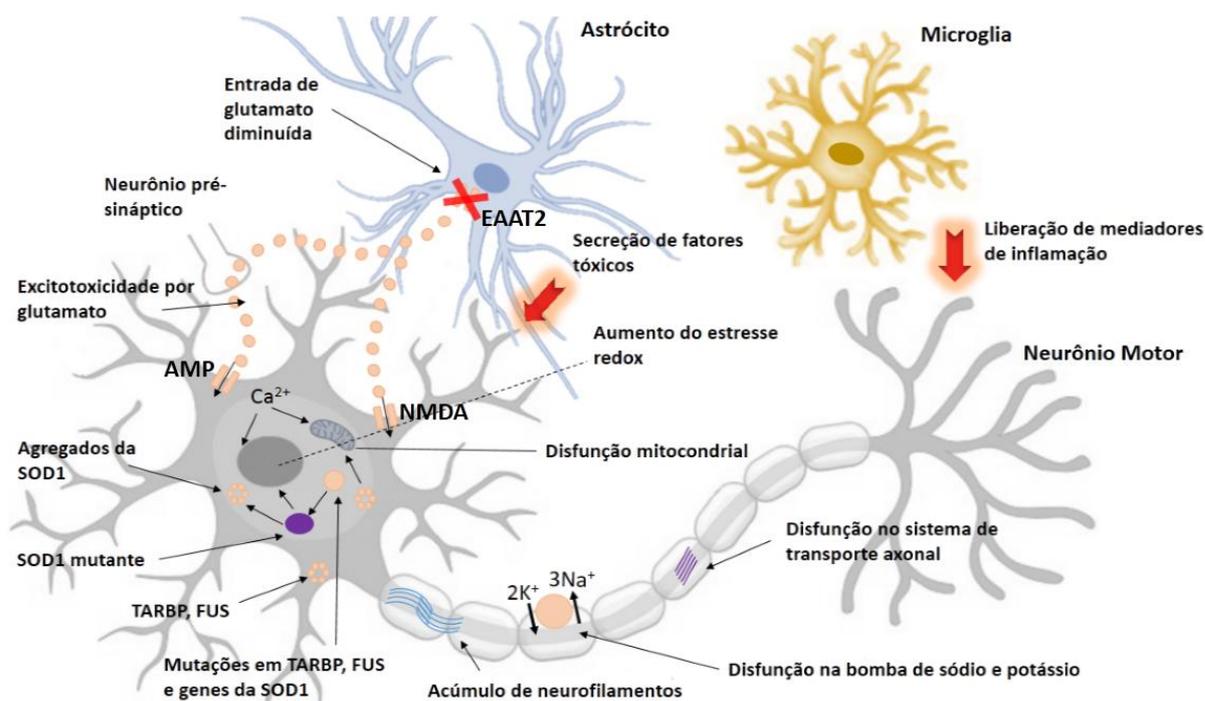
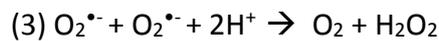
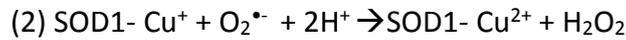
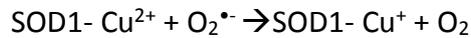


Figura 7– Representação esquemática sobre os eventos moleculares envolvidos na ELA. A interação entre os neurônios durante a excitotoxicidade do glutamato, com o bloqueio da recaptação de glutamato pelos astrócitos afeta o neurônio motor (cinza) levando aos efeitos deletérios do influxo de cálcio. Geração de radicais livres e agregação proteica (SOD1, TARBP e FUS) agravam os danos neuronais. A ativação da micrógliia resulta em secreções de citocinas pró-inflamatórias. Modificado de acordo com Kiernan, et al, 2011.

1.3.2 Superóxido Dismutase

A superóxido dismutase 1 (SOD1) é composta por um dímero de subunidades iguais, contendo 32 kDa e contendo um íon de Cu^{2+} e um íon de Zn^{2+} , é uma das defesas antioxidantes mais importantes, ela atua tanto no citoplasma quanto no espaço intermembranar da mitocôndria. O mecanismo reacional da SOD1, conforme demonstrado nas reações abaixo, utiliza o íon radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) como substrato para promover a dismutação formando peróxido de hidrogênio e O_2 , em sequência, o

H₂O₂ é dismutado pela enzima catalase (CAT) produzindo água e O₂ (Hopkins, 2016; Zhu, 2016; Fridovich, 1997).



Como as mitocôndrias representam umas das principais fontes da formação de superóxido endógeno, na matriz mitocondrial a SOD2 (Mn-SOD) catalisa a dismutação do superóxido, formando H₂O₂, que é convertido em água pela GPx e pela Prx. Se o ânion superóxido atravessar a membrana mitocondrial interna e chegar ao citossol, a SOD1 (CuZn-SOD) promove a sua dismutação formando H₂O₂. O H₂O₂ é convertido em água tanto pela catalase quanto pela GPx e Prx (Hopkins, 2016).

Existe uma discussão sobre a contribuição da SOD1 mutada durante a progressão da ELA, inicialmente acreditava-se que seria devido a perda da atividade da SOD1, Entretanto, hoje há indícios de que a conformação inadequada da SOD1 mutante, parece ser decisiva na formação dos agregados tóxicos, curiosamente, a SOD1 nativa (conformação funcional ativa) ao sofrer oxidação assume uma conformação inadequada e forma agregados de maneira semelhante à SOD1 mutada (Robberecht & Philips, 2013). Esses agregados são tóxicos porque não são nem eliminados pelo sistema proteassomal nem pelo lisossomo, e, além disso, esses agregados podem ainda sequestrar co-fatores essenciais para o funcionamento adequado da célula (Robberecht & Philips, 2013).

Portanto, ainda que não exista uma causa pontual para ELA, há fortes indícios do envolvimento dos processos redox no quadro fisiopatológico da ELA, mediado por diversos eventos genéticos e moleculares conforme mencionado.

2. *Objetivo geral*

Contribuir na elucidação dos mecanismos moleculares associados ao desenvolvimento da esclerose lateral amiotrófica através da identificação, caracterização e quantificação de modificações pós-traducionais em proteínas pelos aldeídos HHE e HNE *in vitro* (citocromo c) e *in vivo* (modelo ELA) a partir de técnicas de *Western blot* e espectrometria de massa com abordagem proteômica de “*shotgun*”.

2.2 *Específicos*

- Avaliar reatividade e mecanismo químico de adição dos aldeídos HNE e HHE frente ao citocromo c;
- Avaliar o conteúdo de proteínas modificadas por HNE e HHE utilizando anticorpos (anti-HNE e anti-HHE), visando quantificar por meio de *western blot* de amostras de córtex motor dos animais transgênicos SOD1^{G93A}.
- Avaliar o perfil proteômico global dos animais da linhagem SOD1^{G93A}, e ver proteínas diferencialmente expressas nos grupos de animais portadores do gene e seus respectivos controles saudáveis, pré-sintomáticos (70 dias de vida) e sintomáticos, verificar proteínas exclusivas para cada grupo, e quantificar proteínas importantes na fisiopatologia e impacto biológico no quadro de ELA;
- Analisar as PTMs induzidas por HHE e HNE, através dos dois mecanismos reacionais de adição desses aldeídos: base de Schiff ou por adição de Michael, validar e comparar o conjunto de proteínas obtidas com as análises anteriores;
- Analisar os processos biológicos (*Gene Ontology*) dos grupos de proteínas encontradas nas análises citadas nos três últimos tópicos acima, e relacionar

indícios de possíveis biomarcadores de proteínas no cenário de processos redox em ELA.

3. Materiais e Métodos

3.1 Ensaios *in vitro* com citocromo c

Utilizou-se o procedimento conforme descrito por Zhu *et al*, 2010, para observar a adição dos aldeídos na proteína intacta. Foram adicionados 20 μ L (2,5 mM) do padrão de citocromo c (coração bovino, Sigma-Aldrich) em 20 μ L contendo 2 mM de 4-hidroxi-trans-2-nonenal dimetilacetal (HNE, Sigma-Aldrich) ou 4-hidroxi-2-hexenal (HHE, Sigma-Aldrich). Todas as amostras foram diluídas em 160 μ L de tampão fosfato a 25 mM (KH_2PO_4 , Sigma-Aldrich, pH 7) e incubadas a 37°C por 2 h a 350 rpm. Os controles (sem os aldeídos) foram feitos em paralelo.

Antes de tratar as amostras de citocromo c com o HNE, este aldeído foi previamente hidrolisado em uma solução de 1 mM de HCL, na proporção de 1:1 por 30 min a 4 °C, de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, as misturas reacionais das proteínas intactas foram individualmente distribuídas em tubos de acordo com a seguinte classificação: 1) citocromo c controle; 2) citocromo c + HNE; 3) citocromo c + HHE, as amostras foram analisadas em espectrômetro de massa tipo MALDI-TOF (UltrafleXtreme, Bruker Daltonics). Como matriz utilizou-se ácido sinapínico (Sigma-Aldrich).

As amostras foram diluídas na razão de 1:2 (amostra:matriz) em uma solução saturada e aquosa (1:1) de ácido sinapínico em 50 % de acetonitrila e 0,1 % ácido trifluoroacético. 1 μ L dessa solução (em triplicata para cada condição) foi aplicada na placa de metal, até que as amostras secassem completamente, e a placa foi inserida no espectrômetro MALDI-TOF. Utilizou-se um calibrante contendo uma mistura de padrões de proteínas intactas conhecidas, entre cada amostra.

As proteínas foram analisadas linearmente no modo positivo (para faixas de massa de 5 a 20 kDa) com voltagem de aceleração de 20 kV e com um laser de intensidade de 1,5 kV, e os espectros de MS foram obtidos com aproximadamente, 200 tiros do laser.

3.1.1 Digestão do citocromo c

As amostras acima foram submetidas à digestão triptica (*bottom-up*), para avaliar os resíduos modificados na sequência primária dos peptídeos pelos aldeídos, obtida através dos íons fragmentos MS/MS, de cada íon precursor MS obtido. Para isto, incubaram-se 50 µL das misturas reacionais de citocromo c (controles e tratamentos) a 95 °C por 15 min para desnaturá-las, em seguida, após esfriar, as amostras foram tratadas com 1 µL (1 µg/µL) de tripsina (*proteomic grade*, Sigma-Aldrich), 50 µL de tampão NH₄HCO₃ (100 µM, Sigma-Aldrich), 38 µL de água deionizada, 10 µL de citocromo c (100 µM) e 1 µL de CaCl₂ (100 µM, Sigma-Aldrich) em um volume final de 100 µL. As misturas reacionais foram incubadas *overnight* à 37 °C, a 450 rpm.

Após incubação de 18 h, os peptídeos resultantes foram eluídos em colunas de C18 *zip tip* (Milipore) para remover os sais e resuspenso em 100 µL de água a 0,1% de ácido fórmico (Merck) para as análises de massas.

3.1.2 Método de obtenção de MS e MS/MS por NanoLC/ESI/MSMS

Os peptídeos foram separados em um sistema de cromatografia líquida de fase reversa (LC) em nano fluxo (nano-Acquity UPLC System, Waters), acoplado à

espectrômetro de massa do tipo UHR-ESI-Q-TOF (*Ultra High Resolution-Maxis 3G*, Bruker Daltonics) com fonte de iônização por ESI (*Captive Spray*) em modo positivo utilizando uma coluna capilar Zorbax 300SB-C18 (150 mm x 75 µm; 3,5 µm, Agilent Technologies).

As amostras foram injetadas (1-5 µL, padronizadas pela intensidade relativa de 10^6) a um fluxo de 300 nL/min utilizando um gradiente linear de 5-95% do solvente A (0,1% ácido de fórmico em água) para o solvente B (0,1% de ácido fórmico em acetonitrila) entre 0-65 min, e voltando a 5% em 72 min. Parâmetros: voltagem do capilar de 1,8 kV, gás de nebulização de 1,6 bar, temperatura de 200°C; gás de secagem de 9 L/min e calibração interna (*lock mass calibrant*, 1221 Da) previamente ajustados. A varredura total TIC (*Total Ion Chromatogram*) foi adquirida no intervalo m/z de 500 a 1200.

Utilizou-se a aquisição dependente dos dados (DDA – *data-dependent acquisition*) que selecionou os íons precursores (MS) mais intensos no quadrupolo. Os espectros de fragmentação desses peptídeos foram obtidos na cela de colisão por CID em seguida, os MS/MS resultantes foram separados e analisados no QToF (tempo de voo da relação m/z dos fragmentos).

3.1.3 Processamento dos dados e método de otimização dos peptídeos modificados por NanoLC/ESI/MSMS

Os dados “brutos” (*raw file*) de MS e MS/MS foram refinados pelo *software* “Data Analysis” (Bruker Daltonics) através de uma série de parâmetros como, remover o calibrante, deconvolução dos espectros, entre outros, para convertê-los em arquivos de

MGF (*Mascot Generic File*). O algoritmo *Sum peak* foi utilizado para os espectros de MS/MS, além da utilização do método de listas de exclusão e inclusão de massas conforme descrito na figura 6.

Em seguida, o *software* “Biotools” (Bruker Daltonics) foi utilizado para promover a interface entre arquivos de MGF obtidos (experimentais) utilizando o banco de dados *SwissProt* contido na base virtual de bancos de dados de MS/MS ou PMF (*Peptide Mass Fingerprint*) “Mascot” (Versão 2.5, Matrix Science) para a identificação dos peptídeos (com e sem as modificações) com os seguintes parâmetros de buscas: tolerância de 10 ppm para o íon precursor e de 0,05 Da para os íons fragmentos como modificações globais oxidação (M) e acetilação do N-terminal e para as modificações variáveis por HNE e HHE, até 2 perdas dos sítios de clivagens da tripsina, massa monoisotópica e estados carregados de +2 a +4.

Em paralelo, como suporte na validação manual dos fragmentos peptídicos de interesse, utilizou-se o *software* “Sequence Editor” (Bruker Daltonics) que simulou a digestão trípica teórica do citocromo c através da sequência primária do mesmo, que foi obtida no PDB (*Protein Data Base*, fasta file: 2B4Z), fornecendo todos os íons precursores MS e fragmentos MS/MS (série completa dos íons a, b, c e z, y, x) dos peptídeos dessa proteína.

Foi desenvolvido um método (figura 6) para favorecer a obtenção dos peptídeos modificados (íons precursores, com adição de massas de cada aldeído), que em geral, apresentam uma abundância relativa consideravelmente menor frente aos mesmos sem a modificação, que consistiu de uma lista de inclusão das massas dos mesmos, como

preferenciais, e uma lista de exclusão das massas dos peptídeos sem modificação (em geral mais intensos que os modificados).

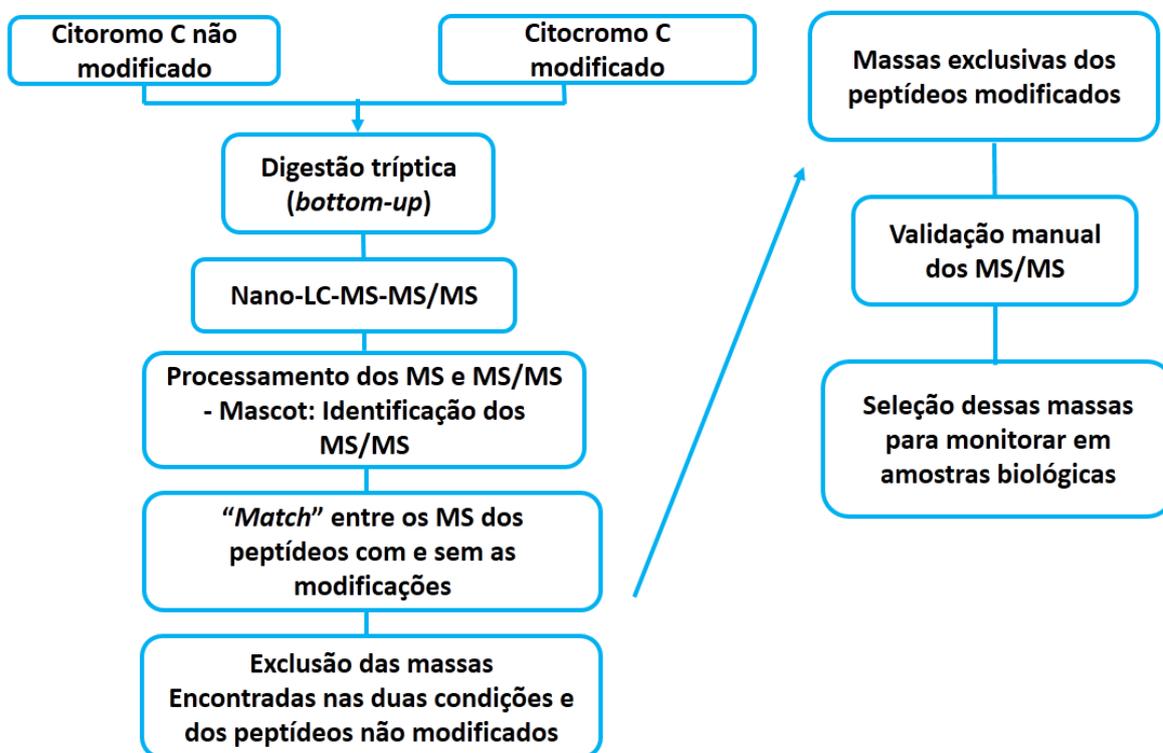


Figura 8 - O esquema acima ilustra o método elaborado na otimização da intensidade dos peptídeos (MS) modificados por NanoLC/ESI/MSMS (Q-TOF Maxis 3G, Bruker Daltonics). Tanto a exclusão como a inclusão, foi realizada através da criação de listas de massas, durante o processamento de dados.

3.2 Ensaios *in vivo* com modelo animal de ratos transgênicos Sprague Dawley

SOD1^{G93A}

3.2.1 Modelo Animal Utilizado

Os ratos transgênicos da linhagem *Sprague Dawley* SOD1^{G93A} foram desenvolvidos pela empresa Taconic Biosciences. Os animais possuem o gene humano da proteína mutada cobre-zinco-superóxido dismutase (SOD1) e super-expressam ± 8 cópias desse gene. Os ratos foram mantidos no biotério em condições controladas de

temperatura e ciclo de claro-escuro de 12 h, alimentação e água foram oferecidas *ad libitum*. Os experimentos obedeceram às diretrizes e normas preconizadas pela *NIH-National Institute of Health*, pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório – SBCAL e pela lei nº 11.794, Sérgio Arouca de 2008. Todos os procedimentos foram revisados e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Química – USP (CEUA/IQ USP 04/2012).

3.2.2 Genotipagem

A genotipagem foi realizada para estabelecer o número dos animais saudáveis e dos portadores do gene da doença, para manutenção da linhagem, e definição dos grupos experimentais. Obteve-se uma ninhada de fêmeas em março de 2015 (após o desmame, \pm 50 dias de vida). Para esse procedimento, um pedaço da orelha foi coletado por um funcionário do biotério do Instituto de Química (IQ-USP). As amostras foram submetidas à digestão, foram adicionados 300 μ L do tampão de digestão (tris-HCL – hidroximetil aminometano, 50 mM, pH 8,0; 50 mM de EDTA – ácido etilenodiamino tetraacético e 0,5% de SDS – dodecil sulfato de sódio) e as amostras foram incubadas a 65°C por 15 min. Em seguida foram adicionados 200 μ L de tampão de digestão contendo proteinase K (10 mg/mL, Sigma Aldrich) e as amostras foram incubadas *overnight* a 55°C, e sob agitação (350 rpm). No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas (Eppendorf) a 14000 rpm por 5 min, e foram retirados 10 μ L cuidadosamente do sobrenadante da amostra e diluídos em 190 μ L de água autoclavada, e aquecidos a 95°C por 15 min para inativar a proteinase.

Para o PCR (*polymerase chain reaction*) foram utilizados 25 µL do PCR *master mix* 2x (Invitrogen), contendo *Taq* DNA polimerase 0,05 U/µL, tampão PCR, MgCl₂ 4 mM e 0,4 mM de cada desoxiribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Invitrogen) combinados a 2 µL da amostra (após o resfriamento), 22,6 µL de água e 2 µL dos seguintes *primers*:

Sodi3-f primer - GT GTG GCA TCA GCC CTA ATC CA

Sodi4-r primer - CAC CAG TGT GCG GCC AAT GA

Para a amplificação do gene humano da SOD1, as amostras foram submetidas ao PCR de acordo com o seguinte ciclo: 95°C por 5 min (1x), 95°C por 1 min, 60°C por 1 min, 72°C por 2 min (35x) e 72°C por 5 min. Ao término da reação, adicionou-se 8 µL do *loading buffer* (Invitrogen) em cada amostra que foram aplicadas em um gel de agarose a 2% contendo 0,2 µL/mL de brometo de etídio e foi adicionado o tampão TAE (tris a 40 mM pH 7,6 e ácido acético 20 mM). Utilizou-se *Range Low DNA* (Invitrogen) como padrão de peso molecular das bases. A corrida eletroforética foi realizada por 1 h a 100 V.

3.2.3 Seleção dos grupos experimentais

Inicialmente, foram selecionados 40 animais (fêmeas) do modelo de ratos transgênicos *Sprague Dawley* SOD1^{G93A} (modelo semelhante à herança familiar de esclerose lateral amiotrófica). Estes animais foram divididos em 2 grupos, cada um contendo 20 animais (n=10). Ambos os grupos foram subdivididos em: (1) controle, animais negativos para o gene SOD1 humana mutada e, (2) portadores do gene da doença, animais positivos para esse gene, previamente identificados através dos resultados obtidos na genotipagem (descrita no **item 3.2.2**).

O primeiro grupo foi classificado como pré-sintomáticos (Grupo 1), formado por animais com 70 dias de vida, idade pré-determinada baseada na idade em que geralmente os animais modelo de ELA, atingem seu peso máximo (considerado um dos sinais clínicos para o início da doença). Foram subdivididos em: Ctl Pre – 10 animais, controles 70 dias de vida e, ELA Pre – 10 animais portadores do gene da ELA 70 dias de vida.

O segundo grupo de 20 animais foi denominado de sintomáticos (Grupo 2), e subdivididos na mesma organização do grupo anterior: Ctl Sin – controles sintomáticos, e o ELA Sin – portadores sintomáticos da ELA. Todos os animais (40) foram submetidos ao acompanhamento por meio de um teste neurológico baseado no peso (conforme a descrição do próximo item) para identificar a progressão dos sintomas da ELA.

3.2.4 Avaliação neurológica dos ratos e acompanhamento dos sintomas

O protocolo de avaliação física utilizado neste trabalho foi de acordo com Matsumoto *et al* (2006). Os ratos SOD1^{G93A} foram pesados uma vez por semana até atingirem 70 dias de idade para metade dos animais (20), e a partir disso, para outra metade, a cada dois dias até atingirem (máximo 140 dias) e sempre no mesmo horário 10-12 h. Durante o período das avaliações por peso, o estudo foi conduzido como “duplo-cego”. Para a avaliação dos animais portadores da ELA, utilizou-se o peso como critério neurológico de acordo com Matsumoto *et al* (2006) que utilizando o mesmo modelo animal relacionou o momento em que os portadores da ELA atingem o seu peso máximo, com o início da manifestação dos sintomas da ELA, além disso, o peso é um critério menos subjetivo. Portanto, a relação de perda de 20% levou em consideração o

peso máximo como “onset” de ELA (primeiros sinais clínicos para doença), e não simplesmente uma perda com relação ao seu peso médio, por exemplo [(peso máximo x 20/100) – peso máximo].

3.2.5 Eutanásia dos animais e obtenção dos tecidos

A eutanásia dos animais pré-sintomáticos (Ctl Pre e ELA Pre) foi realizada ao atingirem 70 dias de vida, e dos sintomáticos portadores ELA (ELA Sin), foi realizada utilizando o critério da perda de 20% de peso e acompanhada do sacrifício dos respectivos controles (Ctl Sin) de cada animal doente. A ração foi removida 6 h antes da eutanásia (para reduzir a interferência de variações metabólicas). Os animais foram anestesiados através de uma injeção peritoneal do anestésico cloridrato de cetamina (90 mg/kg), e do relaxante muscular cloridrato de xilazina (10mg/kg), após a certificação da perda dos reflexos e principalmente da propriocepção, os animais foram sacrificados por exsanguinação, através da punção cardíaca, em seguida os órgãos (cérebro, medula, músculos do membro posterior direito, coração e fígado) foram removidos e lavados em solução salina 0,9% com Chelex (Sigma-Aldrich) até remover o sangue ao máximo, e em seguida, foram armazenados no freezer -80°C.

3.3 Preparo das amostras biológicas

3.3.1 Tecidos

Para as análises *in vivo* desse trabalho, foram utilizados os córtex motores para os ensaios de *western blot*, que foram conduzidos com amostras teste obtidas de ratos

fêmeas da ninhada de 2013, todas sintomáticas com seus respectivos controles saudáveis pareados (irmãs), apresentando paralisia nos membros posteriores. Os córtex motores (direito e esquerdo) foram cuidadosamente seccionados e pesados (± 300 mg). Os tecidos foram homogeneizados em 1 mL de TBS contendo 0,5% de triton (Sigma-Aldrich) e os inibidores de proteases (30 μ L de pepstatina - 0,5 μ g/mL; 30 μ L de apoproteína - 1 μ g/mL; 30 μ L leupeptina - 1 μ g/mL; 30 μ L de PMSF *phenyl-methyl-sulfonyl-fluoride* - 250 mM, Sigma- Aldrich); 60 μ L de ortovanadato Na⁺ (100 mM, Sigma-Aldrich). Os homogenatos resultantes foram centrifugados a 14.000 rpm por 5 min a 10°C. O sobrenadante foi removido com cuidado e transferido para um tubo limpo e o *pellet* foi descartado.

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1979) utilizando um espectrofotômetro (UV-1650, Shimadzu) a 595 nm. As curvas de calibração foram preparadas com uma solução padrão de albumina de soro bovino (BSA, Sigma-Aldrich) na concentração de 1 μ g/ μ L. A diluição seriada partiu da menor concentração de 0,625 μ g até a maior de 20 μ g. As amostras do córtex motor (cerca de 5-10 μ g/ μ L de proteína) foram aliquotadas e armazenadas no freezer -80.

3.4 Ensaios de imunoafinidade

3.4.1 SDS Page e Western Blot

Após a quantificação, as amostras de proteínas foram submetidas à eletroforese onde foram utilizados géis de poliacrilamida (12% para o géis de resolução e a 5% para

os géis de empacotamento). As amostras foram previamente aquecidas a 95°C por 7 min em seguida, cada amostra contendo 25 µg de proteína recebeu 20 µL de tampão TBST (*tris saline buffer*, NaCl 150 mM, Tris-HCL 50 mM, 0,5% de triton), mais 5 µL de tampão de amostra contendo e aplicadas nos géis, Tris-HCL (200 mM, pH 6,8), SDS 8 %, glicerol 40 %, azul de bromofenol 0,4%, DTT (400 mM). Os géis foram submetidos a voltagem inicial de 60 volts até sair dos géis de empacotamento e aumentada para 100 volts para os géis de resolução por aproximadamente 1 h e 30 min.

Após o tempo de corrida, os géis foram transferidos (cuba) para membranas de nitrocelulose por duas horas e meia no gelo, a 300 mA, após transcorrer o tempo foram coradas com uma solução de *Ponceau* a 3% (5% de ácido acético em solução aquosa) por 2 min, e lavadas com TBST até a remoção total do corante. Em seguida, foram bloqueados com uma solução de 5% de leite sem gordura em TBST por 1 h.

As membranas foram incubadas com as soluções de anticorpos monoclonais anti-HNE (10 µg/mL, Jaica) e anti-HHE (5 µg/mL, Jaica) contendo 0,5% de BSA, ambos na proporção de 1:500 *overnight* a 4°C, e 10 no dia seguinte as membranas foram lavadas três vezes com TBST por 15 min e adicionou-se o anticorpo secundário (Anti-mouse IgG, conjugado a peroxidase: HRP *horseradish peroxidase*: Sigma-Aldrich), 5000 vezes diluído em uma solução contendo 2 % de leite sem gordura em TBST por 1 h e em seguida, as membranas foram lavadas com TBST 3 vezes por 15 min. Após as lavagens foram adicionados em cada membrana, 500 µL do reagente quimioluminescente ECL (*Enhance Chemiluminescence Luminol*: GE) contendo luminol e peróxido de hidrogênio como substrato, a peroxidase oxida o luminol, que emite luz ao decair para o estado fundamental. As membranas foram reveladas através da digitalização das imagens

obtidas através do foto-documentador Alliance 4.7 (Uvitec). A análise densitométrica das bandas foi obtida pelo software *Image J* (Versão 1.44, NIH).

3.5 Ensaios proteômicos de córtex motor

3.5.1 Seleção dos grupos experimentais

Dos 40 animais selecionados (n=10) para os ensaios *in vivo*, foram selecionados 16 animais (n=4) (de acordo com a figura 7) utilizando critério de exclusão baseado na qualidade dos dados proteômicos, ou seja, na remoção de animais com intensa variabilidade biológica (considerando a distribuição normal dos dados de LFQ).

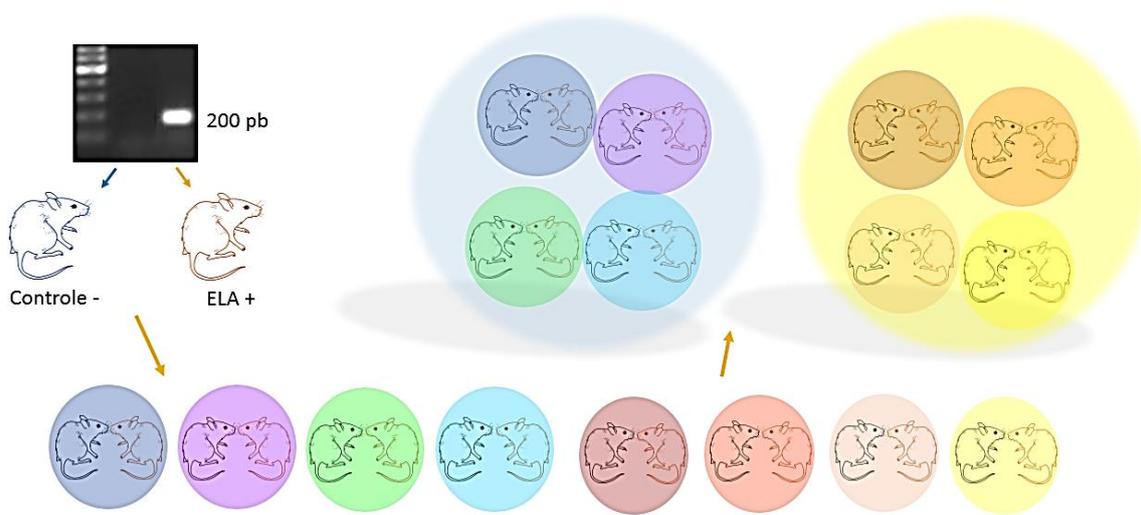


Figura 9 - Esquema ilustrativo da divisão dos dois grupos: 4 pares de irmãs pré-sintomáticas e sintomáticas (Controle - e ELA +). Os círculos representam as linhagens distintas entre os pares.

3.5.2 SDS-Page das proteínas obtidas do córtex motor do cérebro de ratos da linhagem Sprague Dawley SOD1^{G93A} para as análises proteômicas

As amostras foram preparadas conforme descrito no **Item 3.3.1** e separadas por SDS-PAGE, conforme descrito no **Item 3.3.2** porém, utilizando uma cuba de eletroforese

de tamanho médio (Ruby 600, GE) para limpar as amostras e melhorar a separação entre as bandas, foram aplicados 500 µg de proteínas de cada amostra nos géis de poliacrilamida (5% para os géis de empacotamento e 10% para os géis de resolução), que foram submetidas a corrida eletroforética por aproximadamente de 5-6 h para o gel de resolução a 150 V. Após a corrida, os géis foram corados com azul de Coomassie por 1 h, lavados em sequência 3-4 X com uma solução aquosa contendo 50% de acetonitrila e 5% de ácido acético (Merck), e em seguida, foram deixados *overnight* nessa solução, sob agitação a temperatura ambiente.

Os géis foram analisados (Image Scanner, GE) para determinar a concentração de proteínas (por densitometria) das bandas, conforme descrito no **item 3.3.2**, (aproximadamente 20 µg de proteínas por banda). As bandas foram cortadas dos géis, em fluxo-laminar, com bisturi estéril, picotadas e armazenadas em quatro tubos para uma mesma amostra, de acordo com o tamanho das proteínas, em comparação ao marcador de peso molecular (Kaleidoscope, Bio-Rad), os 4 tubos foram divididos em: um tubo contendo as bandas das proteínas maiores: de 202 à 110 Da; dois tubos distintos para as de tamanho médio em: de 77 à 50 Da, e 50 a 33 Da e por fim, um tubo para as proteínas menores de 10 a 6 Da. O que resultou em um conteúdo total de proteínas de aproximadamente de 100 µg/tubo.

A digestão em gel dessas proteínas (dos 4 tubos por amostra) foi realizada de acordo com o protocolo adaptado de digestão desenvolvido pelo laboratório: Max Feffer de Genética de Plantas Departamento de Genética Esalq/USP. Os géis foram descorados com uma solução de 50% de acetonitrila em 50% de água (solução de descoloração), *overnight*. No dia seguinte descartou-se essa solução, e foram

adicionados 500 μL de “ambic” (tampão bicarbonato a 50 mM), em cada tubo por 1 h, a 25°C, sob agitação, e em seguida, essa solução foi descartada, e foram adicionados 500 μL da solução de descoloração nas mesmas condições da etapa anterior, e esse processo foi repetido até remover ao máximo corante, e por fim, foram adicionados 500 μL de acetonitrila 100%, esse processo foi repetido até os géis ficaram brancos, a solução de acetonitrila foi descartada e o restante por evaporação no *speed vac*, por 5 min. As bandas foram reduzidas com a adição de 500 μL de uma solução a 20 mM de DTT, a 56 °C por 40 min, em seguida, as bandas foram lavadas com ambic (50 mM), para remover o excesso de DTT, e em seguida, alquiladas com adição de 500 μL de 50 mM de IAA por 30 min no escuro. Após transcorrer o tempo, foram adicionados 500 μL de uma solução de tripsina a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Promega), a uma proporção de 1,5 μg de enzima para 100 μg de proteína (volume final de 500 μL) as amostras foram incubadas a 37 °C por 18 h, a 350 rpm. Todas as soluções acima foram diluídas em ambic (sempre preparado na hora do uso)

No dia seguinte, a digestão tríptica foi interrompida adicionando 500 μL da solução bloqueadora contendo 5% ácido fórmico (96%, Sigma-Aldrich), em 50% de ACN, em seguida, o sobrenadante das amostras foi coletado e transferido para um novo tubo. Os peptídeos foram eluídos dos géis com a adição de 500 μL da solução de eluição I: contendo 1% ácido fórmico em 60% de metanol (Sigma-ALdrich), incubadas por 15 min, a 40 °C, esse processo foi realizado duas vezes, e os sobrenadantes resultantes foram coletados e armazenados nos mesmos tubos novos da etapa anterior (bloqueio). Em seguida foram adicionados 500 μL da solução de eluição II contendo 1% ácido fórmico em 50% ACN, 2 X seguindo os mesmos passos da etapa anterior (eluição I).

E por fim, adicionaram-se 500 µL de acetonitrila a 100%, até a desidratação dos géis (fragmentos de cor branca) por 2X, e os sobrenadantes dessas etapas foram recuperando e acumulados nos mesmos tubos contendo as frações obtidas no bloqueio e na eluição I, Os géis foram descartados. O volume final de todo o processo foi de 3 mL, que foram liofilizados a 4°C, *overnight*. E submetidos a dessalinização utilizando colunas Sepak, conforme a descrição no **ítem 3.3.4**, os 2 mL obtidos ao final da limpeza, foram secos no *speed vac, overnight*, e em seguida, os peptídeos foram resusensos em 100 µL de 0,1% de ácido fórmico em água, *overnight*, a 25 °C, sempre um dia antes das análises.

3.6 Análises das proteínas corticais por “Shotgun” dos ratos da linhagem Sprague Dawley SOD1^{G93A} método de obtenção dos MS/MS por NanoLC/ESI-Orbitrap

3.6.1 Método de obtenção dos MS/MS por NanoLC/ESI-Orbitrap

Os peptídeos foram submetidos separação através do sistema nano-LC (Easy-nLC-1200, Thermo-Fisher) acoplado um espectrômetro de massas tribrido, Orbitrap (Orbitrap Fusion Lumos Tribrid, Thermo-Fisher), que inclui, quadrupolo como filtro de massas, e analisadores do tipo *ion trap* e *orbitrap*, com fonte de ionização ESI. Utilizou-se uma coluna Acclaim™ PepMap™ (50 cm, 50 µm, Thermo-Fisher) para o sistema de nanoLC, durante 120 min em um nano fluxo de 100 nL/min, em um gradiente linear entre 5% a 95% de acetonitrila (B) e fase aquosa com 0.1% ácido fórmico (A). Em seguida, os peptídeos foram injetados no espectrômetro de massas, e ionizados no *eletrospray*, e em sequência, os íons precursores MS, foram direcionados e selecionados no quadrupolo, e em seguida, o pacote de íons foi enviado para o *ion trap* e fragmentados por HCD (*High Colision Dissociation*, e deste para o analisador *orbitrap*. Os *scans* de

MS/MS foram adquiridos por DDA (*Data Dependent Acquisition*) com uma janela de exclusão de tempo de 3 s, e a aquisição simultânea de ambos, precursores (MS) e íons fragmentos (MS/MS).

3.6.2 Processamento dos dados de MS/MS

Os arquivos brutos (*raw files*) gerados pelo *software* Xcalibur (Thermo Scientific) foram tratados pelo *software* Max Quant (Max Plank Institute), e para as análises estatísticas o *software* Perseus. Em duas abordagens independentes: 1) Análise do proteoma global (n=4) – Em termos de quantificações das intensidades através de LFQ (*label-free quantification*) essa busca visou gerar lista de proteínas diferencialmente expressas, após rigoroso tratamento estatístico (descrito mais adiante), e ainda, destacar dentro desse grupo de proteínas estatisticamente significantes com menores valores para o *p-value* (maior significância), proteínas exclusivas em cada um dos grupos (usando um filtro adicional de exclusão maior ou igual a 2 peptídeos únicos), e por fim, validar os dados de MS/MS relativos as proteínas identificadas como importantes no cenário de estresse redox da ELA, bem como quantificar nos dois grupos através das intensidades (medida independente e relativa a cada MS/MS individual a nível de peptídeo). Nas buscas no Max Quant, foram utilizados os seguintes parâmetros: modo de digestão específico para tripsina, número de perdas de clivagens da tripsina 2, como modificações variáveis: oxidação (M) e acetilação N-terminal, máximo número de modificações por peptídeos de 5, quantificação livre de marcação (LFQ), utilizando o *default* do programa e sem normalização (para evitar supressão do sinal de peptídeos em baixas concentrações, exceto pela normalização intrínseca do Max Quant descrita

mais adiante), e em identificações avançadas: *match between runs* (para quantificar em todos os *scans* o mesmo peptídeo), com janela de tempo de sobreposição de 0,7 min, e tempo de alinhamento de 20 min, e os dados foram confrontados com FASTA *file* do proteoma de rato, com adição da sequência da SOD1 humana (presente nos portadores da ELA).

2) Análise das PTMs (*Post-Translational Modification*) - busca para encontrar as proteínas modificadas estruturalmente pelos aldeídos (HNE e HHE), em cada um dos grupos (n=4) foram utilizados no Max Quant os mesmos parâmetros descritos anteriormente, entretanto, com a adição da massa dos aldeídos inseridas em modificações variáveis e quantificação de proteínas de acordo com as adições de massas resultantes das vias reacionais mais comuns tanto para o HNE quanto para o HHE: 1) Via de adição de Michael: perda neutra de 156,11 Da para o HNE e 114,06 Da para o HHE; 2) Adição via base de Schiff: perda neutra de 138,10 Da para o HNE, com saída de 18 Da de uma molécula de H₂O e para o HHE de 96,05 Da, menos 18 da H₂O (saída de água durante a reação, e não na fragmentação).

Para as análises do proteoma global, de LFQ os dados foram submetidos às análises estatísticas pelo Perseus, utilizando análise de dados paramétricos, filtrando os potenciais contaminantes e falsas identificações por sequências inversas, os valores foram submetidos a transformação logarítmica $\text{Log}(x)+2$ (para dados que não convergem em uma distribuição normal, em termos das intensidades de LFQ dentro de uma gaussiana). Para abordagem por LFQ durante as buscas, o Max Quant normaliza os dados (intrínseca e padrão do Max Quant) para remover as variações experimentais, por um fator de correção inicial, a primeira correção consiste da divisão obtida através do

somatório total das intensidades dos íons, e a segunda da divisão da intensidade total dos íons de cada amostra pela intensidade total dos íons de todas as amostras, e em seguida, cada valor de intensidades de todos os íons fragmentados de um mesmo peptídeo foi dividido pelo fator de correção obtido da primeira divisão. Como análise de variância utilizou-se para teste de amostras múltiplas ANOVA e teste *t*, para obter as proteína diferencialmente expressas, assumindo um erro de significância de 5% (FDR *Hochberg*>0,05) para o teste *t*, para evitar falsos positivos encontrados nos testes aplicados. Antes de aplicar o teste estatístico, os dados filtrados por critério de estringência para os valores válidos de 3 em pelo menos um dos grupos, e em seguida, essa matriz de dados foi submetida a imputação de valores perdidos (otimização dos dados com distribuição normal).

Para a construção do *heatmap* (*Hierarchical clustering*), utilizou a distância euclidiana utilizando os dados obtidos do teste Z-score (utilizando as medianas dos LFQ para normalizar os dados) das intensidades de LFQ das proteínas diferencialmente expressas.

Para as análises de PTMs confirmação manual dos peptídeos modificados foram utilizadas as medidas de intensidade (não o LFQ) de cada peptídeo supostamente modificado, os dados foram tratados utilizando o Perseus e o Max Quant, no Perseus, utilizou-se um filtro de exclusão maior ou igual a 0,8 para os valores de *score* da probabilidade de sítios modificados (quanto mais próximo de 1, maior a chance de possuir a modificação), em seguida os dados foram transformados para $\text{Log}(x)+2$, e filtrados novamente para valores válidos de no mínimo 3 em todos os grupos, em seguida, os peptídeos resultantes foram procurados utilizando a ferramenta “*view*” no

Max Quant para visualizar através do número do MS/MS do peptídeo modificado e comparando com a digestão teórica através do Protein Prospect (*Ms product*) confirmando ou não a existência das adições de massas dos aldeídos. Para as quantificações e espectros de validação foram considerados os peptídeos de maiores valores de LFQ em metade dos grupos.

E por fim, as listas de proteínas modificadas foram confrontadas com as listas de diferencialmente expressas e exclusivas obtidas das análises do proteoma global sem as modificações, para verificar a influência da idade versus a progressão intrínseca da doença. Os grupos de proteínas proveniente dessas listas foram submetidos a análise de GO (*Gene Ontology*) através do *software* Cytoscape (versão 3.5.1) através do *pluggin* ClueGO (versão 2.3.3) usando um *p-value* de 5% e um banco de anotação de GO do Uniprot.

4. Resultados

4.1 Modificações de citocromo c por HNE e HHE

Para verificar a reatividade dos aldeídos estudados frente aos resíduos nucleofílicos (como por exemplo, histidina, lisina), que são excelentes alvos dos aldeídos eletrofílicos, utilizou-se o modelo de citocromo c, que possui 104 aminoácidos e uma elevada quantidade desses resíduos: 19 lisinas (K), 3 histidinas (H) e 2 argininas (R), contidos em um total de 104 resíduos, e com ponto isoelétrico de 9,6, além de ser uma proteína pequena (12 kDa) e muito bem estudada, de fácil disponibilidade comercial. Além de apresentar um grande número de aminoácidos básicos, é um modelo interessante, por suas funções na cadeia de transporte de elétrons e nas vias de sinalização da apoptose (Jacobs & Marnett, 2010; Uchida, 2003; Wakita *et al*, 2011). Foi descrito pela primeira vez por Nakashima *et al*, em 1966, e fica ancorado a membrana interna da mitocôndria. A reação de aldeídos reativos com citocromo c foi monitorada por técnicas de espectrometria de massas através da adição de 156 e 114 unidades de massas, para a reação com HNE e HHE, respectivamente (Uchida, 2003; Isom *et al*, 2004; Yamanda, 2004).

Como mostrado na Figura 8 e 9 é possível observar as modificações ao longo de diferentes tempos de incubação nos espectros de citocromo c tratado com HHE (A) e HNE (B) com relação ao citocromo c não modificado (controle). De acordo com os dados obtidos, a adição de massa (via adição de Michael) foi de 114 unidades de massa para o HHE e de 156 na reação com HNE. Tanto a adição por HHE, quanto por HNE ocorre por adição de Michael (tabela 1). Portanto, os dados obtidos nesse trabalho estão de acordo com dados anteriores da literatura (Uchida, 2003; Isom *et al*, 2004; Yamanda, 2003).

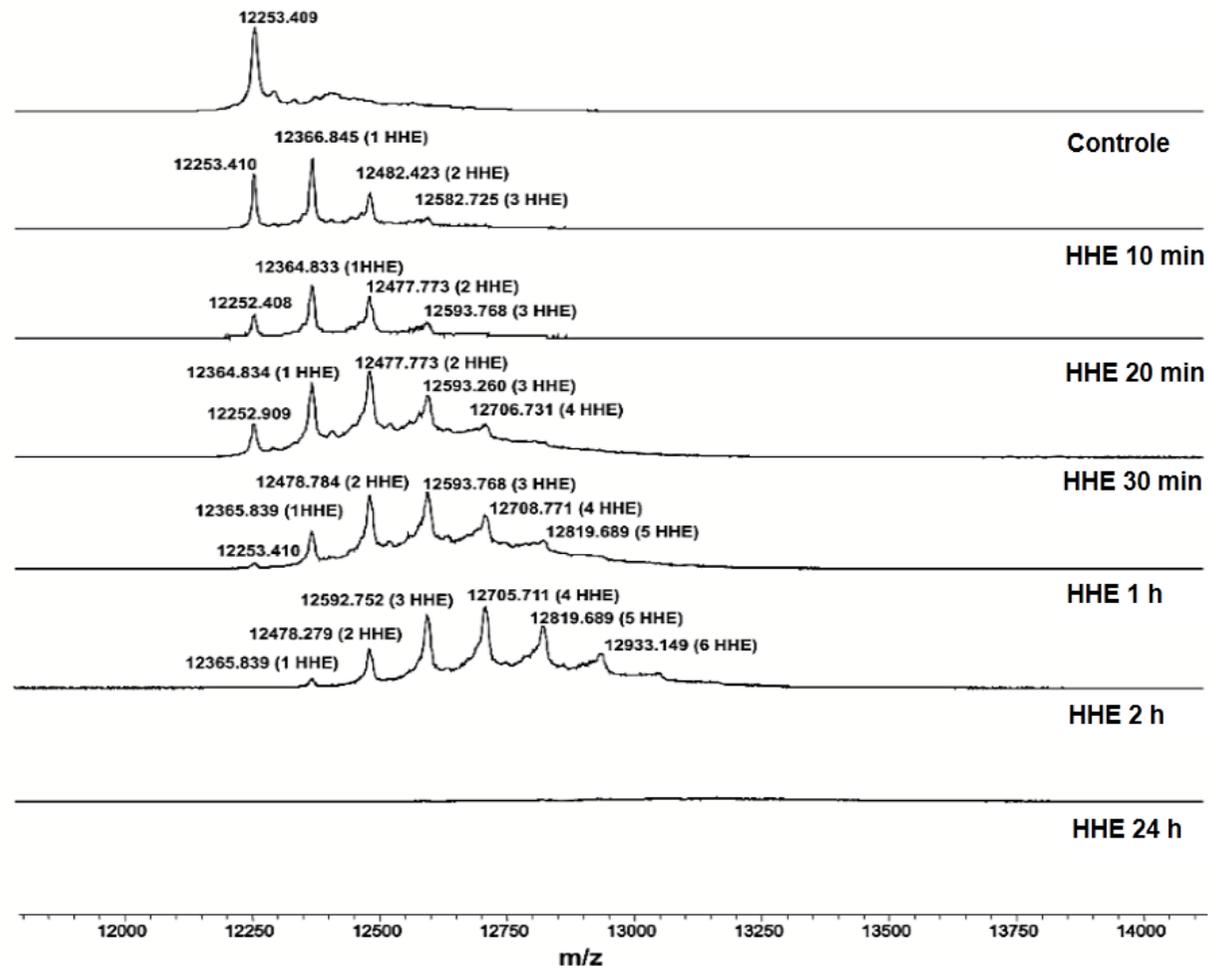


Figura 10 - Espectros obtidos por MALDI–ToF do ensaio cinético entre citocromo c e aldeídos. 2,5 mM de citocromo c foram incubados com 2 mM de HHE em PBS (25 mM), pH 7,4 a 37°C. De cima para baixo: Controle, 10 min, 20 min, 30 min, 1 h, 2 h e 24 h.

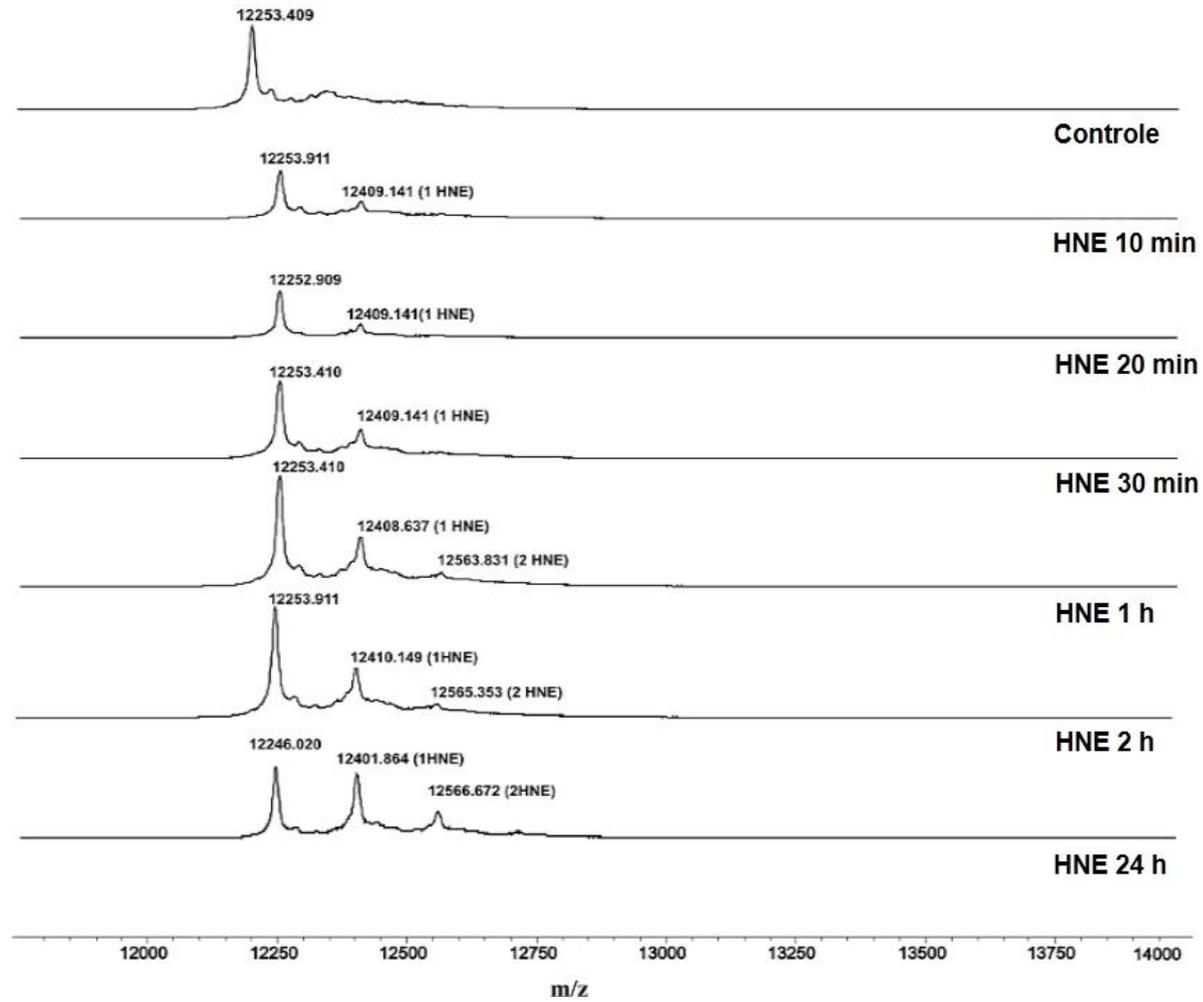


Figura 11 - Espectros obtidos por MALDI –ToF do ensaio cinético entre citocromo c e aldeídos. 2,5 mM de citocromo c foram incubados com 2 mM de HNE em PBS (25 mM), pH 7,4 a 37°C. De cima para baixo: Controle, 10 min, 20 min, 30 min, 1 h, 2 h e 24 h.

Uma vez que adição de massa de HNE ao citocromo c é de 156 a reação está ocorrendo por adição de Michael, se a adição fosse por base de Schiff seria encontrado uma adição de massa de 138, já que ocorre desidratação com saída de uma molécula de água ($156 - 18 = 138$) (Isom, *et al*, 2004). A tabela abaixo resume as adições dos aldeídos observadas nas reações com o citocromo c.

Tabela 2– Valores experimentais de m/z obtidos por MALDI – ToF dos adutos de citocromo c com aldeídos. Todas as reações abaixo ocorreram via adição de Michael e foram obtidas através da soma das massas de 114 e 156 Da para o HHE e a HNE (perda neutra), respectivamente, por cada molécula de citocromo c, proveniente de 2h de incubação a 37°C, à 350 rpm.

m/z aduto HHE	Nº modificação – HHE	m/z aduto HNE	Nº modificação – HNE
12365.839	1	12410.149	1
12478.279	2	12565.353	2
12592.752	3	-	-
12705.711	4	-	-
12819.689	5	-	-
12933.149	6	-	-

Aldini *et al*, 2002 investigaram o mecanismo de reação do HNE por RMN em água deuterada, e concluíram que a reação inicia-se com a proteína sofrendo o ataque eletrofílico começando com a formação de uma base de Schiff, o que aproxima os sítios dos aminoácidos e conseqüentemente, favorece bastante a adição de Michael, formando um produto estável.

É interessante observar na Figura 8 que em 24 h de incubação com HNE, há um aumento na formação dos adutos de 1 e 2 adições ao citocromo c, comparado ao

controle, já na incubação de 24 h com HHE não foi possível observar modificações. Zhu *et al*, 2010 ao utilizar 2(E), 4(E)-Decadienal (DDE) incubado com β -Lactoglobulina (β -LG) também encontraram adições estáveis por longos tempos de incubação (24 h), talvez a cadeia hidrofóbica maior do HNE exerça alguma vantagem na estabilização química desse aduto em particular.

4.1.2 Identificação dos aminoácidos modificados

Para identificar os resíduos de aminoácidos alvos dos aldeídos, as proteínas intactas (incubação de 2 h) foram submetidas à digestão com tripsina. Os dados obtidos por espectrometria de massas dos produtos de digestão foram tratados usando *softwares* apropriados *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF) através do *Mascot* (Matrix Science). Esta ferramenta encontrou uma cobertura do citocromo c (tréplicas) de 75-80%, com um hit de 3 (*score* 432- 639) para o citocromo c de coração bovino, para o controle e uma cobertura de 60% para as amostras tratadas com os aldeídos (*score* 270-425). A sobreposição dos fragmentos peptídicos encontrados com os fragmentos teóricos gerados pelo *software* Sequence Editor (Bruker Daltonics) permitiu observar a presença de modificações. Utilizou-se como referência a sequência 2B4Z (*fasta file*). A figura 10 mostra uma ilustração esquemática da sequência primária do citocromo c, uma amostra representativa para cada condição (citocromo c, citocromo c +HHE e citocromo c+ HNE).

CITOCROMO C

Digestão: Score : 639 > 37 cobertura de 75-80%

MGDVEKGKKI	FVQKCAQCHT	VEKGGKHKTG
PNLHGLFGRK	TGQAPGFSYT	DANKNKGITW
GEETLMEYLE	NPKKYIPGTK	MIFAGIKKKG
EREDLIAYLK	KATNE	

CITOCROMO C + HHE

Digestão: Score : 270 > 23 cobertura de 75-80%

MGDVEKGKKI	FVQK*CAQCHT	VEK*GGKHKTG
PNLH*GLFGRK*	TGQAPGFSYT	DANKNKGITW
GEETLMEYLE	NPKK*YIPGTK	MIFAGIK*KKG
EREDLIAYLK	KATNE	

CITOCROMO C + HNE

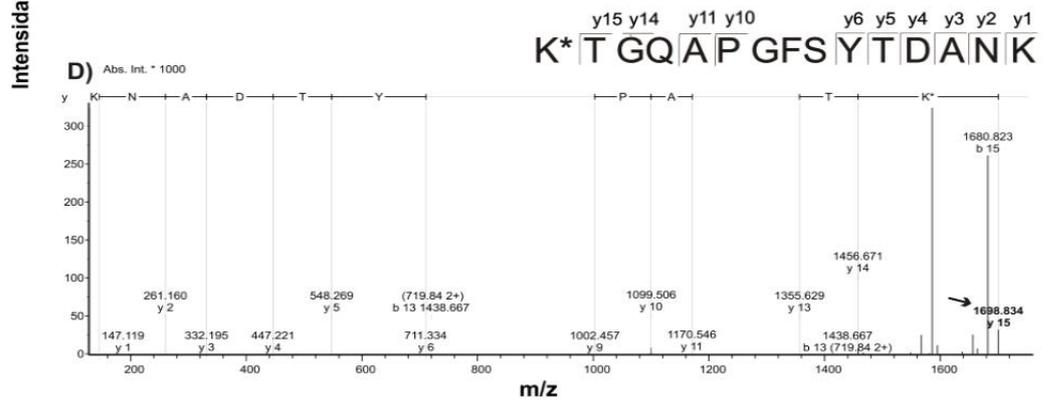
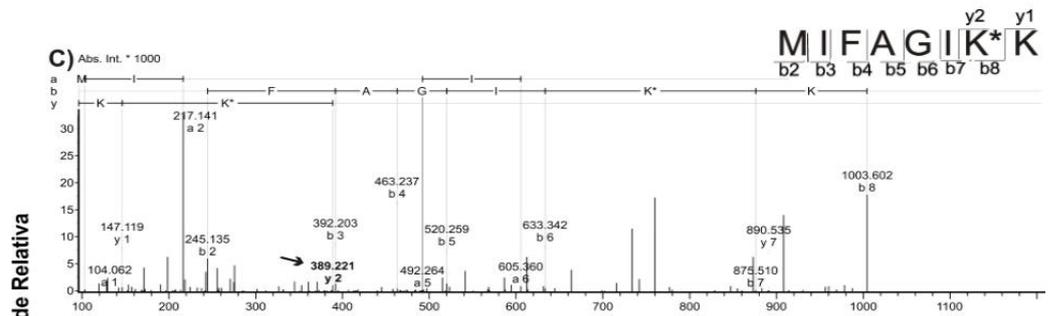
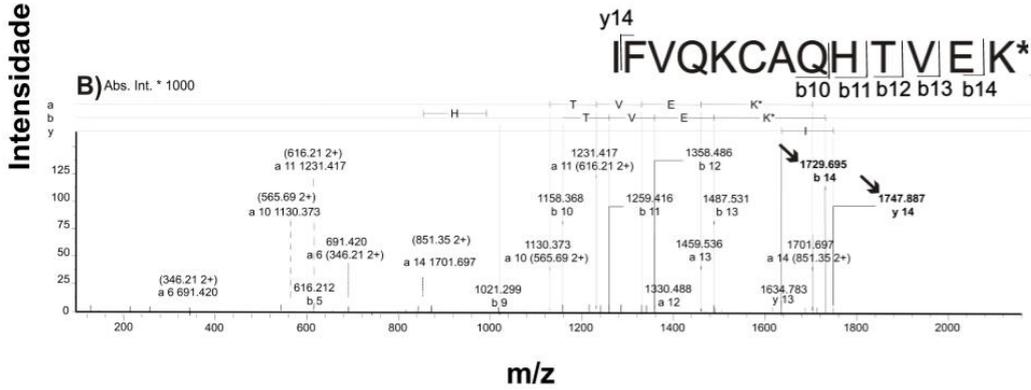
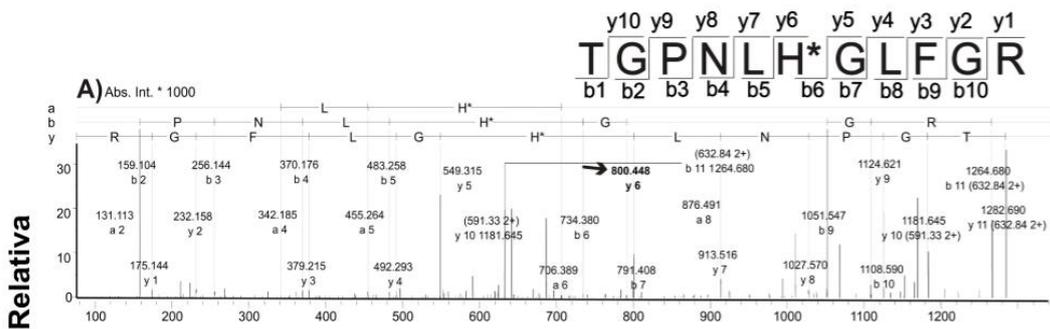
Digestão: Score : 203 > 18 cobertura de 66%

MGDVEKGKKI	FVQKCAQCHT	VEKGGKHKTG
PNLH*GLFGRK	TGQAPGFSYT	DANKNKGITW
GEETLMEYLE	NPKKYIPGTK	MIFAGIKKKG
EREDLIAYLK	KATNE	

* Aminoácidos modificados

Figura 12 - Visualização das modificações nos aminoácidos na sequência primária do citocromo c mediada pelos aldeídos. Em vermelho está a sequência obtida experimentalmente e em azul os peptídeos com seus respectivos aminoácidos modificados (*)

As figuras 11 e 12 mostram os PFFs (*Peptide Fragment Fingerprinting*) obtidos dos peptídeos modificados pelos aldeídos. Para tentar confirmar a existência da modificação sugerida pelo MS do mesmo (íon precursor selecionado para ser fragmentado), os íons fragmentos dos peptídeos modificados foram sequenciados manualmente no *Data Analysis*. Para validar a modificação dos aminoácidos dos peptídeos, verificou-se a presença do íon imônio ou outros íons, nos MS/MS obtidos



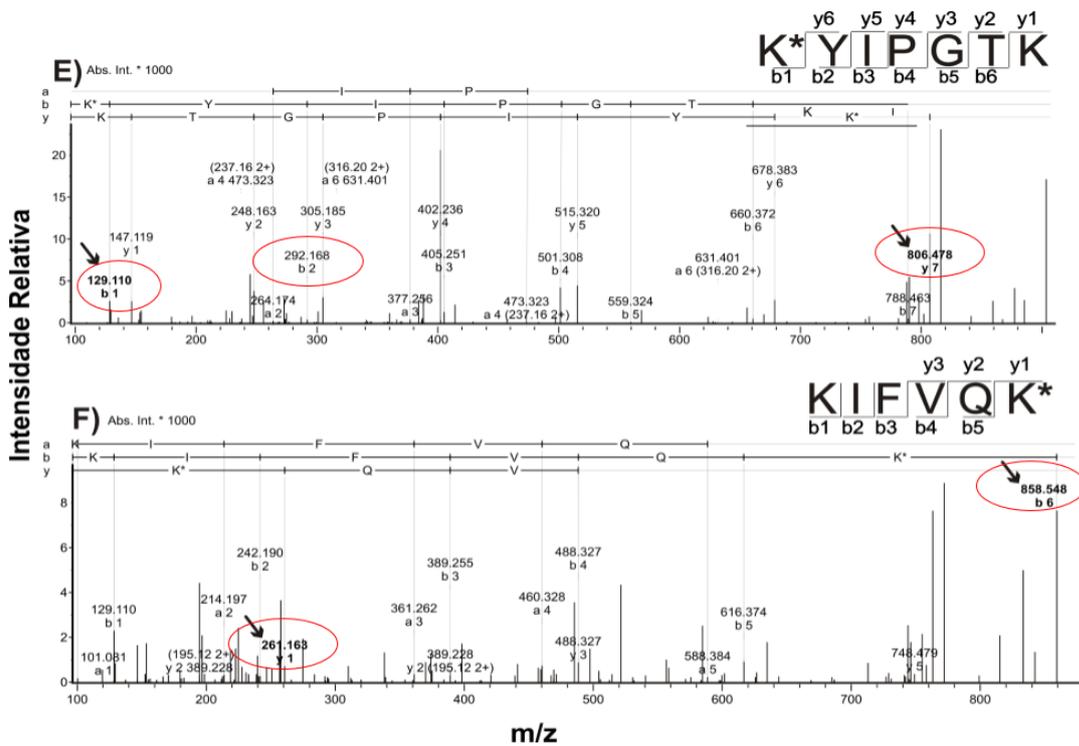


Figura 13 - Peptide Fragment Fingerprinting da digestão citocromo c + HHE. A) Peptídeos de massas na sequencia de cima para baixo: A) 1283.6988 Da, B) 1747.8874 Da, C) 1021.6114 Da. D) 1697.828 Da, E) 920.545 Da, F) 763.5632 Da. As setas e círculos vermelho, indicam os íons modificados por HHE.

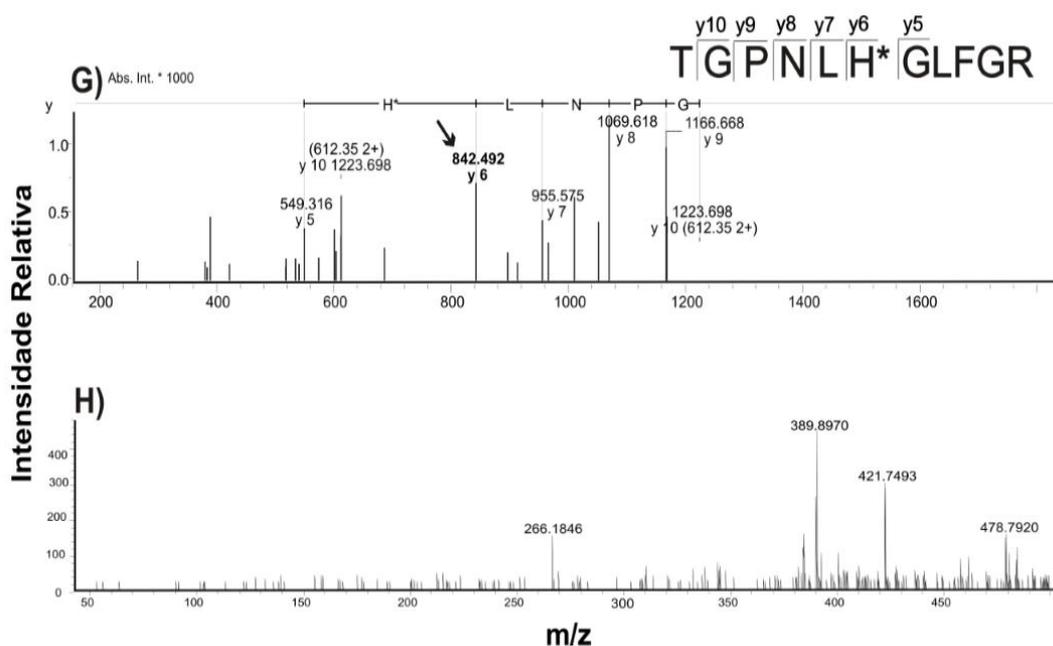


Figura 14 - Peptide Fragment Fingerprinting da digestão citocromo c + HNE. G) Peptídeo de massa 1324.737 H) Iôn imônio da histidina 33 do citocromo c $[H+156]^+ = 266$. As setas indicam os íons modificados por HNE.

O peptídeo modificado nas amostras incubadas com HNE foi o TGPNLH*GLFGR (Figura 12) que apresentou a adição de 156 m/z de HNE (adição de Michael) no resíduo de histidina 33. O íon imônio da histidina 33 (figura 12) apresentou massa de 266, que é o valor do íon : 110 + 156 do HNE.

A tabela 2 resume os peptídeos encontrados nas amostras de citocromo c incubadas com os aldeídos. Nas amostras incubadas com HNE houve um aumento significativo dos peptídeos modificados utilizando o método de inclusão e exclusão de massas dos íons precursores.

Tabela 3– Peptídeos do citocromo c modificados(*) por HHE e HNE, provenientes da digestão com tripsina e detectados por NanoLC – ESI – MS/MS.

Seqüência	Posição	Massa	Mono	Teórica s/add	Resíduo modificado	aldeído
KTGQAPGFSYTDANK*	40-54	566.0599(+3)	1698.1797	1584.7653	K53	HHE
IFVQKCAQCHTVEK*	10-23	874.3585(+2)	1747.8874	1633.8186	K22	HHE
TGPNLH*GLFGR	29-39	641.8494(+2)	1283.6988	1168.6222	H33	HHE
KIFVQK*	8-13	438.783(+2)	877.5666	763.5632	K13	HHE
K*YIPGTK	78-84	460.777 (+2)	920.545	806.4777	K79	HHE
MIFAGIK*K	80-88	511.310(+2)	1021.6114	907.5431	K87	HHE
TGPNLH*GLFGR	29-39	442.2516(+3)	1323.7309	1168.6226	H33	HNE

4.2 Estudos in vivo

4.2.1 Genotipagem

Como os ratos transgênicos portadores da SOD1 humana (SOD1^{G93A}) são hemizigotos (portador de apenas um alelo para o gene), portanto, espera-se encontrar metade dos descendentes afetados pela condição, e a cada nova ninhada se faz necessário realizar a genotipagem não apenas para definir os grupos de portadores do gene mutado da SOD1 e de controles (irmãos que não possuem o gene mutado da SOD1 humano), mas também para selecionar 10 animais portadores como reprodutores para a manutenção de futuras colônias.

A ninhada de fêmeas (abril-julho de 2015) foi obtida com o intuito de obter um número suficiente de animais de linhagens diferentes, para ter uma triplicata biológica.

Foram selecionadas 40 fêmeas de 56 animais onde 28 eram portadoras do gene, e 28 não possuem o gene da SOD1 (figura 13).

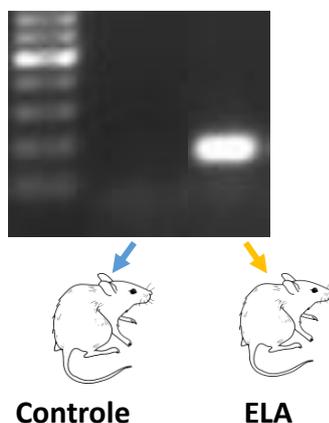


Figura 15 - Gel de agarose representativo dos produtos (200 pb) de PCR obtido a partir das orelhas dos filhotes, a banda clara (canto direito inferior) presente apenas no portador da ELA é resultante da amplificação do gene mutante da SOD1^{G93A} humana, a esquerda representa o animal controle ausente para este gene.

4.2.2 Avaliação dos ratos e acompanhamento dos sintomas

A figura 14 mostra o acompanhamento do peso durante as avaliações dos animais pertencentes ao grupo dos sintomáticos (n=4). Os animais ELA apresentaram um padrão similar de perda de peso comparados aos animais controles de mesma idade. O animal controle selecionado para cada ELA a ser submetido à eutanásia, foi escolhido por ter a mesma idade ou ser irmão do animal portador e faixa de peso inicial semelhante, todas as combinações foram entre irmãos. Os pares de animais ELA vs controle foram selecionados desde o início da avaliação, entretanto, as informações sobre portadores e seus controles, foram omitidas (duplos cegos) durante o processo de avaliação dos sintomas.

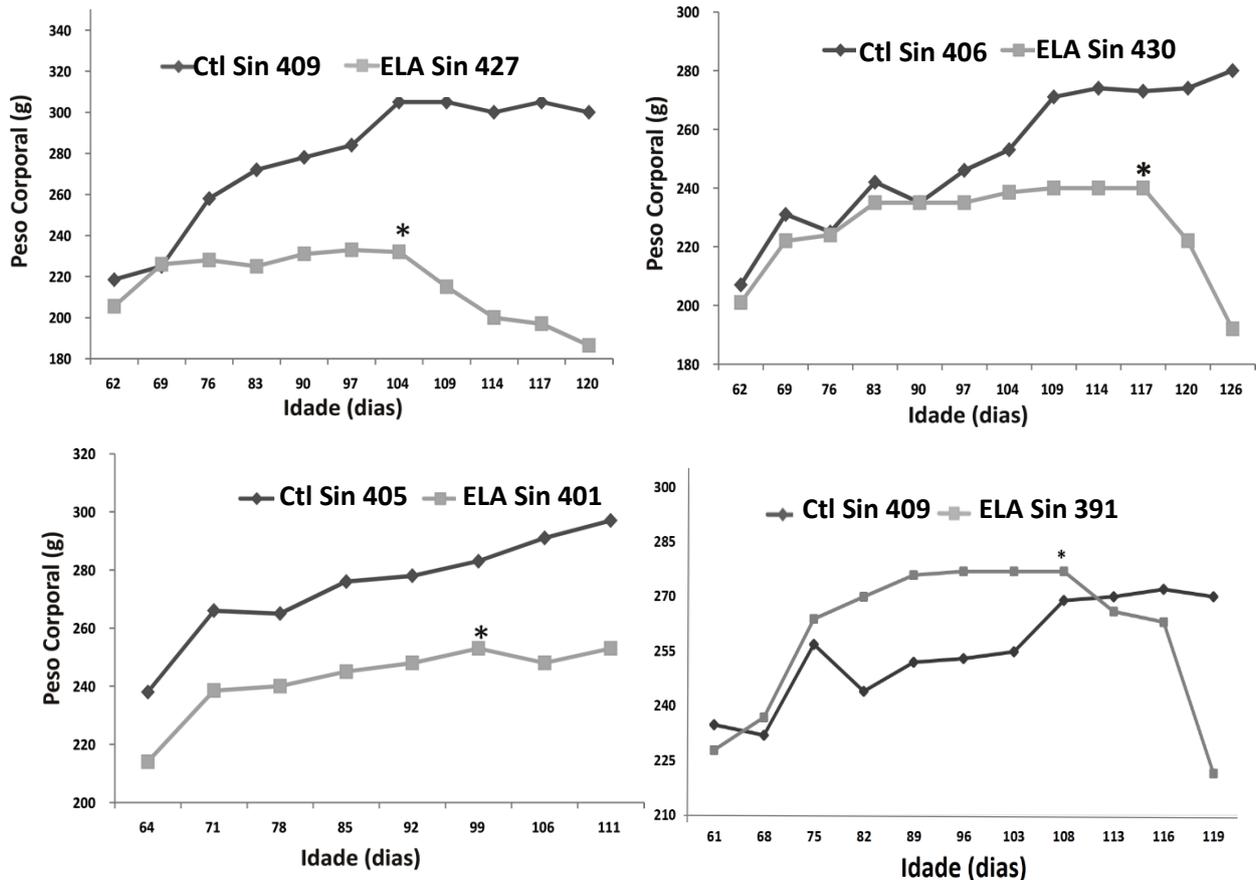


Figura 16 - Análise do peso corporal dos animais ELA sintomáticos e respectivos controles. * idade em que os sintomáticos apresentaram o peso máximo.

Pouco antes de 120 dias os animais afetados apresentavam os sintomas característicos doença, como por exemplo, a paralisia gradual dos membros mais severa e pronunciada. A piora dos sintomas, em geral, ocorria logo após terem atingido o pico máximo do peso.

Com relação à perda de movimento nos estágios iniciais dos sintomas, na maioria, foi observada uma diminuição sutil da força em todos os animais ELA, bem como, uma significativa redução do comportamento exploratório, ao tirá-los da caixa. A tabela 3 sumariza as condições clínicas observada em função do peso e do fenótipo clínico da doença, tipo de paralisia, idade dos animais portadores dos sintomas.

Tabela 4– Aspectos clínicos dos sintomas, peso e idade dos portadores (n=4) da ELA observados.
*o peso final se refere ao peso de cada indivíduo ao atingir 20% de perda de peso com relação ao seu peso máximo.

Numero do animal	Fenótipo clinico	Peso máximo (g)	Peso final (g)*	Idade (dias)
401	Paralisia membros anteriores	253	202,4	116
430	Paralisia membros posteriores	240	192	126
427	Paralisia membros posteriores	233	186,4	120
391	Paralisia membros anteriores	277	221,6	119

Como a ELA é uma condição clínica multifatorial (tanto a esporádica quanto a familiar), do ponto de vista fisiopatológico e molecular, é esperado que os ratos *Sprague Dawley* desse modelo transgênico da SOD1^{G93A}, apresente fenótipos clínicos variados, como, paralisias exclusivas (exclusivas por região anterior ou posterior dos membros), ou paralisia simultânea de membros anteriores e posteriores, e por fim, um tipo menos comum animais com sintomas brandos, e os animais com paralisia nos membros anteriores são mais afetados e vivem menos. De acordo com a literatura, a maior agressividade desse tipo não está diretamente ligada a limitação física do portador ao tentar se alimentar utilizando esses membros, e sim uma agressividade *per si*, intrínseca a ELA (Matsumoto, *et al*, 2006), de fato essa condição (viver menos) foi observada nos animais desse estudo com esse tipo de lesão em membros anteriores.

É importante destacar que realmente o peso é um bom parâmetro como guia para o início da fase mais agressiva dessa neurodegeneração, a perda de peso durante esse estágio, foi em torno de 5-10% por dia de massa corpórea, antes de chegar a 20%.

Os sintomas da ELA emergem quando surgem falhas nas conexões axonais, ou seja, o axônio se retrai acompanhado da degeneração da inervação dos neurônios motores inferiores ou dos músculos, apesar de não se saber ao certo a sequência de eventos deletérios durante a progressão da doença, acredita-se que o estágio inicial seja a retração dos axônios que é compensada por brotamentos e re-ineruações colaterais que parecem ser mais resistentes ao processo degenerativo. Porém essa compensação não consegue impedir os danos subseqüentes. Após a retração e disfunção dos axônios, os neurônios motores se tornam visivelmente anormais e morrem, o *timing* exato desses eventos em humanos ainda é incerto, entretanto estudos realizados com pacientes que morreram prematuramente confirmam essa sequência (Saxena & Caroni, 2011; Fischer, *et al*, 2004).

É importante entender a influência desses eventos lesivos por que, conforme mencionado na introdução (**item 1.3.1**), as lesões exclusivamente em neurônios motores superiores e inferiores surgem de maneira independente e possuem origens moleculares deletérias distintas, essas observações são relevantes já que a agregação de proteínas (além da SOD1) está envolvida em ambos os eventos.

4.3 Ensaio de imunoafinidade

4.3.1 Detecção de proteínas ligadas ao HNE e HHE

As figuras abaixo mostram a detecção de proteínas ligadas ao HNE e HHE, em amostras testes. Experimentos de *western blot* (Figuras 16 e 17) foram realizados para

verificar a ligação de HNE e HHE em proteínas de córtex cerebral dos animais controles e ELA.

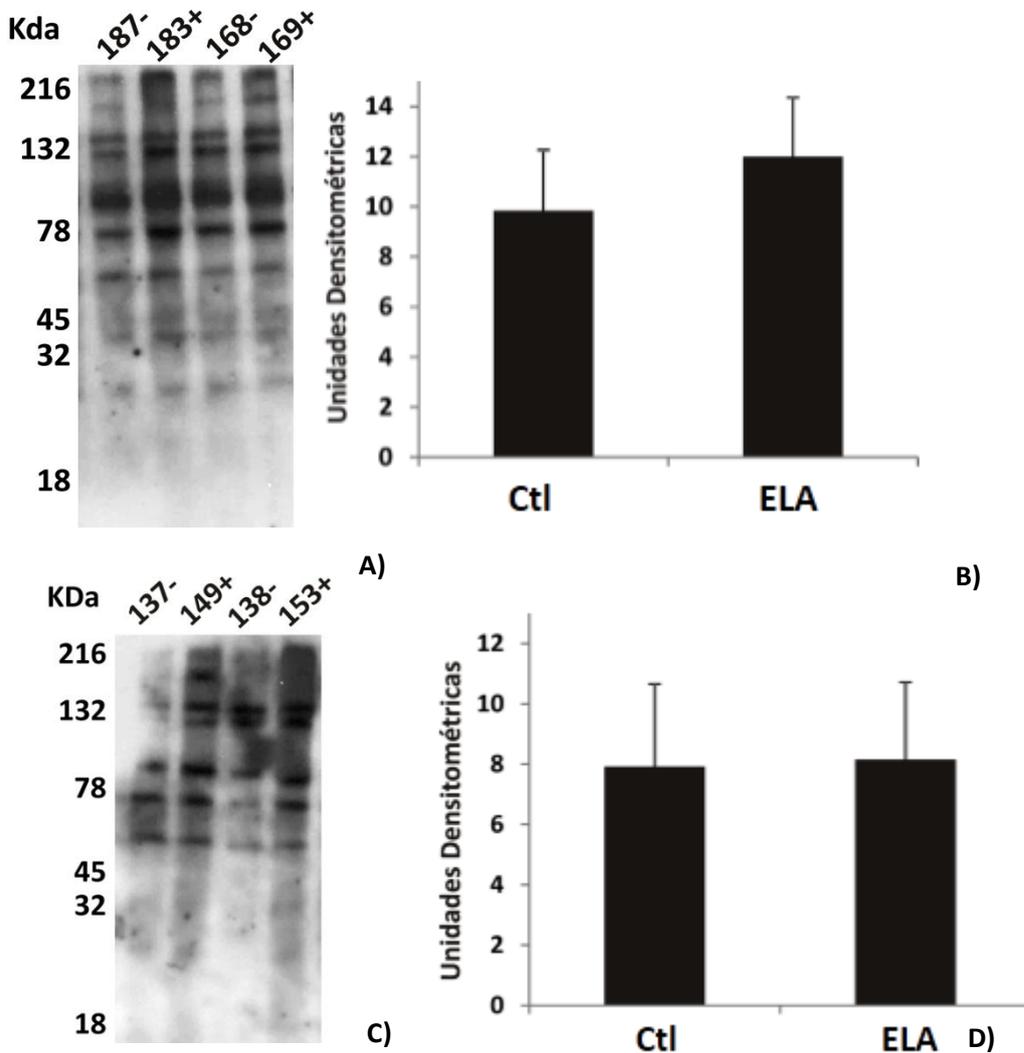


Figura 17 - Detecção de proteínas ligadas ao HNE por Western blot das proteínas obtidas do córtex cerebral de animais controles e ELA, em **A)** e **B)** Imunoblot representativo de alguns animais controles e ELA pré-sintomáticos (n=6) e **C)** e **D)** animais controle e ELA pré-sintomáticos (n=6) anti-HHE.

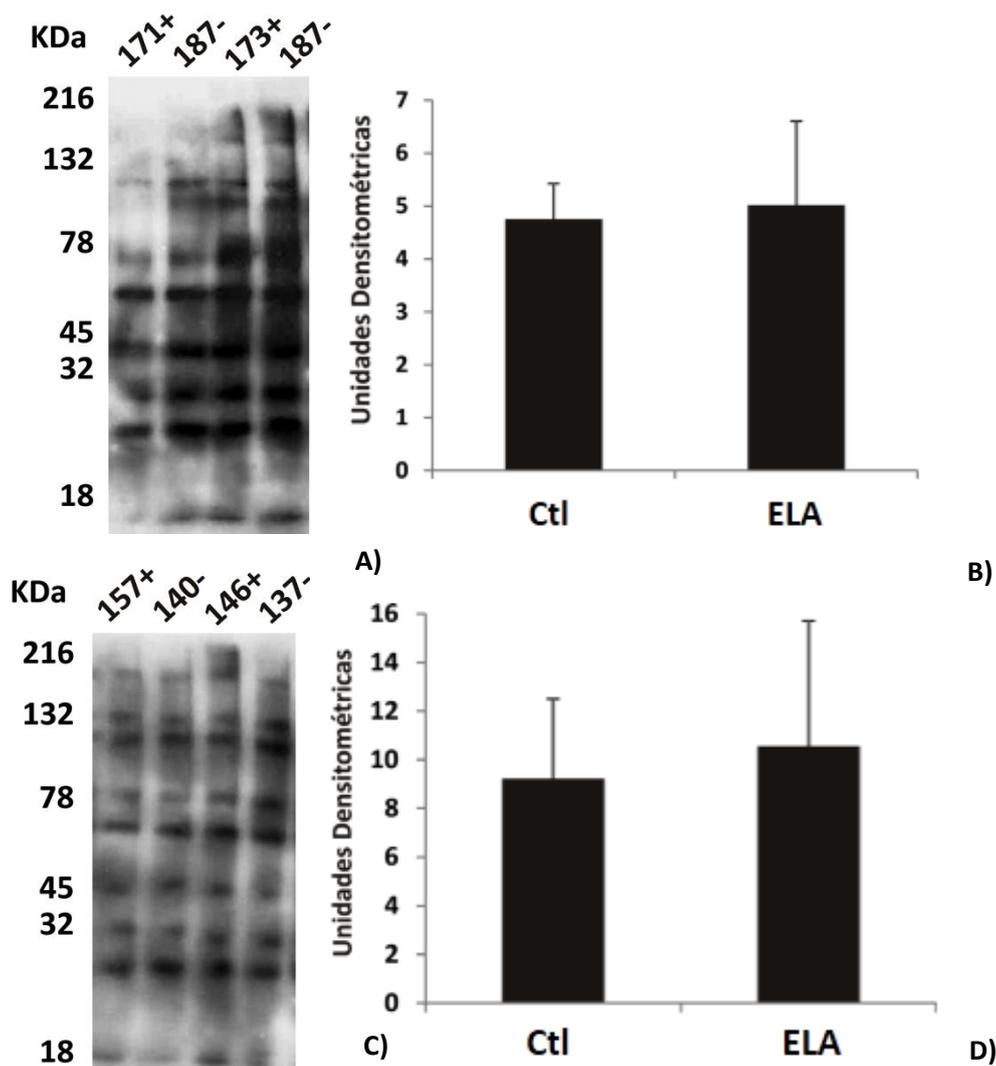


Figura 18 - Detecção de proteínas ligadas ao HNE por Western blot das proteínas obtidas do córtex cerebral de animais controles e ELA, em **A)** e **B)** Imunoblot representativo de alguns animais controles e ELA sintomático (n=6) e **C)** e **D)** animais controle e ELA sintomáticos (n=7) anti-HHE.

Nas figuras 16 e 17 e possível observar, uma tendência de aumento na concentração de proteínas ligadas ao HNE nos animais ELA mais acentuada nas amostras de 70 dias, comparadas ao controle. Nas amostras dos animais sintomáticos não detectamos diferença na concentração de aldeído-proteína entre os grupos, mas como os experimentos indicaram uma tendência de aumento. Com relação aos resultados

obtidos com HHE tanto os animais pré-sintomáticos quanto os sintomáticos não apresentaram diferenças de HHE-proteína, tanto nos controles quanto nos animais ELA.

Não houve diferença estatística significativa entre os grupos para os dois aldeídos.

4.4 Proteômica de córtex motor

4.4.1 Análise proteômicas integrativa global

Em todos os grupos, no total, foram encontradas 3,591 proteínas e após filtrar por contaminantes, peptídeos únicos maior ou igual a 2, o número caiu para 1,965. Para verificar o tipo de distribuição estatística dos dados, e correlação entre as amostras (de cada indivíduo por grupo), as intensidades de LFQ foram plotadas em gráficos do tipo *multiscatter plot* de correlação entre réplicas biológicas, de acordo com a figura abaixo, no canto esquerdo superior de cada correlação está o R quadrado, as amostras estão bem correlacionadas e com uma distribuição normal semelhante.

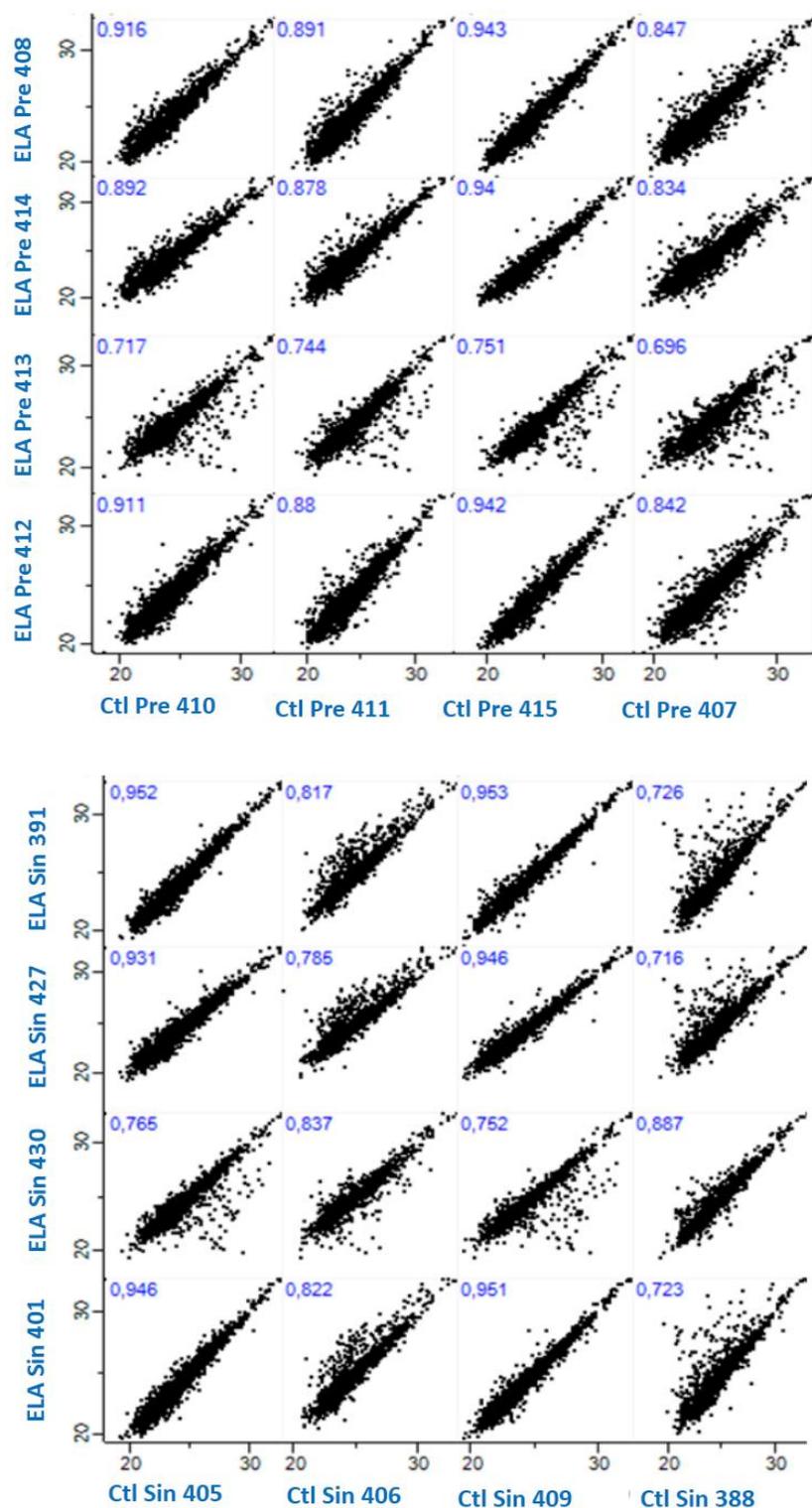


Figura 19 - Label Free Quantification (LFQ) dos ratos transgênicos SOD^{G93A} (obtidos através do Perseus) resultante das 1,965 proteínas encontradas em cada amostra, mostrando uma boa correlação entre as amostras (através do R quadrado satisfatório, número azul no canto esquerdo de cada gráfico).

A análise do componente principal (PCA – *principal component analysis*) é interessante para dados com mais de uma variável, e os componentes principais conseguem mostrar em uma única figura uma compreensão mais simplificada de uma grande quantidade de dados (as variáveis são reduzidas para um número menor: os componentes principais). Sendo assim, é possível visualizar nesse novo plano (resumo de dois componentes principais, duas dimensões) onde os dados variam. A figura 19 mostra a correlação entre os animais dos grupos. É possível ver que o grupo de animais pré-sintomáticos está mais afastado dos animais sintomáticos (apesar de alguns ficarem próximos dos pré-sintomáticos) formando agrupamentos por similaridades, baseado nas distribuições de LFQ das amostras, juntos os dois componentes explicam 58,8% da variância dos dados, mostrando a boa correlação entre os grupos.

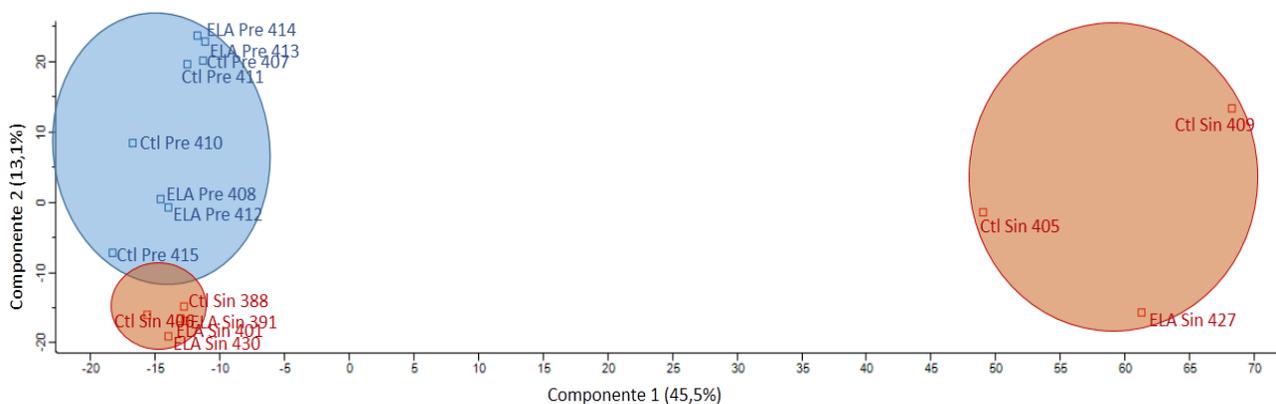


Figura 20 - Análise dos componentes principais (duas dimensões) entre os indivíduos com relação ao perfil de distribuição das proteínas por LFQ nos grupos (n=4). Em azul estão os animais do grupo pré-sintomático e em vermelho estão representados os animais do grupo sintomático.

Portanto, tanto os gráficos de correlação entre cada amostra (*multiscatter plot*) e a análise dos componentes principais, mostram que os grupos possuem uma boa

correlação para serem estudados, esses recursos permitem visualizar a qualidade dos dados entre as réplicas biológicas. Sendo assim, foi possível conduzir as análises graças a qualidade dos dados demonstradas nessas figuras.

Com relação às proteínas significantes (tabela 4) foram obtidas através das análises de variância (ANOVA, FDR 5%) para múltiplas hipóteses (mais de uma variável para o mesmo ensaio: idade e doença) foram identificadas 24 proteínas.

Tabela 5 - proteínas diferencialmente expressas de todos os grupos, encontradas na análise global do proteoma (FDR 0,05).

Nome da proteína	Nome do gene	Peso molecular (kDa)	Score	Peptídeos únicos	Cobertura de sequência [%]
Proteína 40S ribossomal S26	LOC100361854	13,006	3,8196	2	20,9
Alfa internexina	Ina	25,527	14,044	2	8,7
Aminopectidase B	Rnpep	57,078	118,4	24	45,5
Proteína C reativa	crp;Crp	23,546	5,9086	2	19,7
Creatina quinase tipo M	Ckm	18,721	79,196	4	43,1
Proteína like 1 associada ao microtúbulo equinodérmico	Eml1	110,81	33,916	7	15,7
Glicerol-3-fosfato desidrogenase [NAD(+)]	Gpd1l	32,129	12,805	5	22,4
Glicina-tRNA ligase	Gars	31,111	23,064	3	18,9
Heat shock protein 75 kDa, mitocondrial	Trap1	81,792	85,81	22	35,9
Ribonucleoproteína nuclear heterogênea H	Hnrnp1	38,018	26,84	9	26,1
Proteína de ligação a hialurônico e proteoglicano	Hapln2	36,483	323,31	20	62,6
Malato desidrogenase citoplasmática	Mdh1	61,335	85,738	21	41
Proteína quinase 1 ativada por mitógeno	Mapk1	56,115	233,9	3	59
Marcador de diferenciação mielóide associado	Myadm	35,575	323,31	2	59,2
Neurofilamento polipeptídico leve	Nefl	41,275	323,31	19	76,5
Neurogranina – NEUG (55-78)	Nrgn	7,4963	11,398	2	19,2
Peroxiredoxina 4	Prdx4	35,118	57,242	2	9,4
Proteína like de interação com hidrolase fitanoil-CoA	Phyhlpl	89,801	18,832	8	14,3
Prostaglandina E sintase 3	Ptges3	23,945	17,519	3	19,7
Proteína disulfeto-isomerase A3	Pdia3	80,46	94,547	12	21,8
Proteína serina/treonina fosfatase 2ª subunidade catalítica	Ppp2cb	33,865	12,422	3	21,7
Proteína 2 transmembrana relacionada a tioredoxina	Tmx2	22,399	115,32	6	47,5
Ubiquitina de modificação de conformação conjugada a enzima 1	Ufc1	42,412	119,99	16	51,2
3-Oxoacil-CoA redutase de cadeia muito longa	Hsd17b12	72,603	176,95	21	48,8
		31,007	34,961	4	29,7

A análise da expressão dessas proteínas nas amostras foi feita de acordo com o agrupamento hierárquico das LFQ desse grupo de proteínas por similaridades baseado na ontologia dos genes. Perfis similares formam agrupamentos ou “clusters”. Avalia simultaneamente tanto similaridades entre as amostras quanto similaridade entre as

proteínas, baseando-se em agrupamentos por funções biológicas dos *clusters* de proteínas (essas similaridades levam em consideração as relações ontológicas entre proteínas e indivíduos).

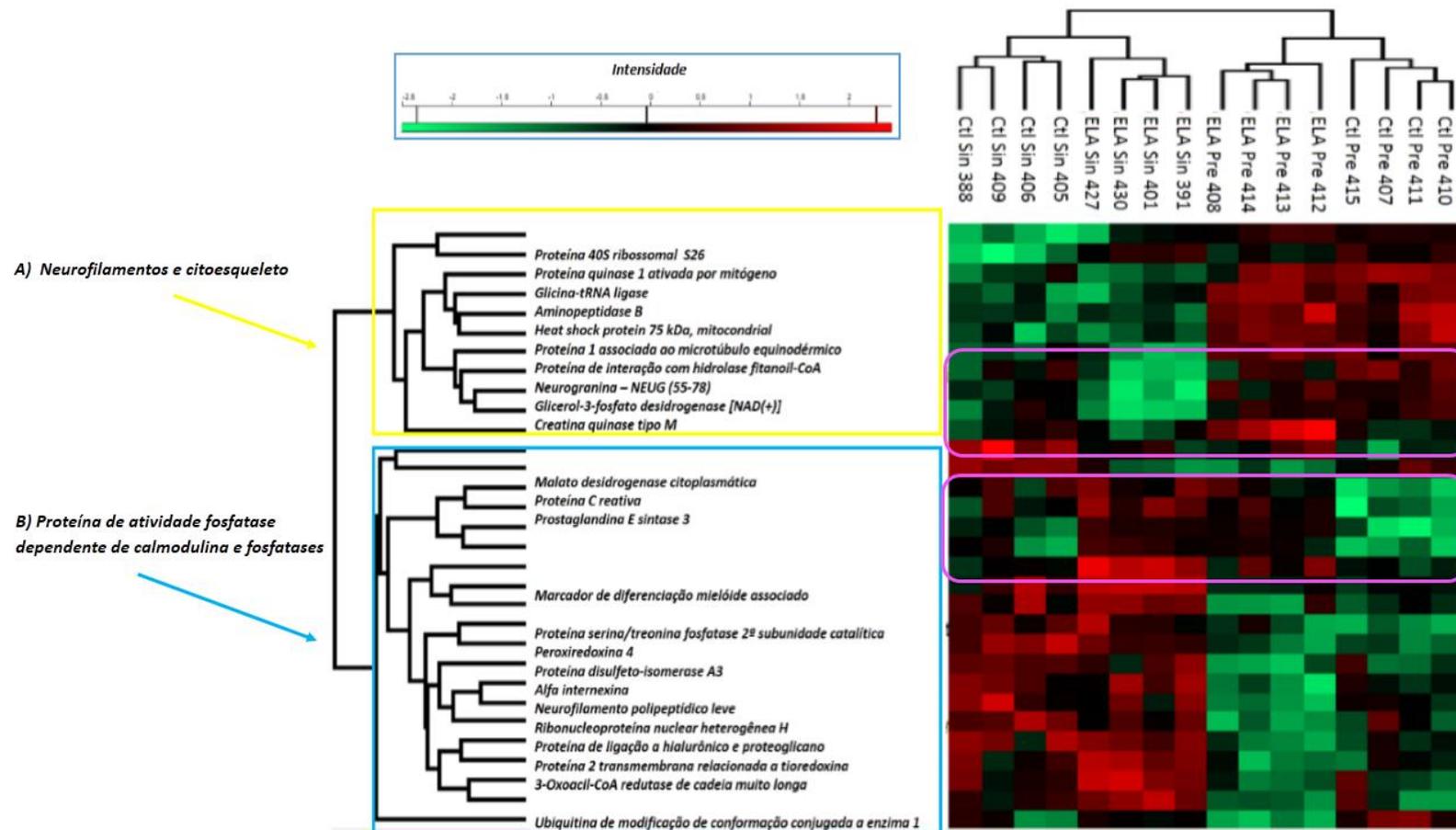


Figura 21 - Agrupamento hierárquico das proteínas diferencialmente significantes. Em vermelho estão as proteínas com expressão aumentada e em verde diminuída. Os retângulos amarelos e azuis destacam os agrupamentos de proteínas e os retângulos rosa mostram a expressão dessas proteínas nos grupos.*os espaços vazios são de proteínas não foram identificadas.

No agrupamento hierárquico é possível observar a formação de dois agrupamentos entre as amostras, os dois grupos de animais (sintomáticos e pré-sintomáticos, canto superior), estão bem “separados” formando dois agrupamentos, de acordo com distribuição hierárquica. Com relação as proteínas também houve a formação de dois agrupamentos de proteínas (figura 20). A distância euclidiana utilizada na construção do *heatmap*, é uma medida de dissimilaridade (diferença) entre os indivíduos, quanto maior for o valor mensurado, menor será a semelhança (observada através do dendrograma).

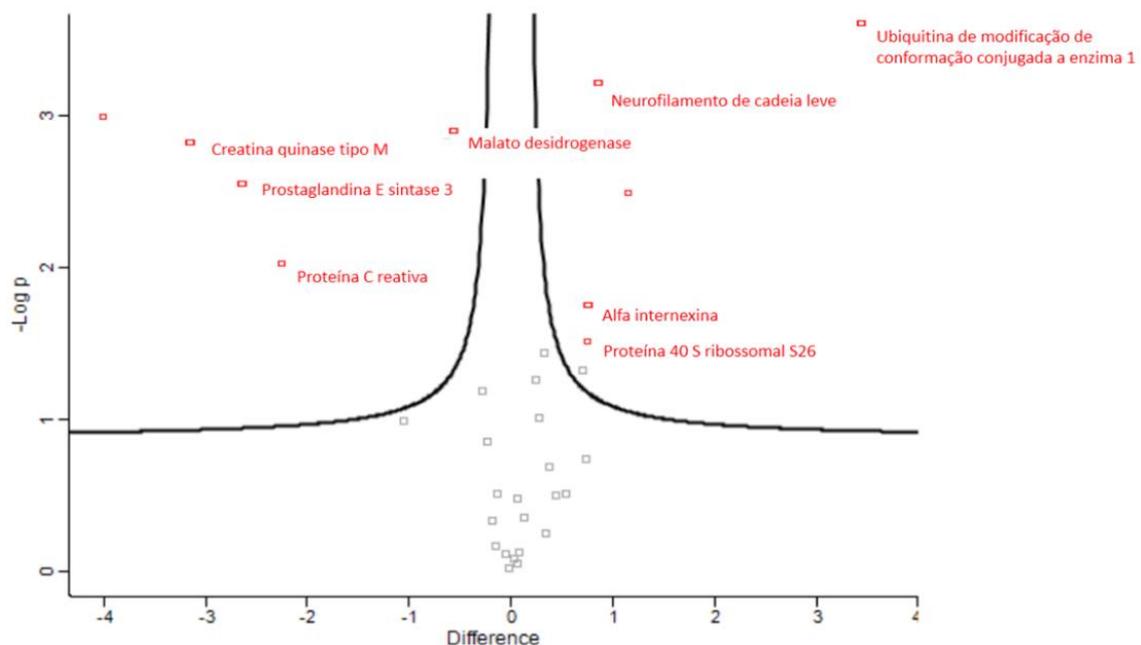
O primeiro agrupamento das proteínas envolvidas com neurofilamentos e citoesqueleto, mostrou que a expressão dessas proteínas está aumentada nos animais pré-sintomáticos (vermelho, canto superior direito) e diminuída no grupo de animais sintomáticos (verde, canto superior esquerdo), por se tratar de um grupo de proteínas ligada a doença, talvez essa diferença, esteja relacionada não só com a idade entre os dois grupos, mas principalmente com o estágio da doença, ou seja, o grupo de animais pré-sintomáticos pode estar com níveis dessas proteínas aumentados além do normal, talvez uma evidência inicial de agregação dessas proteínas, por que de fato esse conjunto de proteínas estruturais são afetados durante a doença, não é surpreendente que esse *cluster* proteínas esteja diminuído no grupo sintomático, por que nessa fase da doença os animais já possuem uma morte neuronal motora muito acentuada nos portadores ELA.

Já o segundo agrupamento formado por proteínas dependente de cálcio (calmudolina), apresentou uma situação inversa ao *cluster* anterior; proteínas com

expressão aumentada no grupo sintomático e diminuída nos pré-sintomáticos, por uma razão muito clara, excitotoxicidade por glutamato promovendo o aumento do influxo de cálcio, embora esse efeito sobre esse grupo de proteínas ocorra em resposta à ação do excesso de glutamato, e não necessariamente sobre a expressão desse grupo de proteínas. É interessante observar que nesse agrupamento de proteínas, também aparecem proteínas estruturais e de estresse redox e inflamação, demonstrando com isso a correlação entre esses eventos na doença.

Outra visualização interessante dessas proteínas diferencialmente expressas é o nível de significância delas baseado em menores valores de *p-value*, que é inversamente proporcional, ou seja, quanto menor esses valores, maior o nível de significância dessas proteínas. A figura 20 mostra as proteínas mais significantes em cada um dos dois grupos (pré-sintomáticos e sintomáticos).

1. Pré-sintomáticos



2. Sintomáticos

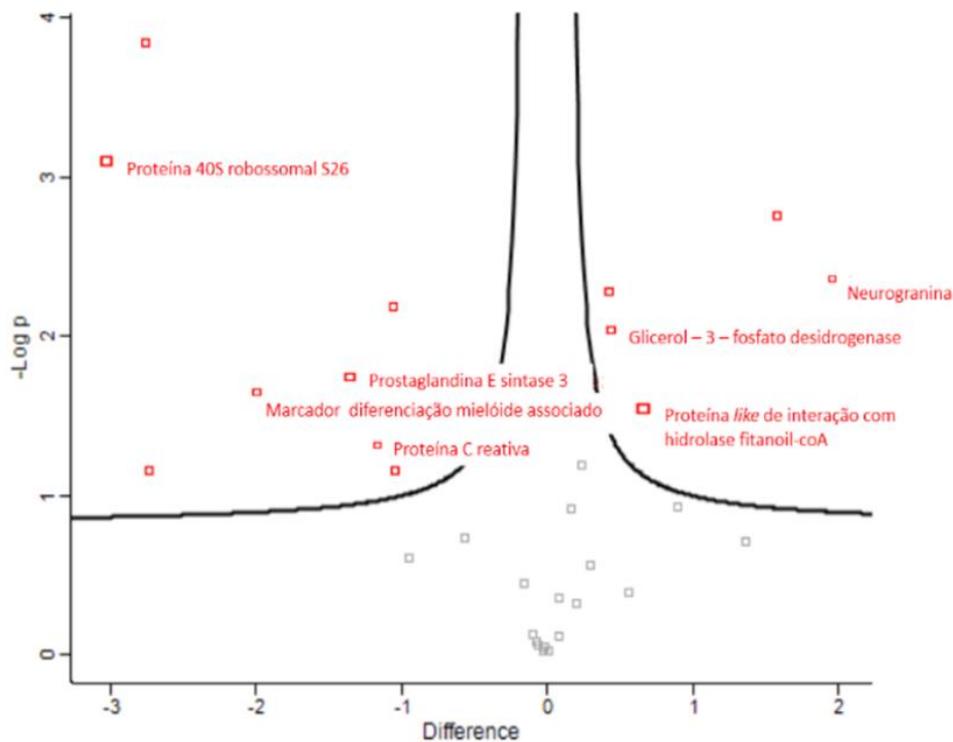


Figura 22 - Volcano plot dos grupos Ctl/ELA pré-sintomáticos (1) e Ctl/ELA sintomáticos (2) as proteínas em vermelho mais afastadas do centro, representam as proteínas mais significantes ($-\log_{10}$ do p -value, eixo y). A linha preta mostra o $p=0,05$, pontos acima dessa linha representam os $p<0,05$ e abaixo $p>0,05$, as demais proteínas (sem significância estatística) estão representadas pelos quadradinhos cinza, já os e quadradinhos vermelhos em branco são das proteínas não identificadas.

Em ambos grupos é possível observar as mesmas proteínas como a prostaglandina E sintase 3, a proteína 40S ribossomal S26 e a proteína c reativa, mostrando especialmente no grupo dos pré-sintomáticos que antes dos sintomas essas proteínas já tem sua expressão alterada, além da presença da creatina quinase M, ubiquitina e da proteína de neurofilamento já aparecem no grupo dos pré-sintomáticos, mostrando assim evidências iniciais de perturbações na homeostase proteica relativa a formação de agregados de proteínas, que é um dos efeitos fisiopatológico relevante na

ELA. Nos animais sintomáticos uma das proteínas mais significantes é a neurogranina, uma proteína de ligação ao cálcio, mostrando o reflexo do aumento do influxo de cálcio mediado pela excitotoxicidade do glutamato.

A figura 21 mostra a distribuição das proteínas em um diagrama de Venn, é possível visualizar de uma maneira mais clara proteínas compartilhadas e exclusivas entre os dois grupos. Durante o processamento de dados dessas proteínas o filtro utilizado de no mínimo 2 peptídeos únicos por cada proteína identificada reduziu drasticamente o número de proteínas exclusivas (figura 21), além disso, todas as proteínas (totais e exclusivas) só foram consideradas se estivessem presentes no mínimo em três amostras de cada réplica biológica (n=4). Foram encontradas 67 proteínas exclusivas do grupo ELA Sin, 58 ELA Pré, e compartilhadas 28 proteínas entre os grupos ELA Sin/ELA Pré, algumas dessas proteínas foram sumarizadas na figura 23, de acordo com a importância biológica dessas proteínas diante da doença.

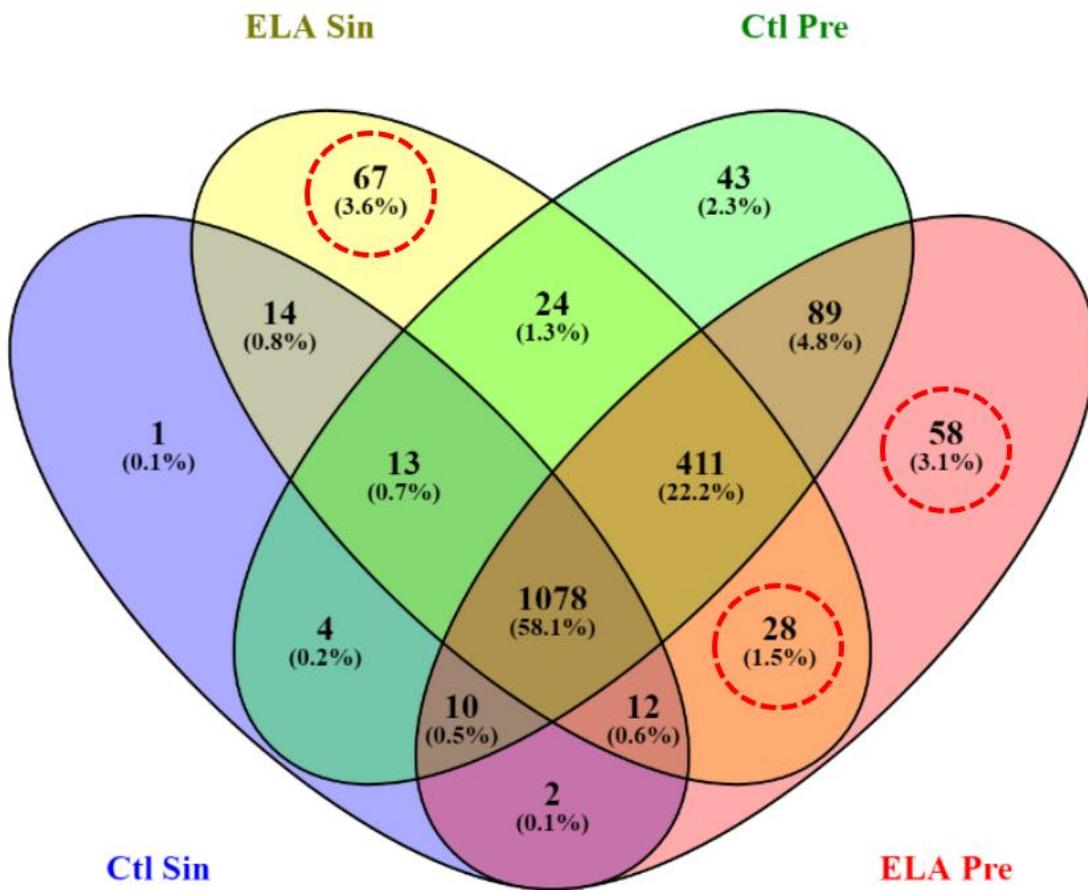


Figura 23 - Diagrama de venn dos grupos sintomáticos e pré-sintomáticos utilizando um filtro de exclusão de no mínimo 2 peptídeos únicos. Os círculos vermelhos representam o número total de proteínas compartilhadas entre os grupos ELA sintomático/ELA pré-sintomático (28) e exclusivas do ELA sintomático (67) e exclusivas em ELA pré-sintomático (58).

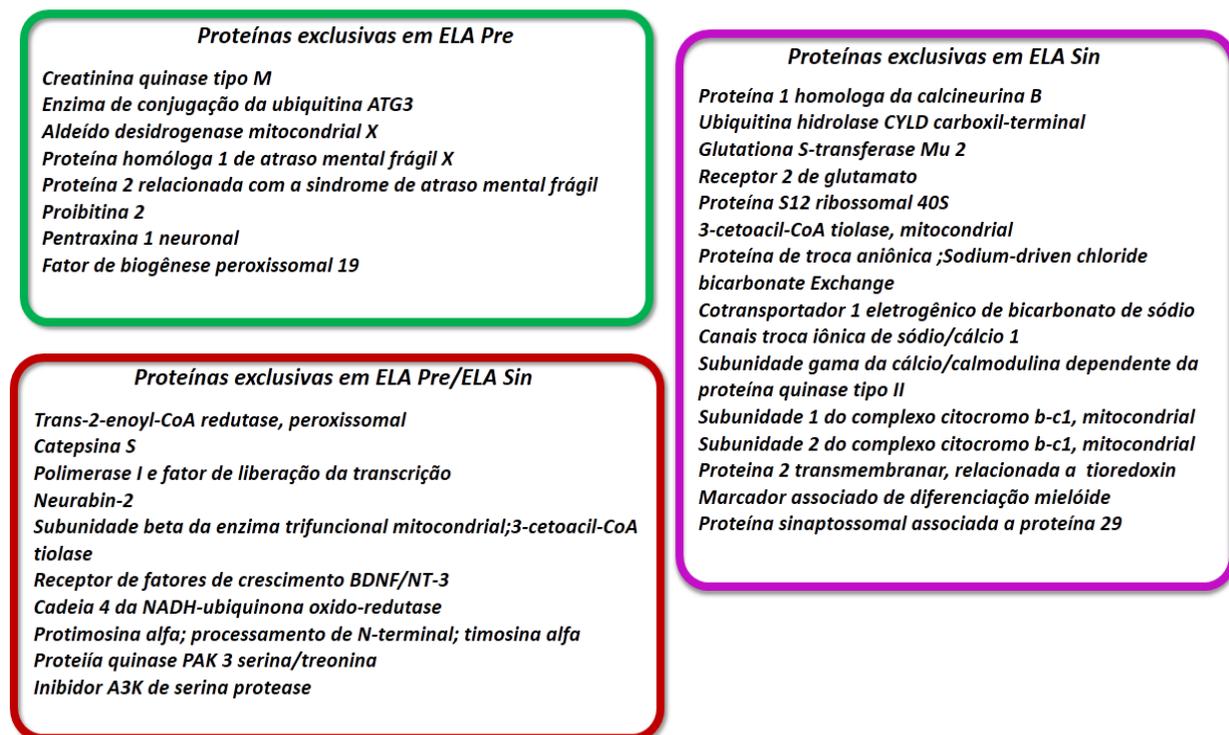


Figura 24 - Algumas das proteínas exclusivas relevantes no cenário bioquímico da ELA, dos grupos de animais portadores da ELA. Em verde algumas proteínas interessantes das 58 encontradas apenas nos ELA pré-sintomáticos, em vermelho algumas das 28 compartilhadas entre ELA pré-sintomáticos/ELA sintomáticos e em lilás algumas das 67 encontradas somente no grupo dos ELA sintomáticos.

4.4.2 Modificações pós-traducionais mediadas por HNE e HHE

No grupo dos controles pré-sintomáticos foram encontrados 7 peptídeos de proteínas modificadas com HNE (156 Da) via adição de Michael (tabela 5 A) e 8 nos ELA Pre. Nesse mesmo grupo, também foram encontradas nos controles, 3 peptídeos de proteínas modificadas por adição de HNE (138 Da) via base de Schiff, e 6 proteínas nos ELA pré-sintomáticos (tabela 5 B).

Foram encontrados 4 peptídeos de proteínas modificadas por HNE (via adição de Michael) nos controles sintomáticos (tabela 6 A) e 5 peptídeos de proteínas nos ELA Sint.

As modificações mediadas por HNE via base de Schiff, para o grupo de animais sintomáticos, resultaram em dois peptídeos de proteínas, nos controles, e 6 nos ELA Sin (tabela 6 B).

Tabela 5 - Peptídeos de proteínas dos animais pré-sintomáticos modificados via adição de Michael HNE (A) e por base de Schiff (B). Em destaque lilás estão as proteínas biologicamente relevantes.

A) Adição de HNE via Michael do grupo dos animais Pré-sintomáticos

Proteínas/grupo HNE	Função (fonte:uniprot: Ensembl)
Ctl Pre	
A0A0R3SJY0	Proteína não caracterizada
A0A0R3SJY0	Proteína não caracterizada
G5C1D0	Proteína não caracterizada, transmembrana
A0A0H5PXV0	Proteína não caracterizada
A0A0H5PXV0	Proteína não caracterizada
A0A0H5Q4X7	Proteína de ligação ao DNA (processo biológico: recombinação do DNA)
A0A158QDE6	Proteína não caracterizada
ELA Pre	
D4AE71	Proteína não caracterizada
A0A0K0CSZ2	Proteína não caracterizada
A0A0R3SJY0	Proteína não caracterizada
A0A0R3SJY0	Proteína não caracterizada
G5BZN0	proteína de ligação ao DNA
D4A5D4	Fator 1 de ligação cruzada ao microtúbulo
G5BZN0	Proteína de ligação ao DNA
G5BVN6	Proteína 2 de interação com a polimerase delta

B) Adição de HNE via Base de Schiff do grupo dos animais Pré-sintomáticos

Proteínas/grupo HNE-H2O	Função (fonte:uniprot: Ensembl)
Ctl Pre	
A0A091DH40	Proteína não caracterizada
A0A0N4YFQ7	NEDD8-enzima de conjugação com ubiqui.12
A0A091DH40	Proteína não caracterizada
ELA Pre	
A0A091DH40	Proteína não caracterizada
A0A0N4YDH1	Proteína não caracterizada
A0A0N4YFQ7	NEDD8-enzima de conjugação com ubiqui.12
G5AXV0	Catalase
G5AXV0	Catalase
A0A091DH40	Proteína não caracterizada

Tabela 6 - Peptídeos dos animais sintomáticos modificados via adição de Michael HNE (A) e por base de Schiff (B). Em destaque lilás estão as proteínas biologicamente relevantes.

A) Adição de HNE via Michael do grupo dos animais Sintomáticos

Proteínas/grupo HNE	Função (fonte: uniprot: Ensembl)
Ctl Sin	
A0A0K0CSZ2	Proteína não caracterizada
G5BZNO;F1LVV4	proteína de ligação ao DNA (Rcc2)
A0A0H5Q4X7	Proteína de ligação ao DNA (processo biológico: recombinação do DNA)
G5BZNO;F1LVV4	proteína de ligação ao DNA (Rcc2)
ELA Sin	
A0A0R3SJY0	Proteína não caracterizada
A0A0R3SJY0	Proteína não caracterizada
A0A0H5Q4X7	P. não caracterizada, GO p.de ligação e de recombinação ao DNA
A0A158QDE6	Proteína não caracterizada
G5BVN6	Proteína 2 de interação com a polimerase delta

B) Adição de HNE via Base de Schiff do grupo dos animais Sintomáticos

Proteínas/grupo HNE-H2O	Função (fonte: uniprot: Ensembl)
Ctl Sin	
A0A0N4YDH1	Proteína não caracterizada
A0A0N4YXQ3	Proteína não caracterizada
ELA Sin	
A0A091DH40	Proteína não caracterizada
A0A0N4YDH1	Proteína não caracterizada
A0A0N4YFQ7	NEDD8-enzima de conjugação com ubiqui.12
E3VX40	Isoforma 1 Camodulina, GO – inibidor da atividade do canal de cálcio, p. de ligação ao cálcio,
A0A091DH40	Proteína não caracterizada
A0A158QY67	Tiol redutase lisossomal induzível por interferon gama

Com relação aos peptídeos de proteínas modificadas por HHE (114) via adição de Michael (tabela 7 A) foram encontradas 5 nos controles pré-sintomáticos, e 1 no ELA Pre. As modificações por adição de HHE (96), via base de Schiff (tabela 7 B), para o grupo

dos pré-sintomáticos, resultaram em 3 peptídeos de proteínas nos controles e 2 presentes no ELA Pre.

E para o grupo dos animais sintomáticos, as modificações resultantes das adições de HHE, via adição de Michael, compreenderam, 5 peptídeos de proteínas no grupo controle, e 3 nos ELA sintomáticos (tabela 8 A), e as adições de HHE via base de Schiff (tabela 8 B) foram de 5 peptídeos de proteínas para os controles e 4 para os ELA sintomáticos, e em todos os grupos vários peptídeos de proteínas encontrados foram identificados como proteínas não caracterizadas, o que significa dizer que são proteínas ainda sem uma descrição bioquimicamente apropriada nos depositórios de dados proteômicos.

Tabela 7– Peptídeos dos animais pré-sintomáticos modificados via adição de Michael HHE (A) e por base de Schiff (B).

A) Adição de HHE via Michael do grupo dos animais Pré-sintomáticos

<i>Proteínas/grupo HNE</i>	<i>Função (fonte: uniprot: Ensembl)</i>
Ctl Pre	
A0A0G2KA88	<i>Supressor de glicose associado a autofagia 1 (Soga1), atua na regulação da autofagia</i>
A0A0G2KA88	<i>Supressor de glicose associado a autofagia 1 (Soga1), atua na regulação da autofagia</i>
A0A0N4YIF3	<i>Proteína 18 da família TWiK family de canais de potássio</i>
A0A158P631	<i>Proteína não caracterizada</i>
A0A158QFU7	<i>Proteína não caracterizada</i>
ELA Pre	
A0A158P631	<i>Proteína não caracterizada</i>

B)Adição de HHE via Base de Schiff do grupo dos animais Pré-sintomáticos

Proteínas/grupo HHE	Função (fonte:uniprot: Ensembl)
Ctl Pre	
A0A0G2K9E4	Transportador de troca aniônica (Slc26a7)
F1M4G6	Proteína não caracterizada, GO atividade de oxido-redutase, atuando sobre o grupo aldeído ou oxo de doadores, NAD ou NADP como acceptor
G5B3B2	Cadeia alfa da tubulina, atividade gtpásica, constituinte de citoesqueleto.
ELA Pre	
A0A0G2K9E4	Transportador de troca aniônica (Slc26a7)
F1M4G6	Proteína não caracterizada, GO atividade de oxido-redutase, atuando sobre o grupo aldeído ou oxo de doadores, NAD ou NADP como acceptor

Tabela 8– Peptídeos dos animais sintomáticos modificados via adição de Michael HHE (A) e por base de Schiff (B). Em destaque lilás estão as proteínas biologicamente relevantes.

A)Adição de HHE via Michael do grupo dos animais Sintomáticos

Proteínas/grupo HHE	Função e/ou nome (fonte:uniprot: Ensembl)
Ctl Sin	
A0A0N4YIF3	Proteína 18 da família TWiK family de canais de potássio
A0A158P631	Proteína não caracterizada
M0R660	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
A0A158QCBO	Proteína não caracterizada
A0A158QCBO	Proteína não caracterizada
ELA Sin	
A0A091E4M3	Proteína não caracterizada
A0A158P631	Proteína não caracterizada
G5BFB3	Janus quinase e proteína 3 de interação com microtúbulo

B)Adição de HHE via Base de Schiff do grupo dos animais Sintomáticos

Proteínas/grupo HHE-H2O	Função e/ou nome (fonte:uniprot: Ensembl)
Ctl Sin	
A0A091E6D4	Subunidade alfa tipo 10 da proteína de canal de sódio
O00763	Acetil-CoA carboxilase 2;Biotina carboxilase
O00763	Acetil-CoA carboxilase 2;Biotina carboxilase
A0A091E6D4	Subunidade alfa tipo 10 da proteína de canal de sódio
A0A0N4YQQ5	Proteína não caracterizada
ELA Sin	
G5BFB3	Janus quinase e proteína 3 de interação com microtúbulo
O00763	Acetil-CoA carboxilase 2;Biotina carboxilase
O00763	Acetil-CoA carboxilase 2;Biotina carboxilase
A0A0N4YQQ5	Proteína não caracterizada

E por fim, sumarizar e destacar os peptídeos das proteínas modificadas pelos aldeídos encontradas nas tabelas anteriores, algumas relações importantes entre os grupos foram mostradas nas duas figuras subsequentes. A figura 23 mostra os peptídeos das proteínas modificadas por HNE (por Michael e base de Schiff), e a figura 24 os peptídeos das proteínas modificadas por HHE.

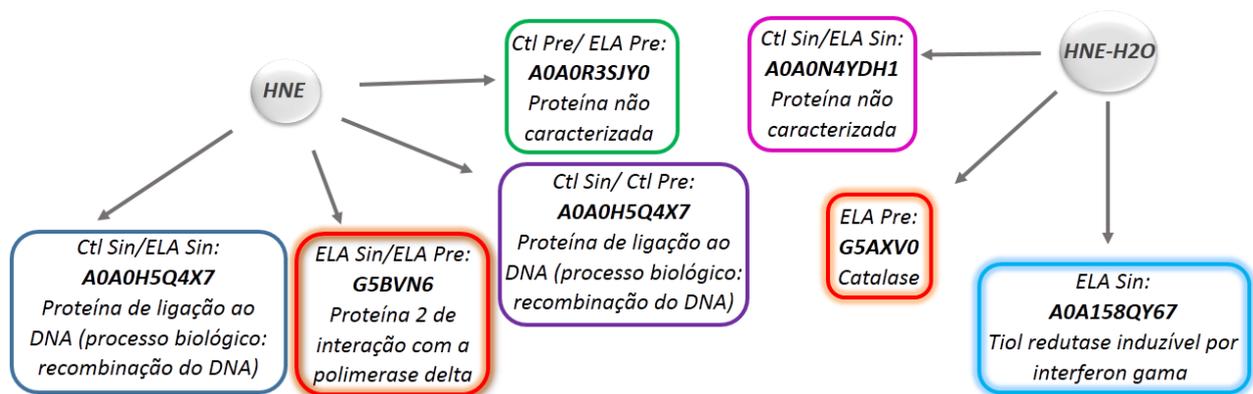


Figura 25 - Representação esquemática dos peptídeos das proteínas relevantes modificadas por HNE, de acordo com a relação entre os grupos, via adição de Michael (HNE) e base de Schiff (HNE-H2O). Em destaque, nas cores azul e vermelha as relações mais interessantes.

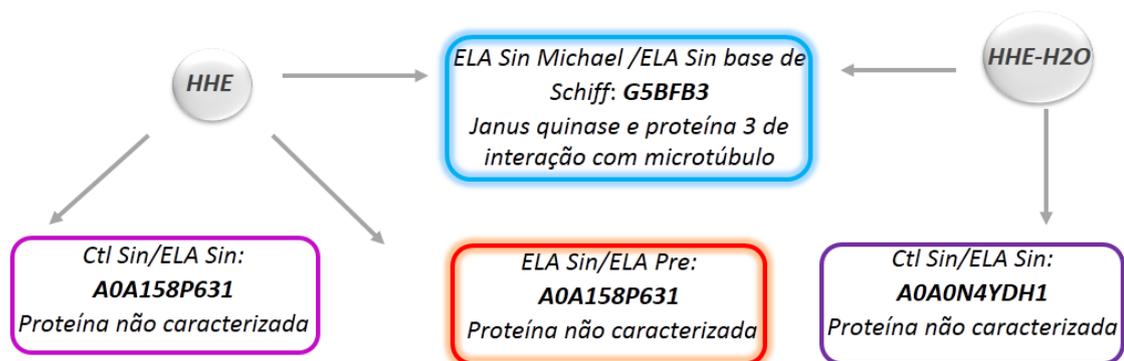


Figura 26 - Representação esquemática dos peptídeos das proteínas relevantes modificadas por HHE, de acordo com a relação entre os grupos, via adição de Michael (HHE) e base de Schiff (HHE-H2O). Em destaque, nas cores azul e vermelha as relações mais interessantes.

5. Discussão

5.1 Citocromo c

Musatov *et al*, 2002, demonstraram que o citocromo c pode ser inativado por modificações em resíduos de lisina e histidina das subunidades VIIc ou VIII. Outra histidina importante na manutenção adequada da conformação do citocromo c, é a histidina na posição 18 que, juntamente com a metionina 80, diminui a exposição do grupo heme a danos oxidativos. Sigolo *et al*, 2007 observaram uma adição de Michael no mesmo resíduo de histidina 33 no citocromo c incubado 18 mM de o *trans,trans*-decadienal (DDE).

Tang *et al*, 2011, trataram amostras de citocromo c, com HNE, em diferentes concentrações em condições denaturantes, para verificar a estabilidade do aduto. Nesse trabalho, foi discutido que a histidina 33 é, provavelmente, um *hot spot* para a adição de Michael a lisinas, possuem uma adição randômica de HNE. Histidina 33, mesmo em baixa concentração de HNE, sofre adição de Michael.

Em trabalhos sobre a estrutura do citocromo c há uma recente discussão sobre a função da histidina 33, segundo Ollerich *et al*, 2003 quando o ferro perde a coordenação com a metionina 80- a banda CT do citocromo c desaparece. Esses autores sugerem que o ferro coordene com a histidina 33, hoje se discute, também, a possibilidade dessa ligação ocorrer com a lisina 79 ao invés da histidina 33. Desvendar essa ligação é importante, já que a perda de coordenação do citocromo c faz com que ele assuma atividade de peroxidase (Mugnol, *et al*, 2008).

5.2 Proteínas modificadas por aldeídos reativos no modelo ELA

Outro estudo realizado por Carbone *et al*, 2004, em modelo de ratos com lesão hepática por uso crônico de álcool, demonstram que a indução por estresse oxidativo da *heat shock protein 72* kDa (Hsp72) não está acompanhada do aumento de sua habilidade de restabelecer a conformação das proteínas, esse comportamento foi atribuído a modificação por HNE da Cys267 no domínio ATPásico da Hsp72.

Staunton, *et al*, 2011 utilizando *wobble mouse* (modelo de ELA caracterizado por uma grande variedade de desordens celulares, que mais se aproxima da ELA esporádica em humanos) identificaram por gel 2D proteínas do metabolismo energético, de contração muscular, filamentos intermediários, e proteínas de resposta a estresse celular, com destaque para um aumento dos níveis da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, esses dados estão de acordo com a hipótese de uma mudança glicolítica relacionada ao estresse redox na atrofia muscular ligada a doença, talvez seja uma tentativa de compensar a perda da atividade mitocondrial.

Dobrowolny, *et al*, 2008 realizaram um estudo utilizando o modelo de rato SOD1^{G93A} sobre o papel do estresse redox na homeostase muscular, e observaram um aumento de produtos de estresse redox (MDA e proteína carbonilada) que sinalizaram para iniciar a autofagia (processo de degradação intracelular), os autores demonstraram que o músculo esquelético é o alvo primário da toxicidade mediada pela SOD1^{G93A}.

Em 2002 Matsumoto & Fridovich, utilizando o modelo SOD1^{G93A} verificaram que o ganho tóxico da SOD1 mutante leva a morte gradual dos neurônios motores, o inchaço mitocondrial e formação de vacúolo seriam um dos primeiros sinais da morte neuronal.

A SOD1 mutada se liga na Hsp70, Hsp27 ou na Hsp25, essas proteínas impedem a entrada da SOD1 para dentro da mitocôndria (embora não tenha efeito na SOD *wild type*), porém essa ligação Hsp-SOD faz com que as Hsp fiquem indisponíveis para suas funções anti-apoptóticas, levando a formação de agregados sedimentáveis observados (em paralelo) em extratos de células de neuroblastoma, outras proteínas parecem ser recrutadas para formar esses agregados.

Com o objetivo de compreender a resistência dos neurônios motores, Comley, *et al*, 2015 estudaram várias proteínas envolvidas na resistência desse tipo de neurônio, incluindo a proteína de receptor GABA (A) alfa 1, subunidade solúvel da guanilato ciclase alfa-3 e parvalbumina foram mais abundantes em neurônios óculo-motor tanto no homem quanto no rato SOD1^{G93A}. Os neurônios motores vulneráveis apresentaram níveis mais elevados de proteína dineína, periferina e proteína de receptor GABA (A) alfa 2, que desempenham papéis no transporte retrógrado axonal e excitabilidade, respectivamente. A partir desses dados fica claro que os neurônios motores oculomotor tem uma assinatura distinta de proteína quando comparados aos neurônios motores vulneráveis no tronco cerebral e da medula espinhal, o que poderia em parte explicar a sua resistência à degeneração em ALS. Em paralelo, Park, 2015 em um estudo sobre a de-inervação muscular durante o envelhecimento utilizando o mesmo modelo de rato transgênico (SOD1^{G93A}) obteve dados que sugerem uma completa reconfiguração do sistema colinérgico na medula espinhal e nos nervos que podem ser parte dos mecanismos compensatórios estabelecidos ainda durante o desenvolvimento da coluna vertebral.

Pickles, *et al*, 2013 utilizando o anticorpo B8H10 que reconhece a SOD1 *misfolded*, verificaram que essa forma da SOD1 está presente em maior abundância em frações mitocondriais de medulas espinhais de ratos SOD1^{G93A} em comparação com forma oxidada da SOD1 (reconhecida pelo anticorpo C4F6). Utilizando citometria de fluxo, detectaram uma deposição dependente da idade da forma mutada da SOD1 na mitocôndria de medulas espinhais de ratos SOD1^{G93A} e também em camundongos SOD1 G37R. Lesões mitocondriais, incluindo aumento de volume mitocondrial, o excesso de produção de superóxido e um aumento da exposição do domínio BH3 de Bcl-2 (família de genes anti-apoptótico) são efeitos deletérios que estão associados à presença de SOD1 *misfolded*. Por fim, os autores observaram nos lisados e frações mitocondriais de linfoblastos derivados de pacientes portadores de ELA (mutações de SOD1) acúmulo da SOD1 *misfolded*, mas não nos controles. É importante frisar que alterações mitocondriais estão intimamente relacionadas com o aumento do estresse redox.

5.3 Proteômica de córtex motor

5.3.1 Análise proteoma global e proteínas modificadas pelos aldeídos

Com relação ao primeiro agrupamento de proteínas (neurofilamentos e citoesqueleto) conforme mostra a figura 19, algumas proteínas merecem atenção como por exemplo, uma proteína que tem sua expressão aumentada apenas nos animais pré-sintomáticos ELA é a creatina quinase M, considerando que essa proteína é um conhecido biomarcador de lesão no miocárdio, e outros tipos de lesões em tecidos já que essa proteína atua em situações em que as células precisam de energia emergencial (Vikenes, *et al*, 2009), e curiosamente a alteração de expressão aumentada ocorre nos

animais ELA pré-sintomáticos. Outra proteína desse agrupamento que apresentou um comportamento semelhante a anterior é a glicerol-3-fosfato desidrogenase (diminuída nos portadores ELA pré-sintomáticos) como é uma enzima que participa do metabolismo, oxida o glicerol 3-fosfato a diidroxicetona e está envolvida na gliconeogênese, para formar glicose, ou seja, duas proteínas de metabolismo energético alteradas nos animais ELA pré-sintomáticos, talvez seja indício de mecanismos metabólicos compensatórios muito antes do início da ELA.

A glicina-tRNA ligase (proteína que transporta seu aminoácido cognato), é uma proteína que exhibe formas mutantes (no gene GARS) que formam ligações anormais com a neurofilina 1 (receptor de outras classes de semaforinas), e outros receptores que pertence à classe das semaforinas, que são proteínas importantes durante o desenvolvimento neuronal, na sinaptogênese que é a orientação do crescimento do cone dos axônios para as fibras musculares (sinalização repulsiva ou atrativa nos terminais axonais e as fibras musculares) (Motley, *et al*, 2010; Antonellis, *et al*, 2003). Essas formas mutantes em GARS está relacionada com a doença de Charcot-Marie-Tooth (CMT), que promove a degeneração dos neurônios motores dos nervos periféricos, e o ganho tóxico de função pela glicina tRNA ligase em modelos de camundongos dessa doença (CMT2D) promove a degeneração dos neurônios motores (Spaulding, *et al*, 2016). A *heat shock protein* 75Kda mitocondrial atua na tentativa de restabelecer a conformação ativa de proteínas modificadas ou oxidadas, é regulada com aumento do estresse celular ou danos mediados por compostos tóxicos, ela impede a agregação, e por ser mitocondrial (fonte endógena principal de EROs) talvez explique a sua baixa expressão no grupo de animais sintomáticos, já que o aumento evidente de

estresse redox nesse grupo superou sua capacidade de manter a homeostase dos processos redox. E por fim, a neurogranina uma proteína de ligação ao cálcio que atua na via da PKC.

No segundo agrupamento mostra algumas proteínas interessantes na compreensão da doença, como por exemplo a proteína C reativa que é uma proteína de ligação a fosfocolina expressa em células lesionadas ou mortas, marcando-as para o sistema complemento para direcioná-las para fagocitose, e é um indicador sensível de inflamação (Sidore, *et al*, 2015).

Zambelli, *et al*, 2014, demonstraram uma ligação entre a aldeído desidrogenase (ALDH2) com o processo inflamatório, mais especificamente à nocicepção, os autores testaram essa hipótese ao utilizar um camundongo *knock-in* para a aldeído desidrogenase (ALDH2), e observaram que ao receber um estímulo doloroso esses animais apresentavam uma sensibilidade maior, bem como possuíam níveis maiores adutos de proteínas ligadas ao HNE, comparados ao *wild type*.

Zhao, *et al*, 2014, realizaram um estudo utilizando tecido cardíaco de ratos saudáveis tratados com doxorubicina para identificar proteínas mitocondriais modificadas por HNE, através de técnicas como imunoprecipitação e gel 2D, e os autores verificaram que as proteínas mitocondriais modificadas estão relacionadas com o metabolismo energético, principalmente proteínas do ciclo de *krebs* e da cadeia de transporte de elétrons.

De modo geral, o conjunto de proteínas encontrado exclusivamente no grupo de pré-sintomáticos de ELA, compreendem proteínas ligadas a homeostase neuronal, como

por exemplo, a pentraxina 1 neuronal, que contribui para o dano causado por agregados beta-amilóide e é super-expresso durante a degeneração dos dendritos em portadores de Alzheimer (Abad, *et al*, 2006), e a proteína homóloga 1 de atraso mental frágil x, que atua sob o desenvolvimento neuronal e na plasticidade sináptica através do *splicing* dos mRNA atua na manutenção da estabilidade do mRNA, no transporte dendrítico dos mRNA (Bardoni, *et al*, 2001). Ainda nesse mesmo conjunto de proteínas, a presença da aldeído desidrogenase mitocondrial nos animais ELA pré-sintomáticos pode sugerir indícios de uma atuação deletéria dos aldeídos provenientes de um desequilíbrio no balanço redox mitocondrial, é interessante destacar que essas evidencias de ruptura no equilíbrio redox ocorrem antes dos sintomas. Outra proteína relevante, ainda neste grupo de indivíduos, é a proibitina 2, que atua na marcação mitocondrial para autofagia, é importante frisar nesse contexto de compartimentalização celular, que processos biológicos diferentes parecem ocorrer na mesma organela (mitocôndria), sugerindo talvez uma relação entre a doença e os processos redox mitocondriais, já que a aldeído desidrogenase e esta última proteína são mitocondriais (Wei, *et al*, 2017).

Algumas proteínas compartilhadas entre ELA Pre/ELA Sin merecem atenção devido ao seus contextos bioquímicos na fisiopatologia da doença, como a neurabin 2, uma proteína responsável pela modulação da transmissão da sinapse excitatória e da manutenção da morfologia adequada dos dendritos através da interação da mesma com a actina (Satoh, *et al*, 1998). Outra proteína interessante é a polimerase I e fator de liberação da transcrição, que regula os limites de expansão do tecido adiposo (Perez-Diaz, *et al*, 2014).

Com relação aos peptídeos das proteínas modificadas por HNE (via adição de Michael) encontradas nos grupos, algumas destas proteínas compartilhadas entre grupos importantes merecem atenção (figura 24 e 25), como a proteína 2 de interação com a polimerase delta, compartilhada entre ELA pré-sintomáticos e ELA sintomáticos, é uma proteína de ligação ao DNA e a outras proteínas, presente no núcleo mitocondrial, está envolvida nos processos biológicos de morfogênese mitocondrial, atua na regulação negativa da macro-autofagia, e na regulação positiva do ciclo celular mitótico (Liu, *et al*, 2003; Kim, *et al*, 2013).

A respeito dos peptídeos de proteínas modificadas por HHE curiosamente, uma mesma proteína foi encontrada no grupo dos ELA sintomáticos, tanto por mecanismo de adição via Michael e base de Schiff: a Janus quinase e proteína 3 de interação com o microtúbulo, essa proteína se liga receptor GABA, ao microtúbulo, cinesinas e ao RNA, com relação aos processos biológicos, atua na cognição e no transporte proteico (Cruz-Garcia, *et al*, 2007; Couve, *et al*, 2004)

6. Conclusões

Os estudos com citocromo c mostraram a ligação dos aldeídos ao citocromo c e mecanismos de reação foram propostos. Foram encontrados seis peptídeos modificados por HHE e um para o HNE, e o peptídeo TGPLHGLFGR se mostrou modificado pelos dois aldeídos paralelamente. Foi demonstrado que a histidina 33 é um “*hot spot*” frente as adições pelos aldeídos. Nas análises por *western blot* dos aldeídos foi possível observar uma tendência de aumento na concentração de proteínas ligadas ao HNE nos animais ELA, mais acentuada nas amostras de 70 dias comparadas ao controle. Com relação aos resultados obtidos com HHE tanto os animais pré-sintomáticos quanto os sintomáticos não apresentaram diferenças de HHE-proteína, tanto nos controles quanto nos animais ELA. Nas amostras dos animais sintomáticos não detectamos diferença significativa na concentração de aldeído-proteína entre os grupos.

Já as análises proteômicas revelaram 24 proteínas diferencialmente expressas, dando destaque para proteínas com os maiores valores de significância (*p-value*), como a ubiquitina de modificação de conformação conjugada a enzima 1, no grupo dos pré-sintomáticos e a neurogranina, no grupo dos animais sintomáticos e várias proteínas de metabolismo energético, de neurofilamentos, proteínas de processos redox e proteínas ligadas o metabolismo de cálcio (fundamentais na fisiopatologia em ELA). A respeito de algumas proteínas importantes encontradas com exclusividades nos grupos pelo diagrama de Venn, foram encontradas a aldeído desidrogenase mitocondrial x nos animais ELA pré-sintomáticos, e a polimerase I e fator de liberação da transcrição compartilhadas nos animais ELA pré-sintomáticos e sintomáticos. Como proteína exclusiva nos ELA sintomáticos, foram encontradas a proteína do receptor 2 de

glutamato, diversas proteínas ligadas a canais iônicos e do metabolismo de cálcio, de lipídeos bem como proteínas ligadas ao sistema proteassomal e ao estresse redox.

Com relação a proteínas modificadas pelos aldeídos, foram encontradas algumas relevantes, como a proteína 2 de interação com a polimerase delta que foi modificada por HNE via adição de Michael, encontrada nos animais ELA pré-sintomáticos e sintomáticos. A catalase foi encontrada modificada por HNE via base de Schiff) apenas nos ELA pré-sintomáticos, e a tiol redutase induzível por interferon gama no grupo ELA sintomático. No que se refere a proteínas modificadas por HHE, foram encontradas a Janus quinase e a proteína 3 de interação com microtúbulo, modificada tanto por adição de Michael quanto via base de Schiff nos animais ELA sintomáticos. É interessante ressaltar que algumas modificações encontradas em proteínas não caracterizadas podem indicar proteínas novas ainda não descritas como modificadas por esses aldeídos. Portanto, os resultados mostram que algumas das proteínas modificadas por HNE e HHE encontradas neste trabalho, estão relacionadas ao estresse redox, vias metabólicas energéticas, proteínas envolvidas na resposta a danos oxidativos, e processos inflamatórios. Tais modificações ocorrem não só nesse modelo.

A compreensão da relação desses eventos moleculares pode ajudar a entender melhor a patogênese e se aproximar de um dos maiores desafios nesse modelo, que é entender o “gatilho” que inicia essa doença, já que a sobrevida dos portadores é extremamente curta (de 2 a 5 anos) depois da manifestação dos primeiros sintomas.

7.Referências

Abad MA, Enguita M, DeGregorio-Rocasolano N, Ferrer I, Trullas R. Neuronal pentraxin 1 contributes to the neuronal damage evoked by amyloid-beta and is overexpressed in dystrophic neurites in Alzheimer's brain. **J Neurosci.** v.26, n.49, p.12735-47,2006.

Amarnath, V, Valentine ,W. M. Montine , T. J. Patterson ,W. Amarnath, K.H. Bassett, C. N. Graham,D. G.Reactions of 4-Hydroxy-2(E)-nonenal and Related Aldehydes with Proteins Studied by Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. **Chem. Res. Toxicol.** v.11, n. 4, p 317–328, 1998.

Antonellis A, Ellsworth RE, Sambuughin N, Puls I, Abel A, Lee-Lin SQ, Jordanova A, Kremensky I, Christodoulou K, Middleton LT, Sivakumar K, Ionasescu V, Funalot B, Vance JM, Goldfarb LG, Fischbeck KH, Green ED. Glycyl tRNA synthetase mutations in Charcot-Marie-Tooth disease type 2D and distal spinal muscular atrophy type V". **American Journal of Human Genetics.** V.72, n.5, p. 1293–9. 2003.

Bardoni B, Schenck A, Mandel JL.The Fragile X mental retardation protein.**BrainRes Bull.** V.56, n.3-4, p. 375-82. 2001.

Citipak, A. Hasselacher, M. Tehlivets, O. Collison, Ej. Zivkovic, M. Matijevic, T. *Saccharomyces cerevisiae* strain expressing a plant fatty acid desaturase produces polyunsaturated fatty acids and is susceptible to oxidative stress induced by lipid peroxidation. **Free Radicalin Biology and Medicine.**v.40, n.5, p. 897-906, 2006.

Couve, A., Restituto, S., Brandon, J. M., Charles, K. J., Bawagan, H., Freeman, K. B., Pangalos, M. N., Calver, A. R., Moss, S. J. Marlin-1, a novel RNA-binding protein associates with GABA-B receptors. **J. Biol. Chem.** V.279, p. 13934-13943, 2004.

D'Alessandro, A. Rinalducci, S. Zolla, L. Redox proteomics and drug development. **Journal of Proteomics**.v.74, p.2575-2595, 2011.

Esterbauer, H. Schaur, R.J.Zollner,H. Chemistry and biochemistry of 4- hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radicalin Biology and Medicine** v. 11, p. 81-128, 1991.

Ferguson AM, White LS, Donovan PJ, Piwnica-Worms. Normal cell cycle and checkpoint responses in mice and cells lacking Cdc25B and Cdc25C protein phosphatases.**H.Mol Cell Biol.** v.25, n.7, p.2853-60, 2005.

Gaschler, M. M. Stockwell B. R. Lipid peroxidation in cell death, Biochemical and Biophysical. **Research Communications** 482 419 – 425, 2017.

Goizet C, Boukhris A, Maltete D, Guyant-Maréchal L, Truchetto J, Mundwiler E, Hanein S, Jonveaux P, Roelens F, Loureiro J, Godet E, Forlani S, Melki J, Auer-Grumbach M, Fernandez JC, Martin-Hardy P, Sibon I, Sole G, Orignac I, Mhiri C, Coutinho P, Durr A, Brice A, Stevanin G. SPG15 is the second most common cause of hereditary spastic paraplegia with thin corpus callosum". **Neurology.** V.73, n.14, p.1111–9, 2009.

Grune, T. Davies, K.J.A. The proteasomal system and HNE-modified proteins. **Molecular Aspects of Medicine** v.24.p.195-204,2003.

Guéraud F, M. Atalay, N. Bresgen, A. Cipak, P. M. Eckl, L. Huc, I. Jouanin, W. Siems & K. Uchida. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products **Free Radical Research**, v.44, n.10, p. 1098–1124, 2010.

Guo, Q., Gao, S., Sun, Y., Gao, Y., Wang, X., & Zhang, Z. Antioxidant efficacy of Rosemary ethanol extract in palm oil during frying and accelerated storage. **Industrial Crops and Products**, v.94, n.1, p. 82-88. 2016.

Halliwell B, Gutteridge J.M. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed. New York: Oxford University Press Inc; 2007.

Isom, A. L. Barnes, S. Modification of cytochrome c by 4-Hydroxy- 2-Nonenal: evidence for histidine, lysine, and arginine-aldehyde adducts. **Journal of the American Society Mass Spectrometry**. v. 15, p.1136-1147, 2004.

Jacobs, A. T. & Marnett, L. J. Systems analysis of protein modification and cellular responses induced by electrophile stress. **Accounts of Chemistry Research**. v. 43, n.5, p.673-683, 2010.

Je, J. H. Lee, J. Y. Jung, K. J. Sung, B. Go, E. K. Yu, B. P. Hae Y. C. NF- κ B activation mechanism of 4-hydroxyhexenal via NIK/IKK and p38 MAPK pathway. **Febs Letters**, v.566, p.183-189, 2004.

Kalil K, Dent E.W. Branch management: mechanisms of axon branching in the developing vertebrate CNS". **Nat. Rev. Neurosci**. V.15, n. p. 7–18. 2014.

Kim Y. D., Hyejin Park, Jihoon Nah, Seowon Moon, WonJae Lee, Se-hoon Hong, Tae-In Kam, Yong-Keun. Jung Essential role of POLDIP2 in Tau aggregation and neurotoxicity via

autophagy/proteasome inhibition. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 462, p.112-118,2015.

Kowaltowski, A.J. Castilho, R.F. Grijalba, M.T. Bechara, E.J.H. Vercesi, A.E. Effect of Inorganic Phosphate Concentration on the Nature of Inner Mitochondrial Membrane Alterations Mediated by Ca²⁺Ions. **The Journal of Biological Chemistry**.v.271, n.6, p.2929-2934, 1996.

Lim, S.Y. Doherty, J. D. Salem, N. Lead exposure and (n-3) fatty acid deficiency during rat neonatal development alter liver, plasma, and brain polyunsaturated fatty acid composition. **Journal of Nutrition**. 135, n. 5, p.1027-1033, 2005.

Lin, P.P.Yang, M.H. Liao, P.C. Wu, H.Y. Chang, L.W. Tsai, H.T. Tyan, Y.C. Proteomic analysis of proteins associated with tt-DDE induced toxicity in BEAS-2B cells. **Biochemistry Biophysical Research Communications**. v.376, n.3, p.519-524, 2008.

Liu Li, Esther M. Rodriguez-Belmonte, Nayef Mazloun, Bin Xie, and Marietta Y. W. T. Le Identification of a Novel Protein, PDIP38, That Interacts with the p50 Subunit of DNA Polymerase and Proliferating Cell Nuclear Antigen. **The Journal of Biological Chemistry**,V. 278, N. 12, p. 10041–10047, 2003.

Long, E. K. Murphy, T. C. Leiphon, L. J. Watt, J. Morrow, J. D. Milne, G. L. Howard, J. R. H. Picklo, M. J. Trans-4-hydroxy-2-hexenal is a neurotoxic product of docosahexaenoic (22:6; n-3) acid oxidation. **Journal of Neurochemistry**. v.105, p.714-724, 2008.

Marnett L.J, Riggins JN, West JD. J.Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. **Clin Invest.** v.111, n.5, p.583-93,2003.

Medeiros M H G.Exocyclic DNA Adducts as Biomarkers of Lipid Oxidation and Predictors of Disease. Challenges in Developing Sensitive and Specific Methods for Clinical Studies,**Chem. Res. Toxicol.**, v. 22, n.3, p 419–425, 2009.

Monteoliva, L. Alba,J. P. Differential proteomics: An overview of gel and nongel based approaches. **Briefings functional Genomics and Proteomics.** v.3,p. 220-239, 2004.

Motley WW, Talbot K, Fischbeck KH. GARS axonopathy: not every neuron's cup of tRNA". **Trends in Neurosciences.**v 33, n.2, p. 59–66, 2010.

Mugnol, K.C.U. Ando, R.A. Nagayasu, R.Y. Faljoni-Alario, A. Brochsztain, S. Santos, P. Nascimento, O.R. Nantes, I. L. Spectroscopic, structural, and functional characterization of the alternative low-spin state of horse heart cytochrome c. **Biophysical Journal.** v.94, p. 4066-4077,2008.

Musatov , A. C. A. Carrol, Y C. Liu, G.I Henderson, S.T. Weintraub e N.C. Robinson. Identification of bovine heart cytochrome c oxidase subunits modified by the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal. **Biochemistry.** v.41, n.25, p. 8212-8220, 2002.

Nakashima. D. H. & Sayre, L.M. Amino acid sequence of bovine heart cytochrome c. **Journal of Biological Chemistry.** v.241, n. 5, p.1166, 1966.

Oellerich, S. Wackerbarth, H. Hildebrandt, P. Conformational equilibrium and dynamics of cytochrome c induced by binding of sodium dodecyl sulfate monomers and micelles.

European Biophysics Journal.v.32, p. 699-613, 2003.

Okado-Matsumoto A., Fridovich I. Amyotrophic lateral sclerosis: proposed mechanism.

Proceedings National Academy of Sciences. v.99, p.9010-9013, 2002.

Perez-DiazS, Johnson LA, DeKroon RM, Moreno-Navarrete JM, Alzate O, Fernandez-Real JM, Maeda N, Arbones-Mainar JM.Polymerase I and transcript release factor (PTRF) regulates adipocyte differentiation and determines adipose tissue expandability.**FASEB**

J.v. 28, n.8, p.3769-79, 2014.

RauniyarN, and ProkaiL. Detection and identification of 4-hydroxy-2-nonenal Schiff-base adducts along with products of Michael addition using data dependent neutral loss-driven MS3 acquisition: method evaluation through an *in vitro* study on cytochrome c oxidase Modifications. **Proteomics.** v.9, n.22, p. 5188–5193, 2009.

Reed T T, Pierce W M, Markesbery M, D. ButterfieldA. Proteomic identification of HNE-bound proteins in early Alzheimer disease: Insights into the role of lipid peroxidation in the progression of AD,**Brain Research**,V. 1274, n.5, p. 66-76, 2009.

Satoh A, Nakanishi H, Obaishi H, Wada M, Takahashi K, Satoh K, Hirao K, Nishioka H, Hata Y, Mizoguchi A, Takai Y. Neurabin-II/spinophilin. An actin filament-binding protein with one pdz domain localized at cadherin-based cell-cell adhesion sites.**J BiolChem.** V.273, n.6, p. 3470-5, 1998.

Savayare, A. N. Coatrieux, C. Ingueneau, C. Salvayre, R. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins: potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. **British Journal of Pharmacology**. V. 153, p. 6-20, 2008.

Saydan N, Salicio V, Cappelli-Gotzos B, Gotzos V . Expression of calretinin in human mesothelioma cell lines and cell cycle analysis by flow cytometry". **Anticancer Research**. v.21, 181–8, 2001.

Schaur, R.J. Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 24, p.149–159, 2003.

Schaur, R.J. Siems, W. Bresegen, N. Eckl, P.M. 4-Hydroxy-nonenal – A bioactive lipid peroxidation product. **Biomolecules**. V.5, p.2247-2337, 2015.

Schneider C, Boeglin WE, Yin H, Ste DF, Hachey DL, Porter NA, Brash AR. Synthesis of dihydroperoxides of linoleic and linolenic acids and studies on their transformation to 4-hydroperoxynonenal. **Lipids**. v.40, n.11, p.1155-62. 2005.

Sheehan D. Detection of redox-based modification in two-dimensional electrophoresis proteomic separations. **Biochemistry Biophysical Research Communications**. v.349, n.2, p.455-462, 2006.

Shibata, N. Yamada, S. Uchida, K. Hirano, A. Sakoda, S. Fujimura, H. Sasaki, S. Iwata, M. Toi, S. Kawaguchia, M. Yamamoto, T. Kobayashi, M. Accumulation of protein-bound 4-hydroxy-2-hexenal in spinal cords from patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. **Brain Research**.v. 1019, p. 170-177, 2004.

Shih JY, Lee YC, Yang SC, "Collapsin response mediator protein-1: a novel invasion-suppressor gene". **Clin. Exp. Metastasis**. V.20 n.1, p. 69–76. 2003.

Shoeb M, Ansari NH, Srivastava SK, Ramana KV. 4-Hydroxynonenal in the pathogenesis and progression of human diseases. **Curr Med Chem**. v.21, n.2, p.230-7, 2014.

Sidore, C.; et al. "Genome sequencing elucidates Sardinian genetic architecture and augments association analyses for lipid and blood inflammatory markers". **Nature Genetics**. V.47, p. 1272–1281, 2015.

Sigolo, C.A. Di Mascio, P. Medeiros, M.H. Covalent modification of cytochrome c exposed to trans,trans-2,4-decadienal. **Chemistry Research in Toxicology**. v.8, p. 1099-110, 2007.

Spaulding EL, Sleigh JN, Morelli KH, Pinter MJ, Burgess RW, Seburn KL. Synaptic Deficits at Neuromuscular Junctions in Two Mouse Models of Charcot-Marie-Tooth Type 2d". **The Journal of Neuroscience**. V.36, n.11, p. 3254–67. 2016.

Vikenes K, Andersen KS, Melberg T, et al. "Long-term prognostic value of creatine kinase-myocardial band mass after cardiac surgery in low-risk patients with stable angina. **Cardiology**. V.113, n.2, p. 122–31, 2009.

ObsilT, Ghirlando R, Klein, Ganguly S, Dyda F. "Crystal structure of the 14-3-3zeta:serotonin N-acetyltransferase complex. A role for scaffolding in enzyme regulation". **Cell**. V.105, n.2, p. 257–267, 2001.

Tang, X. Sayre, L.M. Tochtrop, G.P. A mass spectrometric analysis of 4-Hydroxy- 2(E)-Nonenal modification of cytochrome c. **Mass Spectrometry**. v.46, p.290-297, 2011.

Tóth K, Maglóczy Z. "The vulnerability of calretinin-containing hippocampal interneurons to temporal lobe epilepsy." **Front Neuroanat.** V.8, n.100, 2014.

Uchida, K. 4-Hydroxi-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. **Progress in Lipid Research.** v. 42, p.318-343, 2003.

Ullery, J. C & Marnett. L. J. Protein modification by oxidized phospholipids and hydrolytically released lipid electrophiles: Investigating cellular responses. **Biochimica et Biophysica Acta** v.1818, p.2424–2435, 2012.

Uruno A, Yagishita, Y, M. Yamamoto. The Keap1–Nrf2 system and diabetes mellitus **Archives of Biochemistry and Biophysics.** v. 566, p.76–84, 2015.

Valko a, Dieter Leibfritz , Jan Moncol , Mark T.D. Cronin c, Milan Mazur a, Joshua Telser .Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease Marian **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology** n.39, p. 44–84, 2007.

Wakita, C. Honda,K. Shibata,T. Akagawa, M. Uchida, K. A method for detection of 4-hidroxi-2-nonenal adducts in proteins. **Free Radicals in Biology and Medicine.**v. 51, p.1-4, 2011.

Wei Y, Chiang WC, Sumpter R Jr, Mishra P, Levine B. Prohibitin 2 is an inner mitochondrial membrane mitophagy receptor. **Cell.** v.168, n.1-2, p.224-238,2017.

Xie, J. Techritz, S. Haebel, S. Horn, A. Neitzel, H.Klose, J. Schuelke, M. A two-dimensional electrophoretic map of human mitochondrial proteins from immortalized lymphoblastoid cell lines: A prerequisite to study mitochondrial disorders in patients. **Proteomics.** v.5, p.2981-2999, 2005.

Yamada, S. Funada, T. Shibata, N. Kobayashi, M. Kawai, Y. Tatsuda, E. Furuhata, A. Uchida, K. Protein-bound 4-hydroxy-2-hexenal as a marker of oxidized n-3 polyunsaturated fatty acids. **Journal Lipid Research**. v. 45, p.626-634, 2004.

Yin H, Xu L, Porter NA. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. **Chem Rev**.v.111, n.10, p.5944-72, 2011.

Yoneda M, Fujii A, Ito A, Yokoyama H, Nakagawa H, Kuriyama M. High prevalence of serum autoantibodies against the amino terminal of alpha-enolase in Hashimoto's encephalopathy". *Journal of Neuroimmunology*. V.185, n.2, p. 195–200. 2007

Yoo S, van Niekerk EA, Merianda TT, Twiss JL . Dynamics of axonal mRNA transport and implications for peripheral nerve regeneration" **Experimental Neurology**.v. 223, n.1, p. 19–27. 2010.

Yoshino H, kimura A. Investigation of therapeutic effects of edaravone, a free radicalscavenger, on amyotrophic lateral sclerosis (phase II study). **Amyotroph Lateral Scler**. v.7, n.4, p.241-5, 2006.

Zarkovic, N. Cipak, A. Jaganjac, Borovic, S. Zarkovic, K. Pathophysiological relevance of aldehydic protein modification. **Journal of Proteomics**. v.92, p. 239-247, 2013.

Zhong H, Yin H. Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer: Focusing on mitochondria. **Redox Biol**. v. 4, p. 193–199, 2015.

Zhu, X. Tang,X. Zhang ,J. Tochtrop ,G. P. Anderson, V. E. Sayre, L. M. Mass spectrometric evidence for the existence of distinct modifications of different proteins by 2(E),4(E)-Decadienal. **Chemistry Research in Toxicology**. v.23, n.3, p.467-473, 2010.

Súmula curricular

1. Dados Pessoais

Adriana Pereira Domarques de Menezes

Maceió – AL, 19 de junho de 1982

2. Educação

Escola Estadual Coração de Jesus, Maceió – AL, 2000

Universidade federal de Alagoas – AL – 2007 Biologia: Trabalho de Conclusão de Curso. Produção de surfactantes e enzimas lipolíticas por bactérias isoladas de resíduos sólidos de agroindústria sucroalcooleira. 2007.

Orientador: Ana Maria Queijeiro Lopez.

3. Publicações em congressos

1. LÓPEZ, A.M.Q. ; MENEZES, A. P. D. ; GOMES, E.P. ; FERREIRA, L.F.R. . Atividade Biosurfactante de *Corynebacterium* sp isolado de águas residuárias de agroindústria de Alagoas. In: X Reunião Regional Nordeste da SBBq e 1º Simpósio Internacional de Neuroquímica, 2010, Salvador. X Reunião Regional Nordeste da SBBq e 1º Simpósio Internacional de Neuroquímica, 2010.

2. DUARTE, A. W. F. ; VASCONCELOS, M. R. S. ; MENEZES, A. P. D. ; LÓPEZ, A.M.Q. . Mel de meliponíneos e de *A. mellifera* do estado de Alagoas: Composição Química. In: 8º SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos - "Ciência de Alimentos no

mundo globalizado: Novos desafios, Novas perspectivas", 2009, Campinas - São Paulo.

8º SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos - "Ciência de Alimentos no mundo globalizado: Novos desafios, Novas perspectivas", 2009.

3.DUARTE, A. W. F. ; VASCONCELOS, M. R. S. ; **MENEZES, A. P. D.** ; LÓPEZ, A.M.Q. .
Detecção de esporos de Clostridium sp em mel de Apis mellifera e meliponíneos. In: 8º SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos - "Ciência de Alimentos no mundo globalizado: Novos desafios, Novas perspectivas", 2009, Campinas - São Paulo.
8º SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos - "Ciência de Alimentos no mundo globalizado: Novos desafios, Novas perspectivas", 2009.

4.DUARTE, A. W. F. ; VASCONCELOS, M. R. S. ; **MENEZES, A. P. D.** ; LÓPEZ, A.M.Q. .
Atividade antibacteriana e antifúngica de mel de meliponíneos e de Apis mellifera produzidos em alagoas. In: 8º SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos - "Ciência de Alimentos no mundo globalizado: Novos desafios, Novas perspectivas", 2009, Campinas - São Paulo. 8º SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos - "Ciência de Alimentos no mundo globalizado: Novos desafios, Novas perspectivas", 2009.

5.DUARTE, A. W. F. ; VASCONCELOS, M. R. S. ; **MENEZES, A. P. D.** ; LÓPEZ, A.M.Q. .
Diferenciação da atividade antioxidante de mel de abelhas nativas e africanizadas por emprego do dpsh e frap. In: 8º SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos - "Ciência de Alimentos no mundo globalizado: Novos desafios, Novas

perspectivas", 2009, Campinas - São Paulo. 8º SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos - "Ciência de Alimentos no mundo globalizado: Novos desafios, Novas perspectivas", 2009.

6.LÓPEZ, A.M.Q. ; MENEZES, A. P. D. ; REIS, D. A. ; SILVA, K.F.S. . Activity and partial chemical characterization of surfactants of *Corynebacterium* sp and *Bacillus* sp from effluents of agri-industry. In: XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq e XI Congresso da PABMB, 2008, Águas de Lindóia - São Paulo. CDRom da XXXVII Reunião Anual da SBBq e XI Congresso da PABMB., 2008.

7.GOMES, E.P. ; MENEZES, A. P. D. ; REIS, D. A. ; LÓPEZ, A.M.Q. . Produção de Biosurfactantes por Bactérias isoladas de Resíduos de Agroindústria Sucroalcooleira. In: II Workshop Internacional sobre Microbiologia Ambiental. In: II Workshop Internacional sobre Microbiologia Ambiental, 2008, Aracajú - Sergipe. CDRom do II Workshop Internacional sobre Microbiologia Ambiental, 2008.

8.MENEZES, A. P. D.; GOMES, E.P. ; REIS, D. A. ; LÓPEZ, A.M.Q. ; PEROVANO, N.F. . Atividade Antifúngica de Bactérias Produtoras de Biosurfactantes Isoladas de Efluentes Agroindustriais. In: 5º Congresso Brasileiro de Micologia, 2007, Recife. CDRom 5º Congresso Brasileiro de Micologia, 2007.

9.MENEZES, A. P. D.; GOMES, E.P. ; PEROVANO, N.F. ; SILVA, K.F.S. ; LÓPEZ, A.M.Q. . Bactérias Isoladas de Efluente Agroindustrial Promissoras na Produção de Biosurfactantes e Biorremediação. In: XXIV Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasília - DF. <http://www.sbmicrobiologia.org.br/errata.htm>, 2007.

10.MENEZES, A. P. D.; CALADO, T. C. S ; ARAUJO, M. S. L. C ; BARROS, M. L. M. ; CARVALHO, Cícera Betânia de . Arquitetura da toca de *Ucides cordatus* Linnaeus,1763, (Crustacea, Ocypodidae) do complexo estuarino-lagunar Mundaú/Manguaba-Alagoas.. In: XXVI Congresso Brasileiro de Zoologia,, 2006, Londrina-PR. CD ROOM do XXVI Congresso Brasileiro de Zoologia. Londrina: Gráfica Editorial Mídia, 2006. v. XXVI.

11.ARAUJO, M. S. L. C ; MENEZES, A. P. D. ; CALADO, T. C. S . Estrutura Populacional, Ciclo reprodutivo, Sustentabilidade e Gestão dos Crustáceos Decápodos do Genero *Ucides* (Ocypodidae) do Manguezal do Complexo Estuarino-lagunar Mundaú/manguaba (CELMM) em Alagoas. In: III Congresso Acadêmico da UFAL, 2006, Maceió. Maceió , - 2006, 2006.

12.MENEZES, A. P. D.; CALADO, T. C. S ; ARAUJO, M. S. L. C . Estrutura Populacional de *Goniopsis cruentata* (Latreille, 1803) (Decapoda: Grapsidae) do Complexo Estuarino-Lagunar Mundaú/Manguaba do Estado de Alagoas.. In: IV Congresso Brasileiro de Sobre Crustáceos, 2006, Guarapari - Espírito Santo. CD de Resumos do IV CBC, 2006.

13.MENEZES, A. P. D.; ARAUJO, M. S. L. C ; CALADO, T. C. S . Estrutura populacional, ciclo reprodutivo, sustentabilidade e gestão dos crustáceos decápodos do gênero *Goniopsis cruentata* do Manguezal do Complexo estuarino lagunar Mundaú Manguaba do Estado de Alagoas.. In: III Congresso Acadêmico da UFAL, 2006, Maceió. Maceió - 2006, 2006.

4. Artigos aceitos para publicação

1. DUARTE, A. W. F. ; VASCONCELOS, M. R. S. ; **MENEZES, A. P. D.** ; SILVA, S. C. ; ODA-SOUZA, M. ; LÓPEZ, A.M.Q. . COMPOSITION / ANTIOXIDANT ACTIVITY OF HONEYS FROM AFRICANIZED AND STINGLESS BEES IN ALAGOAS (BRAZIL): A MULTIVARIATE ANALYSIS. Food Chemistry, 2011.

5. Apresentações de Trabalho

1. **MENEZES, A. P. D.**; DUARTE, A. W. F. ; VASCONCELOS, M. R. S. ; GOMES, E.P. ; LÓPEZ, A.M.Q. . Total Protein Content of Honey of Africanized and Native Bees from the State of Alagoas.. 2009. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

2. GOMES, E.P. ; VASCONCELOS, M. R. S. ; **MENEZES, A. P. D.** ; DUARTE, A. W. F. ; LÓPEZ, A.M.Q. . Total Protein Content of Pollen from Hives of *Apis mellifera* from the Backlands, Semi-Arid and Coastline from the State of the Alagoas.. 2009. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

3. DUARTE, A. W. F. ; **MENEZES, A. P. D.** ; VASCONCELOS, M. R. S. ; GOMES, E.P. ; LÓPEZ, A.M.Q. . The Proline Content of Honeys from Africanized and Native Bees from the State of Alagoas. 2009. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

4. DUARTE, A. W. F. ; VASCONCELOS, M. R. S. ; **MENEZES, A. P. D.** ; GOMES, E.P. ; LÓPEZ, A.M.Q. . Total Contents of Phenols and Flavonoids and Antioxidant Activity of Honeys of Africanized and Native Bees from Alagoas.. 2009. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

5.VASCONCELOS, M. R. S. ; GOMES, E.P. ; DUARTE, A. W. F. ; **MENEZES, A. P. D.** ; LÓPEZ, A.M.Q. . Quantitative and Qualitative Analysis of Total Phenols and Antioxidant Activity of Ethanolic Extracts of Pollen of *Apis mellifera* from the State of Alagoas. 2009. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

6.GOMES, E.P. ; **MENEZES, A. P. D.** ; LÓPEZ, A.M.Q. . Influence of Nitrogen Source on the Induction of Biosurfactant Production by *Corynebacterium* sp Isolated from Agro-Industrial Sewage.. 2008. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Prêmios

2010 Menção Honrosa SBBq Regional, X Reunião Regional Nordeste da SBBq e 1º Simpósio Internacional de Neuroquímica.

2009 Excelência Acadêmica no VI Congresso Acadêmico da UFAL, Universidade Federal de Alagoas.