

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

Lívea Fujita Barbosa

**Danos em DNA promovidos pela enzima**

**Cu,Zn-Superóxido Dismutase.**

**Implicações para a apoptose em um modelo celular de**

**Esclerose Lateral Amiotrófica.**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:  
03/10/2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Lívea Fujita Barbosa

**Danos em DNA promovidos pela enzima**

**Cu,Zn-Superóxido Dismutase.**

**Implicações para a apoptose em um modelo celular de**

**Esclerose Lateral Amiotrófica.**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da*

*Universidade de São Paulo para obtenção do*

*Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)*

*Orientadora: Profa. Dra. Marisa Helena Gennari de Medeiros*

São Paulo  
2008

Lívea Fujita Barbosa

**Danos em DNA promovidos pela enzima Cu,Zn-Superóxido Dismutase. Implicações para a apoptose em um modelo celular de 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: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_  
Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_  
Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_  
Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_  
Instituição: \_\_\_\_\_  
Assinatura: \_\_\_\_\_

*Dedico este trabalho ao Dr. Kurt Klotzel (in memoriam), meu tio que, sem saber, me iniciou e me inspirou na carreira de cientista.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fapesp pela bolsa de doutorado e pelos projetos temáticos do grupo, tornando possível meu trabalho dentro e fora do laboratório. Agradeço também ao apoio financeiro do CNPq (Instituto do Milênio Redoxoma), Pró-reitoria de Pesquisa da USP, FINEP, Ministério de saúde da Itália (PF ‘Meccanismi molecolari e cellulari delle malattie neurodegenerative del sistema motorio’) e John Simon Guggenheim Memorial Foundation.

Agradeço à USP pela riqueza de pensamentos, possibilidades e portas abertas - resultado da união de pessoas tão diferentes em um único lugar. Agradeço ao Instituto de Química, pelo acolhimento durante estes nove anos, e agradeço a todos os professores, funcionários e colegas que participaram da minha formação.

Agradeço à profa. Dra. Marisa pela orientação rica e segura, composta por acompanhamento muito próximo e preocupação constante com meu desenvolvimento científico e pessoal, sempre disponível para discutir idéias, me dando liberdade e suporte.

Agradeço aos amigos Osmar Gomes, Camila Garcia, Dr. Carlos Alexandre Sigolo, Edson Gomes, Rafael Monteiro, Dra. Cláudia Brochini, Florêncio Freitas e Angélica Sanchez, por tornar os dias produtivos e divertidos no laboratório, e à Dra. Sabrina Marques e à profa. Dra. Ana Paula Loreiro, pelo auxílio na iniciação de minha carreira científica.

Agradeço ao prof. Dr. Paolo Di Mascio, pela co-orientação e pelas inúmeras sugestões. E agradeço aos amigos Fernanda Prado, Izaura Toma, Agda Bertolucci, Dra. Graziela Ronsein, Dr. Maurício Oliveira, José Pedro Angeli, Flávia Motta, Dra. Miriam Uemi, Dra. Janice Onuki e profa. Dra. Sayuri Myamoto, pela valiosa ajuda.

Agradeço à profa. Dra. Ohara Augusto e à profa. Dra. Alicia Kowaltowsky, bem como aos alunos e técnicos de seus laboratórios, pela intensa colaboração. Agradeço à minha grande amiga e colaboradora Fernanda Cerqueira, por tantos momentos, científicos ou não.

Agradeço à profa. Dra. Mari Sogayar, ao prof. Dr. Mauro Bertotti, ao Dr. Antero Macedo, ao Dr. Marcos Demasi e ao Dr. Thiago Paixão, pelas produtivas colaborações.

Agradeço à profa. Dra. Maria Teresa Carri (Universitá di Roma Tor Vergata), por ter gentilmente cedido os neuroblastomas utilizados em grande parte deste trabalho, e pela produtiva colaboração.

Agradeço aos amigos uruguaiois prof. Dr. Luis Barbeito (Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable) e prof. Gerardo Sueta (Universidad de la República), pelas valiosas sugestões.

Agradeço à colaboração de todos os professores e colegas do grupo Redoxoma.

Agradeço à minha dança e a todas as queridas pessoas que comigo dançaram ao longo da vida, ajudando a construir meu equilíbrio e minha felicidade.

Agradeço às minhas amigas de infância, que sempre me admiraram e me apoiaram.

Agradeço à minha Tia Inha e aos meus padrinhos Ricardo e Ana Lúcia, pelo apoio e incentivo à minha carreira. Agradeço aos meus avós Mema, Mimi, Chico e Akio, que deram início a toda esta história, com muito amor e dedicação.

Agradeço ao meu pai Barbosa e à minha mãe Ancila, meus preciosos espelhos de tranqüilidade, amor, trabalho e família, que tornaram tudo isso possível, e fizeram da minha vida sempre um caminho claro, seguro, aconchegante, ilimitado e muito feliz. Agradeço ao meu querido irmão Sávio, que sempre me guiou e me acompanhou nesta jornada, e à Bruna, que mais recentemente se juntou a nós.

Agradeço ao meu grande amor Paulo, por ter me raptado para seu mundo, e me convidado a construir uma nova e linda vida juntos. Agradeço ao queridos Paulo Gastão, Maria Angélica, Ana Carolina, Patrícia e Paulo Renato pelo enorme apoio neste momento de transição.

“O homem é uma corda, atada entre o animal e o além-do-homem – uma corda sobre um abismo. Perigosa travessia, perigoso a-caminho, perigoso olhar-para-trás, perigoso arrepiar-se e parar. O que é grande no homem, é que ele é uma ponte e não um fim: o que pode ser amado no homem, é que ele é um passar e um sucumbir.”

*Friedrich Nietzsche*  
(Assim falou Zaratustra – 1883)



## RESUMO

(Barbosa, L.F.) **Danos em DNA promovidos pela enzima Cu,Zn-Superóxido Dismutase. Implicações para a apoptose em um modelo celular de Esclerose Lateral Amiotrófica.** 2008. 132p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Mutações na enzima Cu,Zn-superóxido dismutase (SOD1) estão associadas a casos familiares de Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), uma doença neurodegenerativa motora fatal. Entretanto, a toxicidade das SOD1s mutantes não está totalmente compreendida. Sabe-se que o desenvolvimento da doença está associado ao acúmulo de lesões oxidativas em biomoléculas, mas o papel da SOD1 neste processo não está claro. Estudos com sistemas modelo são, ainda, necessários para desvendar os mecanismos envolvidos. Para contribuir na compreensão dos mecanismos de danos em DNA promovidos pela SOD1, foram realizados estudos *in vitro* com SOD1/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, e estudos com neuroblastomas em cultura transfectados com SOD1 mutante G93A, característica de ELA. Através da quantificação de quebras em DNA plasmidial e dos níveis de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo) e 1,N<sup>2</sup>-eteno-2'-desoxiguanosina (1,N<sup>2</sup>-εdGuo) em DNA de timo de bezerro, concluiu-se que o cobre liberado da SOD1 tem um papel central na formação de lesões no DNA promovidas pela SOD1 na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e que o bicarbonato pode modular a reatividade do cobre liberado. Níveis aumentados de quebras no DNA, 8-oxodGuo e 1,N<sup>2</sup>-εdGuo foram encontrados nos neuroblastomas transfectados com SOD1 G93A. Maior atividade de p53 foi também observada nestas células, indicando que o acúmulo de lesões no DNA pode desencadear o processo de apoptose neste modelo celular de ELA. Observou-se que a SOD1 pode estar associada à cromatina, e que a SOD1 G93A possui maior afinidade pelo DNA e maior atividade peroxidásica no núcleo. Estes resultados indicam que as lesões no DNA observadas no modelo celular de ELA podem ser diretamente promovidas pela SOD1 mutante. **Palavras-chave:** Esclerose Lateral Amiotrófica; SOD1; p53; danos no DNA.

## ABSTRACT

(Barbosa, L.F.) **DNA damage promoted by Cu,Zn-Superoxide Dismutase. Implications to apoptosis in a cellular model of Amyotrophic Lateral Sclerosis.** 2008. 132p. PhD Thesis – Graduate. Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Mutations in the gene encoding Cu,Zn-superoxide dismutase (SOD1) have been linked to familial Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS), a fatal motor neuron disease. However, the toxicity of mutant SOD1s was not completely understood. It is known that the development of the disease is associated with oxidative damage to biomolecules, but the role of SOD1 in this process is not clear. Model studies are still necessary to reveal the mechanisms involved. To understand the mechanism of DNA damage promoted by SOD1, *in vitro* studies with SOD1/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, and studies with neuroblastoma cells transfected with the G93A ALS-mutant SOD1, were performed. Through the quantification of strand breaks in plasmid DNA and the quantification of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo) and 1,N<sup>2</sup>-etheno-2'-deoxyguanosine (1,N<sup>2</sup>-εdGuo) levels in calf thymus DNA, it was concluded that copper liberated from SOD1 has a central role in DNA damage promoted by SOD1 in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and that bicarbonate can modulate the reactivity of released copper. Increased levels of DNA strand breaks, 8-oxodGuo and 1,N<sup>2</sup>-εdGuo were found in neuroblastoma cells transfected with G93A SOD1. Increased p53 activity was also observed in these cells, indicating that accumulation of DNA damage can lead to apoptosis in this ALS cellular model. Western blot analysis showed that G93A SOD1 is present in the nucleus, being associated to the DNA. Nuclear G93A SOD1 has identical superoxide dismutase-activity but displays increased peroxidase activity, when compared to wild-type. These results indicate that DNA damage observed in this ALS cellular model may be directly promoted by mutant SOD1. **Keywords:** Amyotrophic Lateral Sclerosis; SOD1; p53; DNA damage.

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

$^1\text{H}$  NMR: ressonância magnética nuclear de próton

$^{13}\text{C}$  NMR: ressonância magnética nuclear de carbono 13

1, $N^2$ - $\epsilon$ dGuo: 1, $N^2$ -eteno-2'-desoxiguanosina

[ $^{15}\text{N}_5$ ]-1, $N^2$ - $\epsilon$ dGuo: 1, $N^2$ - $\epsilon$ dGuo com os 5 N de massa 15

8-oxodGuo: 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina

A4V: mutação da alanina 4 por valina

ADP: adenosina di-fosfato

ANOVA: análise de variância

Apaf-1: fator de ativação da protease apoptótica

APE1: endonuclease apurínica 1

ATM: ataxia telangiectasia mutada

*AtMMH*: homólogo MutM da *Arabidopsis thaliana*

ATP: adenosina tri-fosfato

Bax: proteína X associada a Bcl-2

Bcl-2: derivado de célula B de linfoma 2

Bak: homólogo de Bcl-2 antagonista/*killer*

BHT: hidroxitolueno butilado

CTé: cadeia de transporte de elétrons mitocondrial

DCF: 2',7'-diclorofluoresceína diacetato

DDE: *trans,trans*-2,4-decadienal

DEMEM/HAM F12: meio Eagles modificado por Dulbeco com nutriente F12 de Ham

DHA: dihidroascorbato

DHR: dihidrorodamina

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucléico

DNase: desoxirribonuclease

DNA-PK: DNA fosfoquinase

DTPA: ácido dietilenotriaminopentaacético

EAAT-2: transportador de aminoácido excitatório 2

EDTA: ácido etilenodiaminotetraacético

EGTA: ácido etilenobis(oxietilenonitrilo)tetraacético

ELA: Esclerose Lateral Amiotrófica

ERNs: espécies reativas de nitrogênio

EROs: espécies reativas de oxigênio

G→T: transversão de guanina por timina

G85R: mutação da glicina 85 por arginina

G93A: mutação da glicina 93 por alanina

G93A: neuroblastoma expressando constitutivamente SOD1 humana mutante G93A

GC-MS: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa

Glu: glutamato

GLUT-1: transportador de glicose 1

GPx: glutathiona peroxidase

GR: glutathiona redutase

GSH: glutathiona reduzida

GSSG: glutathiona oxidada

HNE: 4-hidroxi-2-nonenal

HPLC: cromatografia líquida de alta performance

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

ImH: imidazol

L38V: mutação da leucina 38 por valina

L<sup>•</sup>: radical de lipídio

LOO<sup>•</sup>: radical de peróxido de lipídio

LOOH: hidroperóxidos de lipídio

MDA: malondialdeído

Mdm-2: *murine double minute 2*

MEM: meio Eagle modificado

MOPS: ácido 3-morfolinopropanosulfônico

MPO: mieloperoxidases

MRM: monitoramento de reação múltipla

MTH1: homólogo humano de MutT 1

MTT: 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

NBT: nitro blue tetrazolium

NF-κB: fator nuclear κB

NOS: NO sintases

OC: forma circular aberta

OGG1: DNA glicosilase da 8-oxoguanina

PARP-1: poli(ADP-ribose) polimerase-1

PBS: tampão fosfato salino

pH: potencial de hidrogênio

Pipes: ácido 1,4-piperazinadietanosulfônico

PMSF: fenilmetilsulfonil fluoreto

POBN:  $\alpha$ -(4-piridil 1-óxido)-N-*tert*-butilnitrona

Prx: peroxirredoxinas

RE: retículo endoplasmático

RNA: ácido ribonucléico

RNase: ribonuclease

SC: forma circular super enovelada

SDS: dodessulfato de sódio

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

SFB: soro fetal bovino

SH: neuroblastoma SH-SY5Y não transformado

SNC: sistema nervoso central

SOD: superóxido dismutase

SOD1: Cu,Zn-superóxido dismutase

SVCT2: transportador de vitamina C dependente de sódio 2

TBA: ácido tiobarbitúrico

TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletenodiamida

TNF $\alpha$ : fator de necrose tumoral  $\alpha$

Triton: octilfenoxipolietoxietanol

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

Trx: tiorredoxina

TrxR: tiorredoxina redutase

Tween: polioxietileno sorbitan monooleato

VAMP: proteína de membrana associada à vesícula

UV: ultra-violeta

WT: neuroblastoma expressando constitutivamente SOD1 humana nativa

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>17</b>
1.1. Espécies oxidantes.....	18
1.2. Lesões em biomoléculas.....	20
1.2.1 Lesão em proteínas.....	21
1.2.2 Lesão em lipídios.....	21
1.2.3 Lesão em DNA.....	24
1.3 Defesas antioxidantes.....	27
1.4 Morte celular induzida por estresse oxidativo.....	30
1.5 O risco de lesões oxidativas no sistema nervoso central.....	33
1.6 Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA).....	37
1.6.1 Cu,Zn-SOD e ELA.....	39
1.6.2 Atividade peroxidásica da SOD1 e ELA.....	43
1.6.3 Apoptose de neurônios motores via ativação de p53 na patologia ELA.....	45
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>46</b>
<b>3. Materiais e métodos .....</b>	<b>47</b>
3.1. Materiais e equipamentos.....	47
3.2. Métodos.....	48
3.2.1 Eliminação de metais contaminantes da SOD1 bovina.....	48
3.2.2 Liberação do cobre do sítio ativo da SOD1.....	48
3.2.3 Determinação da atividade da SOD1 bovina.....	49
3.2.4 Purificação do plasmídeo pBlueScript de <i>E. coli</i> DH10B.....	49
3.2.5 Incubação de pBlueScript com SOD1 / H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	50
3.2.6 Incubações de DNA com SOD1 / H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> / batocuproína.....	52
3.2.7 Precipitação do DNA.....	52
3.2.8 Hidrólise do DNA.....	52

3.2.9 Determinação de 8-oxodGuo.....	53
3.2.10 Síntese dos padrões 1,N <sup>2</sup> - <i>ed</i> Guo e [ <sup>15</sup> N <sub>5</sub> ]1,N <sup>2</sup> - <i>ed</i> Guo.....	53
3.2.11 Determinação de 1,N <sup>2</sup> - <i>ed</i> Guo.....	54
3.2.12 Cultura de neuroblastomas humanos.....	56
3.2.13 Contagem de células em hemocitômetro.....	57
3.2.14 Determinação da viabilidade celular após tratamento com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	58
3.2.15 Tratamento dos neuroblastomas com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> para extração de DNA.....	58
3.2.16 Extração de DNA dos neuroblastomas pelo método caotrópico.....	59
3.2.17 Tratamento dos neuroblastomas para determinação da peroxidação lipídica.....	60
3.2.18 Determinação do nível de peroxidação lipídica dos neuroblastomas.....	60
3.2.19 Detecção e quantificação do aduto MDA-TBA.....	61
3.2.20 Estudo da fragmentação do DNA dos neuroblastomas (Ensaio Cometa).....	61
3.2.21 Transfecção transitória dos neuroblastomas para análise da atividade de p53 através de ensaios de atividade dos genes repórter luciferase e renilla luciferase.....	63
3.2.22 Isolamento de proteínas dos núcleos das células SH-SY5Y.....	64
3.2.23 Dosagem de Proteínas.....	66
3.2.24 Eletroforese em gel de acrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE).....	66
3.2.25 Western Blot das proteínas do núcleo das células SH-SY5Y.....	67
3.2.26 Determinação da atividade SOD1 dos extratos celulares em gel de acrilamida.....	68
3.2.27 Determinação da atividade SOD1 dos extratos celulares em espectrofotômetro.....	69
3.2.28 Determinação da atividade peroxidásica da SOD1 dos extratos celulares em espectrofotômetro.....	70
3.2.29 Determinação do consumo de ascorbato e da concentração intracelular de ascorbato das células SH-SY5Y utilizando microeletrodo modificado com filme de óxido de rutênio hexacianoferrato.....	71



3.2.30 Análises estatísticas.....	72
<b>4. Resultados .....</b>	<b>73</b>
4.1 Estudos <i>in vitro</i> com SOD1 bovina.....	73
4.1.1 Eliminação de metais contaminantes da SOD1 bovina.....	73
4.1.2 Quebras no DNA plasmidial promovidas pelo sistema SOD1/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	73
4.1.3 Formação de 8-oxodGuo em DNA promovida pelo sistema SOD1/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	75
4.1.4 Formação de 1,N <sup>2</sup> - $\epsilon$ dGuo em DNA promovida pelo sistema SOD1/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	77
4.1.5 Efeito do bicarbonato nos danos em DNA promovidos pelo sistema SOD1/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	78
4.1.6 Liberação de cobre do sítio ativo da SOD1 e inativação da enzima: efeito da concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e do tempo de incubação.....	83
4.1.7 Liberação de cobre do sítio ativo da SOD1 e inativação da enzima: efeito do bicarbonato.....	86
4.2 Estudos com modelo celular de Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA).....	89
4.2.1 Viabilidade celular dos neuroblastomas SH-SY5Y.....	89
4.2.2 Lesão em DNA e peroxidação lipídica nos neuroblastomas SH-SY5Y.....	90
4.2.3 Atividade de p53 nos neuroblastomas SH-SY5Y.....	94
4.2.4 SOD1 no núcleo dos neuroblastomas: proteína livre ou associada à cromatina.....	96
4.2.5 Atividade superóxido dismutásica e atividade peroxidásica da SOD1 no núcleo dos neuroblastomas.....	97
4.2.6 Determinação do consumo de ascorbato e da concentração intracelular de ascorbato nas células SH-SY5Y utilizando microeletrodo modificado com filme de óxido de rutênio hexacianoferrato.....	100
<b>5. Discussão.....</b>	<b>105</b>
5.1 Estudos <i>in vitro</i> com SOD1 bovina.....	105
5.2 Estudos com modelo celular de Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA).....	108

<b>6. Conclusões .....</b>	<b>112</b>
<b>7. Considerações finais e perspectivas.....</b>	<b>114</b>
<b>8. Referências.....</b>	<b>115</b>
<b>Lista de Anexos.....</b>	<b>132</b>

## 1. Introdução

Devido ao aumento da perspectiva de vida da população, existe um crescente interesse no estudo de doenças neurodegenerativas, como Alzheimer, Parkinson, Huntington e Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA). Existem diferentes fatores genéticos de pré-disposição e vulnerabilidade regional à morte neuronal em cada uma dessas doenças: mutações na  $\alpha$ -sinucleína atingindo neurônios dopaminérgicos da *substantia nigra* em Parkinson; proteína precursora de  $\beta$ -amilóide mutante prejudicando neurônios colinérgicos do córtex e hipocampo em Alzheimer; repetições excessivas de glutamina na proteína huntingtina comprometendo neurônios estriatais em Huntington; e mutações na Cu,Zn-superóxido dismutase relacionadas a neurônios motores e células da glia em ELA (Sayre, Perry *et al.*, 2008). Apesar dessas diferenças, acredita-se que o mecanismo de morte dos neurônios é muito similar em todas as doenças neurodegenerativas, envolvendo disfunções mitocondriais, ativação das células da glia e modificação e agregação de proteínas específicas. Um ciclo vicioso é gerado e acaba por desencadear a morte celular, sem ser possível definir causas e consequências. O estresse oxidativo representa um mecanismo unificador de todos esses processos, já que espécies oxidantes podem desencadeá-los diretamente (Sayre, Perry *et al.*, 2008).

O estresse oxidativo é definido como a situação na qual a formação de espécies oxidantes excede significativamente a capacidade de defesa antioxidante e de reparo do organismo, tendo como consequência o acúmulo de danos a biomoléculas (DNA, lipídios, proteínas). Estes danos, se não reparados, acabam comprometendo o funcionamento da célula acarretando morte por apoptose ou necrose (Sies, 1991). Os neurônios são altamente propensos a situações de estresse oxidativo. Alguns trabalhos relataram níveis alterados da expressão de enzimas antioxidantes nos tecidos de pacientes de Alzheimer, Parkinson e ELA (Lovell, Xie, Gabbita *et al.*, 2000; Malaspina, Kaushik *et al.*, 2001; Basso, Giraud *et al.*, 2004). Além

disso, também foram detectados níveis aumentados de marcadores de lesões oxidativas em DNA, lipídios e proteínas (Sayre, Perry *et al.*, 2008), evidenciando que espécies oxidantes contribuem para a patologia de doenças neurodegenerativas.

### 1.1 Espécies oxidantes

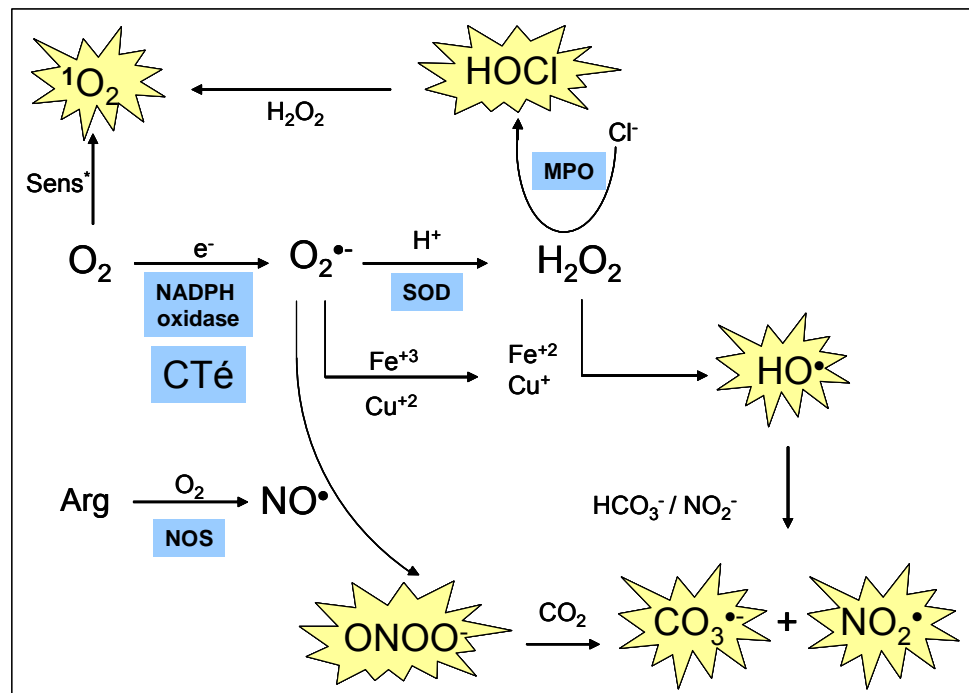
Apesar do oxigênio molecular ser essencial para a obtenção de energia pelos organismos aeróbicos, a ele também está associada a geração de espécies oxidantes potencialmente tóxicas para os organismos vivos. A reatividade dessas espécies varia muito, mas algumas são reativas o suficiente para provocar lesões em biomoléculas como o DNA, lipídios e proteínas. Entre as espécies oxidantes, também conhecidas como espécies reativas de oxigênio (ROS, em inglês) incluem-se, o íon radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o radical hidroxila ( $HO^{\bullet}$ ), o radical carbonato ( $CO_3^{\bullet-}$ ), os compostos carbonílicos tripletes, o oxigênio eletronicamente excitado ao estado singlete ( $^1O_2$ ), o óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) e o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (Halliwell e Gutteridge, 1999).

A cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (CTé) desempenha um papel central na produção de energia em organismos aeróbicos, e consome mais de 90% do oxigênio obtido pela respiração. Em condições basais, cerca de 1% deste oxigênio é convertido em radical superóxido pela semi-ubiquinona, e esse nível de  $O_2^{\bullet-}$  pode aumentar em condições patológicas gerando estresse oxidativo (Finkel e Holbrook, 2000). O  $O_2^{\bullet-}$  também pode ser formado pela enzima NADPH oxidase, durante a atividade de células do sistema imune (Pryor, 1986). A produção de  $O_2^{\bullet-}$  leva à geração de  $H_2O_2$  (através da dismutação espontânea ou catalisada pela superóxido dismutase) (Mccord e Fridovich, 1969), e  $ONOO^-$  (através da reação do  $O_2^{\bullet-}$  com  $NO^{\bullet}$ ) (Koppenol, Moreno *et al.*, 1992). Níveis elevados de  $H_2O_2$  podem liberar íons de ferro de heme proteínas, como hemoglobina e citocromos. Ferro (III) e cobre

(II) podem ser reduzidos pelo  $O_2^{\bullet-}$  a Fe(II) e Cu(I), os quais reduzem  $H_2O_2$  a  $HO^{\bullet}$  (reação de Fenton e reação de Haber-Weiss) (Halliwell e Gutteridge, 1999). As células inflamatórias também aumentam a toxicidade do  $H_2O_2$  através de mieloperoxidases (MPO) produzindo HOCl (Harrison e Schultz, 1976). O  $HO^{\bullet}$  é um dos radicais mais reativos encontrados *in vivo*. Ele é capaz de oxidar carboidratos, lipídios, proteínas e DNA (Pryor, 1986). O óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) é um radical pouco reativo, essencial para a vasoregulação e neurotransmissão, formado pelas enzimas NO sintases (NOS). Em excesso,  $NO^{\bullet}$  pode inibir a citocromo oxidase, levando ao aumento de vazamento de elétrons e formação de superóxido. A formação do  $ONOO^-$  a partir dos radicais  $O_2^{\bullet-}$  e  $NO^{\bullet}$  ocorre no limite difusional (Koppenol, Moreno *et al.*, 1992). Em pHs fisiológicos, o  $ONOO^-$  pode reagir diretamente com diversas biomoléculas, ou através dos seus produtos de decomposição, produzidos por clivagem homolítica da forma protonada ou pela reação com o  $CO_2$ , presente em concentrações de 1-2 mM em fluidos biológicos. Na presença de  $CO_2$ , o  $ONOO^-$  se decompõem formando 35% de  $NO_2^{\bullet}$  e  $CO_3^{\bullet-}$ . O  $CO_2$  pode então competir com os alvos biológicos do  $ONOO^-$ , inibindo suas oxidações por dois elétrons. Uma série de biomoléculas são então oxidadas pelo  $NO_2^{\bullet}$  e  $CO_3^{\bullet-}$  pela transferência de um elétron, com constantes de segunda ordem na faixa de  $10^5$ - $10^8$   $M^{-1}.s^{-1}$ . A reação de  $HO^{\bullet}$  com nitrito ou bicarbonato também pode gerar  $NO_2^{\bullet}$  e  $CO_3^{\bullet-}$ , respectivamente (Augusto, Bonini *et al.*, 2002) (**figura 1.1**).

A formação dessas espécies pode preencher funções biológicas importantes como no caso do combate a microorganismos invasores e controle da pressão sanguínea. É importante ressaltar que algumas das interações entre essas espécies reativas estão sendo reconhecidas como parte de segmentos de cascatas de transdução de sinal. Por exemplo, o  $H_2O_2$  atua como segundo mensageiro na ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (Sen, Sies *et al.*, 2000) em algumas linhagens celulares, e o  $NO^{\bullet}$  é quase um sinalizador ubíquo nos tecidos humanos (Hobbs, Higgs *et al.*, 1999). Por outro lado, devido a sua reatividade, tais espécies podem

também acarretar danos em biomoléculas e estruturas celulares, fenômenos associados a eventos patológicos que podem estar envolvidos nos mecanismos de diversas doenças (Halliwell, 2001).



**Figura 1.1:** Mecanismo de formação de espécies oxidantes.

## 1.2 Lesões em biomoléculas

Existe um grande esforço na identificação dos mecanismos de reação de ROS com biomoléculas e no entendimento das interações entre essas espécies em células, que podem sinalizar eventos como apoptose e regulação gênica. Os avanços na compreensão dos mecanismos de danos oxidativos em biomoléculas têm identificado diversos novos biomarcadores, como nitração em proteínas, oxidação de ácidos graxos e adutos de DNA. Esses marcadores têm sido utilizados para associar processos patológicos com a ocorrência de estresse oxidativo.

### 1.2.1 Lesão em proteínas

ROS atacam a ligação peptídica, resultando na fragmentação da proteína e formação de carbonilas protéicas. Além disso, oxidam resíduos de aminoácidos, podendo resultar em modificações estruturais e funcionais da proteína. O radical hidroxila pode atacar resíduos de tirosina, triptofano, fenilalanina e histidina, gerando uma série de produtos oxidados (Halliwell e Gutteridge, 1999). Átomos de H podem ser abstraídos do carbono  $\alpha$  da cadeia peptídica ou da cadeia lateral dos aminoácidos pelos radicais hidroxila e carbonato, formando radicais que podem ser sequestrados pelo  $O_2$  (Dean, Fu *et al.*, 1997). Reações cruzadas entre radicais de lipídios e radicais de proteína também podem acontecer, levando à formação de agregados protéicos (Sayre, Smith *et al.*, 2001). Átomos de enxofre em resíduos de cisteína e metionina são facilmente oxidados a ligações dissulfeto cruzadas ou até sulfonatos, acarretando sérias conseqüências funcionais (Stadtman, 2001). A reação do  $ONOO^-$  com tirosina resulta na formação de 3-nitrotirosina, um marcador largamente utilizado para caracterizar situações de estresse oxidativo. A nitração de fenilalanina e triptofano também pode ocorrer (Augusto, Bonini *et al.*, 2002). Produtos finais da peroxidação lipídica também podem danificar proteínas (West e Marnett, 2006). Proteínas modificadas podem ser reconhecidas como “estranhas” pelo sistema imune, disparando a formação de anticorpos e uma resposta inflamatória, como na artrite reumatóide (Halliwell, 1995).

### 1.2.2 Lesão em lipídios

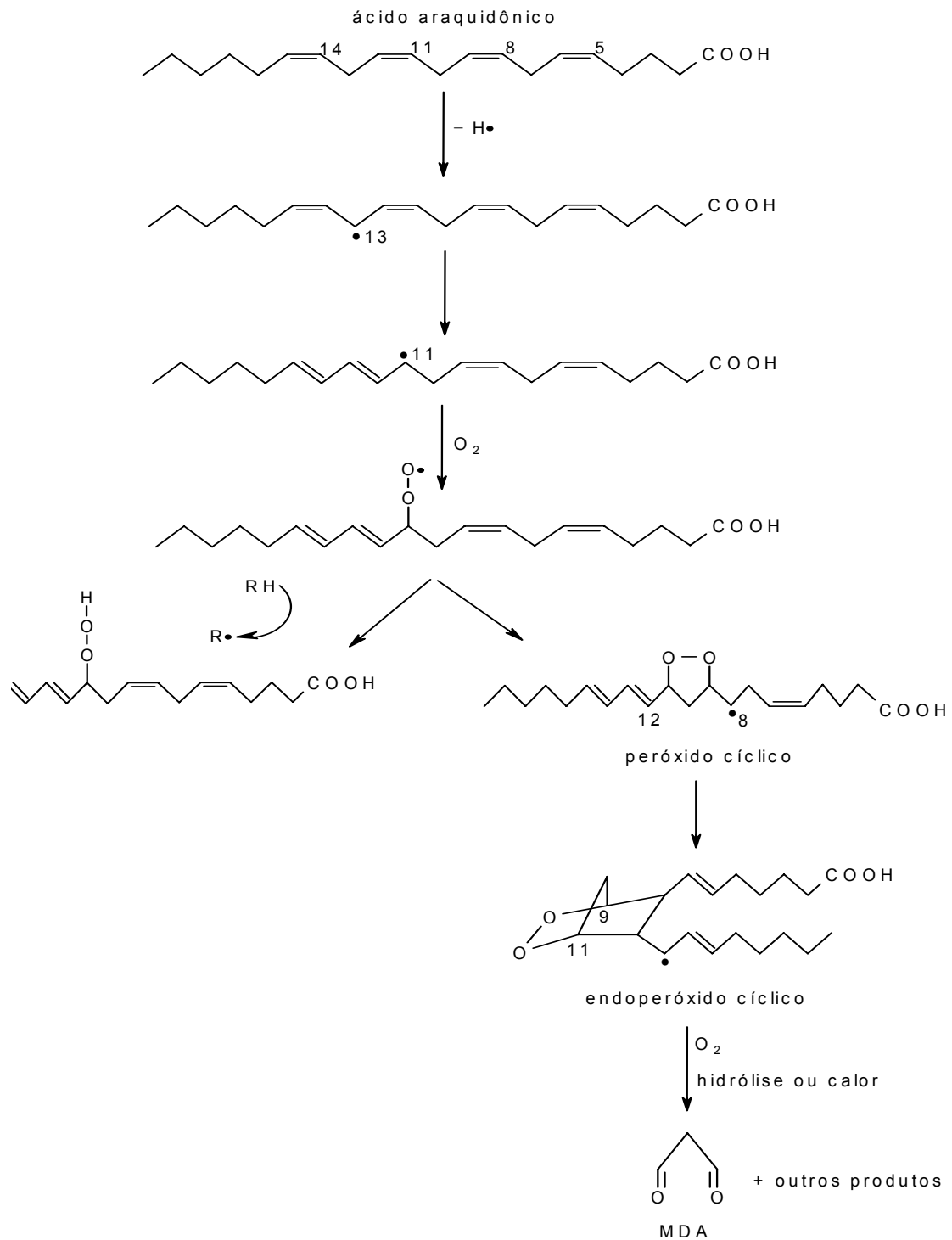
A oxidação de ácidos graxos presentes nas membranas é uma reação em cadeia iniciada pela abstração de um H bis-alílico de ácidos graxos poliinsaturados (ácido linoléico, ácido araquidônico e ácido docosahexaenóico) promovida, por exemplo, por radicais  $HO^\bullet$ ,  $HO_2^\bullet$ ,  $NO_2^\bullet$ ,  $RO^\bullet$ ,  $RO_2^\bullet$  (Pryor e Lightsey, 1981; Aikens e Dix, 1991). Após a abstração do átomo de hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado (L), forma-se um radical lipídico centrado

no carbono ( $L^\bullet$ ), o qual é estabilizado por um rearranjo molecular, adquirindo a estrutura de dieno conjugado. A adição extremamente rápida de uma molécula de oxigênio ao radical lipídico leva à formação do radical peroxila ( $LOO^\bullet$ ). Este é capaz de reagir com outro ácido graxo poliinsaturado, iniciando uma nova cadeia de oxidação a partir da formação de outro radical lipídico ( $L^\bullet$ ) (fase de propagação). O radical  $LOO^\bullet$  se combina com o átomo de hidrogênio abstraído e forma um hidroperóxido lipídico ( $LOOH$ ), os quais sofrem modificações químicas originando aldeídos, cetonas, epóxidos altamente reativos, como malondialdeído (MDA), 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) e *trans,trans*-2,4-decadienal (DDE) (**Figura 1.2**).

Por serem mais estáveis do que os radicais livres que iniciaram o processo e os radicais lipídicos formados durante a fase de propagação, estes aldeídos podem atingir pontos distantes do local em que se formaram (Vaca, Wilhelm *et al.*, 1988) e reagir com as bases do DNA (formando adutos exocíclicos) e com resíduos de cisteína (via adição de Michael) e lisina (via formação de base de Schiff) presentes em proteínas. A detoxificação destes aldeídos é realizada, principalmente, pela conjugação com glutathione e subsequente excreção do aduto (West e Marnett, 2006).

A formação de ligações cruzadas por reações de terminação radical-radical entre lipídio-lipídio e lipídio-proteína, bem como o encurtamento das cadeias lipídicas por processos degradativos levam a um aumento da rigidez das membranas celulares, o que compromete as suas funções.





**Figura 1.2:** Reações envolvidas na peroxidação lipídica: abstração de um H alílico, formação do radical peroxila que pode abstrair um H de uma cadeia vizinha (gerando um peróxido de lipídio) ou atacar a dupla ligação na mesma cadeia (gerando um radical peróxido cíclico) que pode se decompor a aldeídos reativos, como o MDA.

### 1.2.3 Lesão em DNA

A exposição de DNA a oxidantes e compostos eletrofilicos endógenos ou exógenos leva à formação de diversos tipos de lesões (Martinez, Loureiro *et al.*, 2003). Essas lesões podem resultar de ataque às bases nitrogenadas, aos resíduos de ribose ou à ligação fosfodiester (Cadet, Delatour *et al.*, 1999). As conseqüências de danos no DNA têm sido analisadas *in vitro* utilizando-se experimentos de mutagenicidade em bactérias e células de mamífero (Singer e Essigmann, 1991; Wang, Kreutzer *et al.*, 1998). Existem várias fontes endógenas de danos ao DNA: ROS, produtos da peroxidação lipídica, agentes alquilantes, estrógenos, espécies reativas de nitrogênio, agentes clorinantes e certos intermediários de algumas vias metabólicas (Burcham, 1999; 2008).

A oxidação da 2'-desoxiribose do DNA induz quebras na fita (Rokita e Romero-Fredes, 1992). O radical hidroxila (Cadet, Delatour *et al.*, 1999) e bleomicinas utilizadas como drogas antitumorais (Dedon e Goldberg, 1992; Awada e Dedon, 2001) podem abstrair o hidrogênio do C1, C4 e C5 da 2'-desoxiribose, levando à formação de quebras. Radicais de pirimidinas e purinas também podem abstrair o H dos resíduos furanosídicos (Cadet, 1994; Burrows e Muller, 1998). Quebras de fita também podem ser induzidas por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, via formação de radical HO• *in situ* catalisada por metais transição ligados ao DNA (Mello Filho e Meneghini, 1984). Aldeídos reativos são produzidos pela oxidação da ribose, como 3'-fosfoglicolaldeído e base propenals, os quais podem reagir com as bases do DNA, gerando adutos exocíclicos (Regulus, Duroux *et al.*, 2007; Dedon, 2008). Quebras de fita simples ou dupla no DNA são as lesões mais tóxicas para a célula. Elas impedem a síntese do DNA e bloqueiam o ciclo celular, recrutando mecanismos de reparo ou desencadeando a apoptose (Rich, Allen *et al.*, 2000).

Muitos dos danos endógenos observados no DNA correspondem a oxidações de bases. O produto de oxidação do DNA mais extensivamente estudado, devido à facilidade com que pode ser detectado, é a 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo) (Floyd, Watson *et al.*, 1986) (**figura 1.3**). A 8-oxodGuo é formada pelo ataque da dGuo pelo radical hidroxila (Floyd, Watson *et al.*, 1986; Cadet, Delatour *et al.*, 1999; Cadet, Douki *et al.*, 2008) ou pelo radical carbonato (Joffe, Geacintov *et al.*, 2003). Suas propriedades biológicas foram amplamente investigadas, tendo sido verificado que é uma lesão mutagênica em bactérias e células de mamífero, levando principalmente a transversões G→T (Shibutani, Takeshita *et al.*, 1991; Le Page, Margot *et al.*, 1995). Transversões G→T são muito encontradas em genes supressores de tumor e protooncogenes mutados (Hussain e Harris, 1998), apontando que a ocorrência de bases oxidadas no DNA leva ao surgimento de mutações espontâneas ao longo da vida de um indivíduo, podendo contribuir para o desenvolvimento de tumores. Duas DNA-glicosilases eliminam a 8-oxodGuo do DNA de eucariontes (OGG1 e AtMMH), e a enzima MTH1 hidroliza a 8-oxodGuo trifosfato do reservatório de nucleotídeos livres da célula, impedindo que ela seja incorporada ao DNA (Sekiguchi e Tsuzuki, 2002).

Por apresentar um potencial de oxidação menor que qualquer outro nucleosídeo natural, a 8-oxodGuo se torna alvo preferencial de outros oxidantes cujo mecanismo envolva oxidação por 1 ou 2 elétrons (Burrows e Muller, 1998). Essa propriedade é particularmente relevante considerando que desde sua descoberta essa lesão tem sido utilizada como um marcador de estresse oxidativo. A detecção dos produtos de oxidação da 8-oxodGuo, como o ácido cianúrico, oxazolona, imidazolona e espiroiminodihidantoina, pode ser, portanto, importante (Martinez, Medeiros *et al.*, 2002).

Estudos apontam os adutos exocíclicos de DNA como novas ferramentas no estudo de estresse redox relacionado com diversas patologias como, por exemplo, inflamação, doenças de acúmulo de metais, e câncer (Nair, Bartsch *et al.*, 2007). Essas lesões podem resultar da

reação do DNA com produtos da lipoperoxidação tais com, malonaldeído (MDA), 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), 2,4-decadienal (DDE), hexenal, acroleína e crotonaldeído (Bartsch, 2000; West e Marnett, 2006; Blair, 2008). A reação de aldeídos  $\alpha,\beta$ -insaturados com o DNA pode formar adutos do tipo eteno ou etano (Marnett, 2000), ou propano-adutos, tais como o 1, $N^2$ -propano-2'-deoxiguanosina (Winter, Segall *et al.*, 1986).

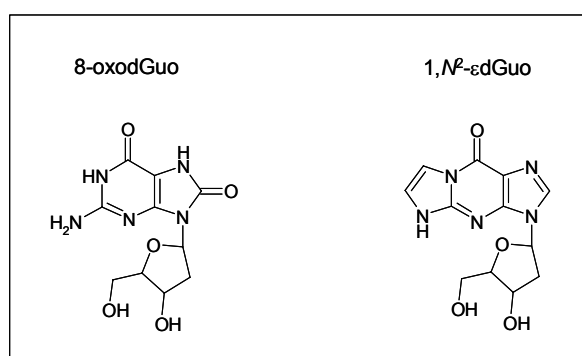
Dentre os adutos exocíclicos de DNA, os etenoadutos têm sido bastante estudados ao longo dos últimos 25 anos (Bartsch, Barbin *et al.*, 1994; Nair, Gansauge *et al.*, 2006; Nair, De Flora *et al.*, 2007; Pang, Zhou *et al.*, 2007). Um grande interesse no estudo dessas lesões teve início com a verificação de que elas são induzidas em DNA por conhecidos carcinógenos ocupacionais e ambientais, tais como cloreto de vinila e carbamato de etila (Bartsch, Barbin *et al.*, 1994; Bartsch e Nair, 2000), e levam à incorporação errada de bases após a replicação ou a transcrição (Cheng, Preston *et al.*, 1991; Mroczkowska e Kusmieriek, 1991; Basu, Wood *et al.*, 1993).

Com os avanços tecnológicos que permitiram o desenvolvimento de métodos analíticos ultra-sensíveis para detecção de adutos em DNA, tais como GC-MS, LC-ESI/MS, HPLC/radioimunoensaio, imunoafinidade/ $^{32}\text{P}$ -postlabeling, níveis basais de vários adutos exocíclicos, passaram a ser observados em DNA de roedores e humanos não expostos a carcinógenos (Bartsch, Barbin *et al.*, 1994; Nair, 1999; Loureiro, Marques *et al.*, 2002; Nair, De Flora *et al.*, 2007; Nair, Bartsch *et al.*, 2007). Níveis basais dos eteno-adutos 1, $N^6$ -eteno-2'-deoxiadenosina ( $\epsilon\text{dAdo}$ ), 3, $N^4$ -eteno-2'-deoxicitidina ( $\epsilon\text{dCyd}$ ),  $N^2,3$ -eteno-2'-deoxiguanosina ( $N^2,3$ - $\epsilon\text{dGuo}$ ) e 1, $N^2$ -eteno-2'-deoxiguanosina (1, $N^2$ - $\epsilon\text{dGuo}$ ), já foram detectados em tecidos de roedores e humanos. Níveis aumentados de  $\epsilon\text{dAdo}$  and  $\epsilon\text{dCyd}$  também foram encontrados em situações clínicas associadas ao estresse redox, como doenças de acúmulo de metais, infecções crônicas e inflamações (Nair, Bartsch *et al.*, 2007). Níveis *ca* de duas a vinte vezes maiores de adutos derivados de acroleína e crotonaldeído foram

encontrados em DNA de fígado de ratos com níveis baixos de glutathiona (Nath, Ocando *et al.*, 1997), indicando que são adutos persistentes e formados endogenamente.

Uma técnica ultra-sensível foi desenvolvida pelo nosso grupo, baseada em HPLC acoplada a espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS), que permite a detecção de eteno adutos *in vivo*. Com essa metodologia foi possível quantificar níveis basais do aduto 1,N<sup>2</sup>-εdGuo (**figura 1.3**) em DNA de timo de bezerro comercial ( $1,70 \pm 0,09$  adutos/ $10^7$  dGuo), em células de mamífero em cultura (CV1-P) ( $4,5 \pm 0,4$  adutos/ $10^7$  dGuo), e em DNA de fígado de ratas ( $5,22 \pm 1,37$  adutos/ $10^7$  dGuo) (Loureiro, Marques *et al.*, 2002).

A verificação de que os eteno adutos são reconhecidos por enzimas de reparo mostra a existência de mecanismos de defesa celular contra essas lesões genotóxicas. Os eteno-adutos são eliminados através de reparo por excisão de bases, com atuação de enzimas DNA-glicosilases (Saparbaev, Langouet *et al.*, 2002; Gros, Ishchenko *et al.*, 2003).



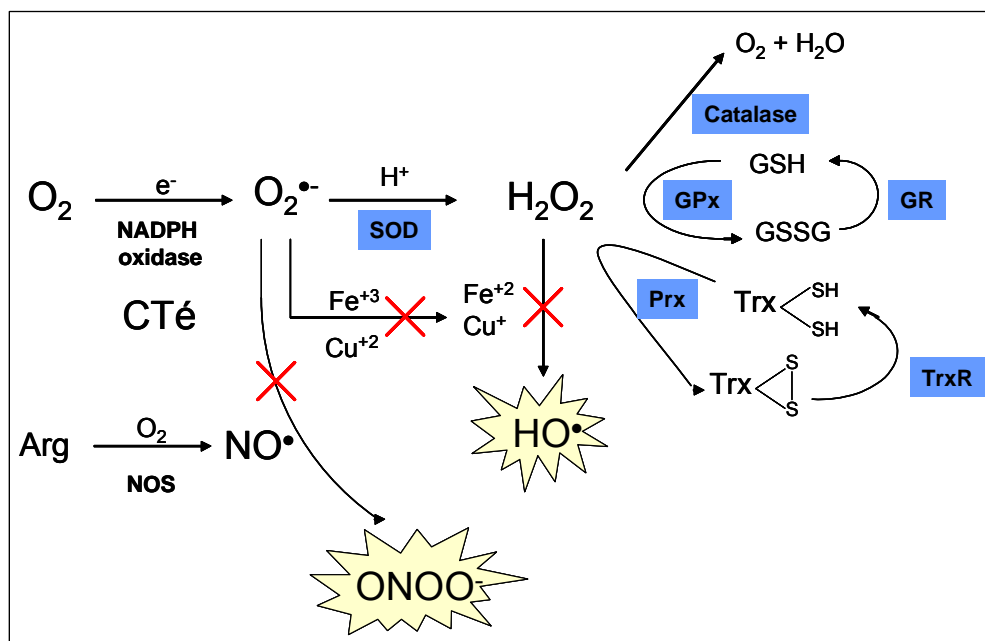
**Figura 1.3:** Estrutura química das lesões em DNA 8-oxodGuo e 1,N<sup>2</sup>-εdGuo.

### 1.3 Defesas antioxidantes

A célula encontra-se protegida de ROS por uma linha de defesa antioxidante, onde enzimas como superóxido dismutase, glutathiona peroxidase, glutathiona redutase, catalase, peroxirredoxinas e sistemas enzimáticos de conjugação e reparo, junto com compostos como carotenóides, vitaminas E e C, e tióis, desempenham um importante papel. O equilíbrio entre

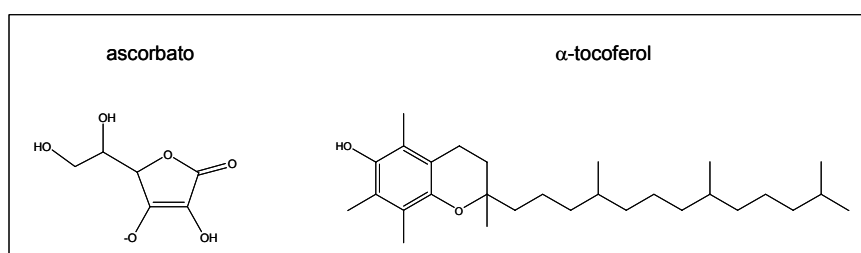
os processos pró-oxidantes e anti-oxidantes constitui a condição normal da vida aeróbica. O desequilíbrio favorável ao estado pró-oxidante desencadeia o estresse oxidativo (Sies, 1991).

Os mamíferos apresentam três tipos de superóxido dismutases (SOD): Cu,Zn-SOD, muito abundante no citosol, e também encontrada no núcleo e no espaço intermembranas da mitocôndria; Mn-SOD, encontrada na matriz mitocondrial; Cu,Zn-SOD extracelular, encontrada no lúmen de vasos sanguíneos. As SODs fazem parte da primeira linha de defesa antioxidante dos organismos, dismutando o superóxido a  $H_2O$  e  $H_2O_2$ . As SODs atuam em conjunto com as enzimas catalase, glutatona peroxidase e peroxirredoxinas, as quais eliminam o  $H_2O_2$ . A catalase dismuta  $H_2O_2$  a água e oxigênio. A glutatona peroxidase (GPx) remove  $H_2O_2$  e peróxidos orgânicos pela oxidação de glutatona (GSH) ao dímero GSSG. Este processo é acompanhado pela enzima glutatona redutase (GR), a qual recicla GSSG a GSH. Já as peroxirredoxinas (Prx) utilizam a proteína tiorredoxina (Trx) (a qual contém dois grupos tióis) como substrato. A tiorredoxina redutase (TrxR), converte a tiorredoxina oxidada de volta a sua forma reduzida (**figura 1.4**) (Halliwell e Gutteridge, 1999).



**Figura 1.4:** Reações catalisadas pelas enzimas do sistema de defesa antioxidante (em azul) das células de mamífero. As reações que levam à formação de radical hidroxila e peroxinitrito são inibidas (X vermelho) na presença das enzimas antioxidantes.

Ascorbato (vitamina C) e  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) são dois anti-oxidantes não protéicos obtidos da dieta (**figura 1.5**). O ascorbato reage com espécies ferril e radicais de aminoácidos, inibindo lesões oxidativas induzidas por heme proteínas e  $H_2O_2$ . Ele também seqüestra  $O_2^{\bullet-}$ ,  $HO^{\bullet}$ ,  $LOO^{\bullet}$  e espécies derivadas de peroxinitrito. O grupo  $-OH$  fenólico do  $\alpha$ -tocoferol rapidamente seqüestra radicais  $LOO^{\bullet}$ , resultando na formação de radicais tocoferila, os quais têm uma capacidade muito menor de propagar a peroxidação lipídica. O radical tocoferila é reduzido *in vivo* pela reação direta com ascorbato ou ubiquinol, ou por mecanismos enzimáticos (Burton, Wronska *et al.*, 1990).



**Figura 1.5:** Estrutura química do ascorbato e do  $\alpha$ -tocoferol.

Muitos mecanismos evoluíram para seqüestrar íons de ferro e cobre, prevenindo sua participação em reações redox indesejáveis. No plasma, todos os íons de ferro estão complexados a transferrinas, e os íons de cobre, a ceruloplasmina. Dentro das células, o excesso de íons de ferro está estocado em ferritina e o excesso de íons de cobre em metalotioneínas. Um estoque intracelular de íons de ferro e cobre livre existe no interior de vacúolos isolados dentro da célula (Harris, 1995; Harrison e Arosio, 1996).

Como a extensa gama de defesas antioxidantes do corpo humano não é capaz de prevenir completamente as lesões a biomoléculas, existem sistemas de reparo de lesões em

DNA, proteínas e lipídios. Fosfolipases degradam lipídios oxidados, e o sistema ubiquitina-proteassomo marca e degrada proteínas oxidadas e desenoveladas (Halliwell e Gutteridge, 1999). Danos oxidativos no DNA são reparados por excisão de base, excisão de nucleotídeo e por *mismatch repair*. As enzimas DNA-glicosilases hidrolisam a ligação *N*-glicosídica entre a base modificada e a desoxirribose, deixando um sítio abásico no DNA. Este sítio é reconhecido por endonucleases (por exemplo, a enzima APE1) que clivam o DNA e retiram alguns nucleotídeos, preparando-o para a atividade da DNA polimerase. A remoção da base pareada erroneamente à base modificada é realizada pelo mecanismo de *mismatch repair* (Boiteux, Gellon *et al.*, 2002).

Mesmo com defesas antioxidantes e sistemas de reparo de lesões em biomoléculas, tecidos e fluidos de indivíduos saudáveis apresentam níveis basais de produtos finais de peroxidação lipídica e oxidação de proteínas (como nitrotirosina e carbonilas protéicas). O DNA isolado de indivíduos saudáveis também contém níveis basais de bases modificadas (Halliwell, 2001).

#### **1.4 Morte celular induzida por estresse oxidativo**

O estresse oxidativo pode levar a célula à morte por necrose ou apoptose (West e Marnett, 2006). A necrose é uma morte celular desordenada, caracterizada pelo rompimento das membranas plasmática, nuclear, mitocondrial e do retículo endoplasmático, devido a um inchamento resultante da alteração da homeostase iônica. Ocorre um rápido declínio na capacidade de síntese de ATP, e um vazamento de proteases para o meio extracelular, as quais ativam uma resposta inflamatória no tecido (Proskuryakov, Konoplyannikov *et al.*, 2003). A enzima poli(ADP-ribose) polimerase-1 (PARP-1) pode estar envolvida em alguns casos de necrose, apesar do mecanismo ainda não ser totalmente esclarecido. A PARP-1 promove um

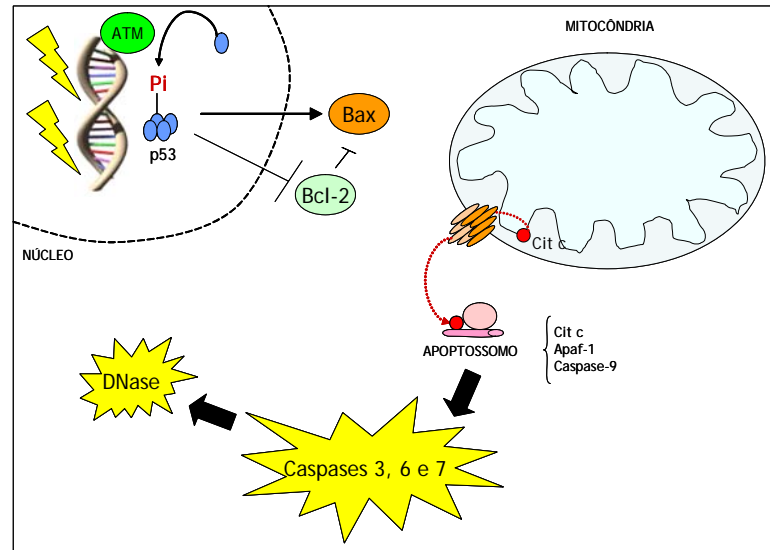


rápido consumo de ATP e NADH, e pode recrutar enzimas para o núcleo para degradação do DNA genômico (Ha e Snyder, 1999).

A apoptose é uma forma organizada de morte celular que elimina células supérfluas durante o desenvolvimento normal, ou células mutadas, danificadas ou infectadas, e é mediada por mecanismos ativos intrínsecos (Martin, Chen *et al.*, 2005). A apoptose é organizada para eliminar rapidamente células defeituosas de um tecido, marcando-as para fagocitose e reciclando seus constituintes, impedindo que o dano se espalhe e que a célula defeituosa consuma a energia do tecido (Rich, Allen *et al.*, 2000). A apoptose depende da ativação de caspases, uma família de cisteína endopeptidases intracelulares que clivam proteínas em resíduos de aspartato específicos. A via apoptótica pode ser iniciada extrinsicamente por proteínas sinalizadoras extracelulares (TNF $\alpha$  e FasL) que ativam as caspase-8 e 10, e intrinsicamente, pela liberação de componentes mitocondriais, que ativam a caspase-9 via formação do apoptossomo (Strasser, O'connor *et al.*, 2000). O apoptossomo é um complexo formado pelo fator Apaf-1, pelo citocromo C liberado da mitocôndria e pela procaspase-9. As duas vias convergem, ativando as caspases-3, 6 e 7, as quais são responsáveis pela degradação do citoesqueleto e de outras proteínas citosólicas e mitocondriais, e pela ativação de DNases responsáveis pela fragmentação do DNA (Krantic, Mechawar *et al.*, 2005). Outros fatores liberados da mitocôndria (Smac/DIABLO e Omi/HtrA2) promovem a ativação das caspases prevenindo a sua inibição (Ferri e Kroemer, 2001).

ROS podem ativar a apoptose por diversos mecanismos. Sabe-se que ROS oxidam componentes celulares induzindo alterações estruturais e funcionais (Krantic, Mechawar *et al.*, 2005). É o caso da oxidação de proteínas e lipídios mitocondriais, culminando na liberação do citocromo C, e do acúmulo de lesões no DNA, culminando na ativação da proteína pró-apoptótica p53. A proteína p53 leva à morte células que possuem alto nível de

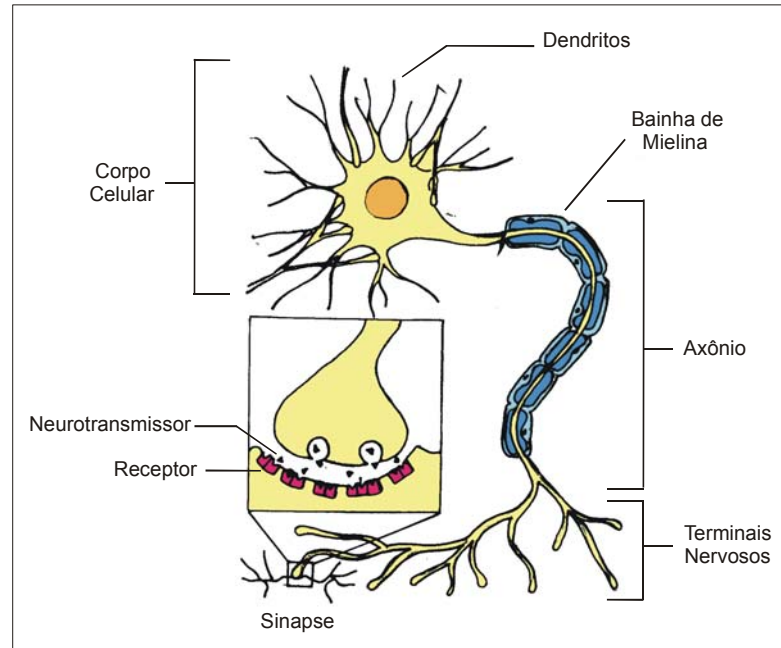
lesões no DNA causadas por ROS ou outros agentes genotóxicos (Levine, 1997). A estratégia eucariótica para lidar com danos ao DNA pode ser dividida em três componentes: o reconhecimento da lesão no DNA, o recrutamento de proteínas para pausar o ciclo celular e a implementação da resposta apropriada – reparo do DNA ou morte celular por apoptose. A proteína ATM (de ataxia telangiectasia mutada) e a proteína DNA-PK são quinases que se ligam diretamente a extremidades livres de DNA, catalisando a fosforilação de proteínas para transmitir o sinal do dano mais letal em DNA – a quebra de dupla fita. Uma das proteínas diretamente fosforilada é a p53 (Rich, Allen *et al.*, 2000). A proteína p53 é inibida pela proteína Mdm-2. Com o excesso de lesões no DNA, p53 é liberada de Mdm-2 e estabilizada por fosforilação e acetilação para formar um tetrâmero estável capaz de se ligar a regiões promotoras no DNA, resultando na transcrição de proteínas responsáveis pelo controle do ciclo celular, como p21 (Stewart e Pietenpol, 2001). A proteína p53 ativa diretamente a transcrição do gene pró-apoptótico *bax* e a repressão do gene anti-apoptótico *bcl-2* (Rich, Allen *et al.*, 2000). Bax participa da formação do poro mitocondrial para liberação do citocromo C, juntamente com Bak. Bcl-2 interage com Bax impedindo sua oligomerização (Danial e Korsmeyer, 2004) (**figura 1.6**). Além de seu efeito na regulação da transcrição de alguns genes, p53 se acumula no citosol e mitocôndria e pode interagir diretamente com fatores apoptóticos, induzindo a apoptose através do mecanismo intrínscico (Marchenko, Zaika *et al.*, 2000).



**Figura 1.6:** Esquema simplificado da ativação da apoptose desencadeada por lesões no DNA.

### 1.5 O risco de lesões oxidativas no sistema nervoso central

O sistema nervoso central (SNC) é formado por neurônios e células da glia (microglia, astrócitos e oligodendrócitos). Os oligodendrócitos sintetizam e mantêm a bainha de mielina que isola os axônios. Os astrócitos fornecem aos neurônios suporte estrutural para auxiliar no metabolismo e proteção. A microglia é composta por macrófagos residentes que atuam na defesa imune do SNC. Os neurônios são constituídos por um corpo celular, dendritos (pequenas ramificações do corpo celular), um axônio alongado e terminais nervosos - os quais formam parte de uma sinapse (**figura 1.7**). A sinapse é a comunicação entre neurônios, mediada por neurotransmissores (dopamina, noradrenalina, acetilcolina, serotonina, glicina e glutamato). Durante o processo fisiológico normal da transmissão sináptica, o neurônio que recebeu o estímulo inicial é despolarizado e libera neurotransmissores pelas terminações nervosas, os quais cruzam a fenda sináptica e se ligam a receptores no neurônio pós-sináptico, desencadeando a sua despolarização e propagando o estímulo. A despolarização é transiente, sendo terminada rapidamente pela remoção do neurotransmissor pelos sistemas de captação das células da glia e terminações nervosas (Reichert, 1992).



**Figura 1.7:** Estrutura do neurônio e, em destaque, representação de uma sinapse.

O glutamato é o principal neurotransmissor no cérebro de mamíferos, responsável por um terço de todas as sinapses no SNC. Sob certas condições, como insuficiência na recaptação de glutamato, introdução de glutamato por outra via, ou despolarização prolongada da terminação nervosa, o glutamato pode se acumular na fenda sináptica e desencadear um processo excitotóxico. Concentrações excitotóxicas de glutamato causam a despolarização excessiva do neurônio pós-sináptico e conseqüentemente, distúrbios da homeostasia iônica e energética, ativação de enzimas líticas mediada por  $\text{Ca}^{+2}$ , geração de espécies oxidantes, lesão mitocondrial e edema osmótico, podendo levar à lise celular e morte (Coyle e Puttfarcken, 1993).

Todos os tecidos humanos sofrem lesões oxidativas, porém, por diversas razões, o sistema nervoso central é especialmente sensível. Primeiramente, o SNC tem capacidade reduzida de regeneração celular em comparação com outros órgãos. Isto porque os neurônios de um indivíduo adulto são células pós-mitóticas, ou seja, não se replicam mais (Andersen, 2004). Como a reposição de um neurônio é um processo muito mais lento do que a regeneração de outros tipos celulares, a morte de neurônios induzida por toxinas ou pelo

processo normal de envelhecimento pode causar sérios comprometimentos ao sistema nervoso. Segundo, características intrínsecas do SNC e de seu metabolismo - abordadas nos próximos parágrafos - o tornam mais propenso ao ataque por espécies oxidantes.

O consumo  $O_2$  pelos neurônios é muito elevado: em humanos, o cérebro é responsável por cerca de 20% do consumo total de  $O_2$ . A grande demanda de  $O_2$  é devido ao alto consumo de ATP dos neurônios para manter o potencial de membrana e fluxo de neurotransmissores ( $4 \times 10^{21}$  ATP/min). Isto significa que os neurônios dependem muito da eficiência das mitocôndrias. Todavia, elétrons podem vazar da cadeia de transporte de elétrons e gerar espécies reativas de oxigênio (ROS), que por sua vez podem danificar a mitocôndria. Em contrapartida, a mitocôndria com lesões apresenta maior vazamento de elétrons e consequentemente produz mais ROS, gerando um ciclo vicioso (Halliwell, 2006).

Os neurônios utilizam extensamente o glutamato como neurotransmissor. Morte celular e disfunções metabólicas podem causar aumento de glutamato extracelular, elevando a concentração de  $Ca^{+2}$  intracelular a níveis patológicos. Isto resulta na superativação da fosfolipase  $A_2$  e da óxido nítrico sintase (NOS) neuronal, levando à liberação de ácidos graxos e produção elevada de  $NO^{\bullet}$  (Coyle e Puttfarcken, 1993).

Muitos neurotransmissores são oxidáveis. Dopamina, seu precursor levodopa e noradrenalina reagem com  $O_2$  gerando  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  e quinonas e semiquinonas reativas que podem depletar as reservas de GSH e se ligar em grupos  $-SH$  de proteínas. O nível de dopamina em neurônios estriatais é estimado em 50 mM, e o nível de noradrenalina em neurônios noradrenérgicos, em 0,6 mM. A oxidação dos neurotransmissores dopamina, serotonina e noradrenalina por monoamina oxidases (flavoproteínas localizadas na membrana mitocondrial externa) é um dos principais mecanismos de geração de  $H_2O_2$  no cérebro (Stokes, Hastings *et al.*, 1999).

Muitas áreas do SNC possuem grande quantidade de íons de ferro. A maior parte dele está estocada em ferritina e uma menor parte no sítio ativo de enzimas. No fluido cérebro espinhal, os íons de ferro estão complexados a transferrina, a qual se encontra totalmente saturada. Lesões no SNC prontamente resultam na liberação de íons ferro capazes de catalisar a formação de  $\text{HO}^\bullet$ , a peroxidação lipídica e a oxidação de neurotransmissores (Zecca, Youdin *et al.*, 2004).

Os lipídios das membranas neuronais contêm ácidos graxos altamente insaturados, especialmente ácido docosahexaenóico ( $\text{C}_{22:6}$ ). Estes ácidos graxos poliinsaturados são extremamente susceptíveis à peroxidação lipídica, a qual resulta no acúmulo de hidroperóxidos de lipídio (LOOH) (Halliwell, 2001). Estes podem ser degradados na presença de íons de ferro ou cobre gerando radicais alcóxila ( $\text{LO}^\bullet$ ) e peróxila ( $\text{LOO}^\bullet$ ). Os radicais  $\text{LO}^\bullet$  e  $\text{LOO}^\bullet$  podem danificar proteínas de membrana e também atacar outras moléculas de lipídios, propagando a peroxidação lipídica. Como já mencionado no item 1.2.2, os produtos finais da decomposição de LOOH são inúmeros e incluem aldeídos altamente citotóxicos, como MDA, HNE.

Muitas evidências sugerem que a geração de oxidantes não resulta, simplesmente, de acidentes do metabolismo aeróbico, mas também do processo ativo de defesa imune do SNC. Enquanto essenciais para a sobrevivência, estes processos podem ser ativados impropriamente causando lesões aos neurônios e promovendo a neurodegeneração. Algumas das células da glia encontradas no cérebro são macrófagos residentes chamados microglia. Quando ativada, a microglia produz  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{NO}^\bullet$  (Ischiropoulos e Beckman, 2003).

O sistema enzimático de defesa antioxidante do SNC é similar ao dos outros órgãos (Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, glutatona peroxidase, glutatona redutase, tiorredoxinas e tiorredoxina redutase), com exceção dos níveis de catalase que são mais baixos (11 u atividade/mg proteína no cérebro contra 1300 u atividade/mg proteína nos eritrócitos e no

figado (Brannan, Maker *et al.*, 1981). Antioxidantes de baixo peso molecular também são encontrados: GSH, ascorbato e  $\alpha$ -tocoferol. O  $\alpha$ -tocoferol, por ser lipossolúvel, se aloja nas membranas atuando como um poderoso inibidor da peroxidação lipídica (Podda, Weber *et al.*, 1996). Neurônios e glia possuem um sistema de transporte ativo que concentra o ascorbato intracelular em concentração milimolar. Existe um gradiente de concentração de ascorbato do sangue para os neurônios: 30-60  $\mu$ M no sangue, 200-400  $\mu$ M no líquido cerebrospinal, ~1 mM no cérebro, até 10 mM em neurônios (Spector, Spector *et al.*, 1977; Siushansian e Wilson, 1995). O transportador ativo de ascorbato SVCT2 é necessário para a sobrevivência em camundongos recém-nascidos, sendo que sua deleção resulta em severa depleção de ascorbato no cérebro e morte devido à hemorragia cerebral e deficiência respiratória. O dihidroascorbato (DHA) atravessa a barreira hemato-encefálica através dos transportadores GLUT-1 (May, Li *et al.*, 2006). Além de seu papel antioxidante, o ascorbato desempenha outras funções nos neurônios, como doador de elétrons para a síntese de norepinefrina e neuromodulador do transporte de glutamato e dopamina (May, Li *et al.*, 2006).

O SNC também contém enzimas de reparo de biomoléculas com lesões, como fosfolipases, o sistema ubiquitina-proteassomo para degradar proteínas anormais (incluindo aquelas com lesões oxidativas) (Akaishi, Shiomi *et al.*, 1996) e enzimas de reparo do DNA (Lovell, Xie e Markesbery, 2000). A barreira hemato-encefálica é outro importante mecanismo de defesa do cérebro. O endotélio dos pequenos vasos sanguíneos cerebrais é muito menos permeável a moléculas do que outros endotélios, e mais resistente a estresse oxidativo do que o resto do cérebro (rico em GSH, glutathione peroxidase, glutathione reductase e catalase) (Tayarani, Chaudiere *et al.*, 1987; Agarwal e Shukla, 1999).

## **1.6 Esclerose Lateral Amiotrófica**

Em 1869, Charcot descreveu pela primeira vez a degeneração motora chamada Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA). Trata-se de uma doença caracterizada pela degeneração progressiva dos neurônios motores acarretando atrofia, paralisia e morte. A doença se inicia pela paralisia de um membro de um lado específico e a morte acaba ocorrendo por insuficiência respiratória, quando os neurônios responsáveis pelo movimento do diafragma são atingidos (Charcot e Joffroy, 1869). O início da doença ou o primeiro diagnóstico é feito, geralmente, entre 50 e 60 anos, e por já se tratar de um estágio avançado, o paciente tem de 4 a 10 anos de vida após o diagnóstico. Não há ainda um tratamento efetivo para ELA. Hoje, existe somente um medicamento aprovado (Riluzol - Rilutek<sup>®</sup> Sanofi Aventis), o qual aumenta a sobrevivência do paciente, e diversos tratamentos paliativos (Carri, Ferri *et al.*, 2003). A utilização de células tronco para regeneração dos neurônios motores também tem sido estudada (Silani, Cova *et al.*, 2004). A doença atinge mais homens do que mulheres, em uma proporção de 3:2. Cinco mil novos casos de ELA são diagnosticados por ano nos EUA, e o total mundial atinge 2 casos/100.000 habitantes por ano (Kurtzke, 1991; Cozzolino, Ferri *et al.*, 2008). No Brasil, a incidência é de 1,5 casos/100.000 habitantes, ou seja, 2.500 pacientes por ano. A primeira descrição de ELA no Brasil foi publicada nos *Archivos Brasileiros de Psychiatria, Neurologia e Medicina Legal* em 1910 pelo Dr. Cypriano de Freitas. Até o presente momento, a Associação Brasileira de Esclerose Lateral Amiotrófica (AbrELA) já catalogou 540 pacientes com ELA ([www.tudosobreela.com.br](http://www.tudosobreela.com.br)).

A ELA é uma doença multifatorial e multisistêmica, e 90% dos casos são esporádicos (sem antecedência familiar, sem causa genética). Diversos trabalhos têm demonstrado que a degeneração dos neurônios motores é resultado de mecanismos complexos envolvendo estresse oxidativo, excitotoxicidade por glutamato (Glu), disfunção e agregação de proteínas, problemas no transporte axonal e processos neuro-inflamatórios (Cozzolino, Ferri *et al.*,



2008). Ainda é difícil definir o que é causa, consequência ou associação. Forma-se um ciclo vicioso, onde um fator agrava o outro.

Pacientes de ELA apresentam acúmulo de Glu no fluido cerebro-espinhal devido à insuficiência na sua recaptação (Rothstein, Tsai *et al.*, 1990). Isto acarreta despolarização prolongada do neurônio pós-sináptico, e por consequência, aumento da concentração de  $Ca^{+2}$  no citosol, promovendo estresse oxidativo e ativando enzimas líticas que levam à morte celular (Lipton e Rosenberg, 1994). A insuficiência na recaptação do Glu ocorre devido a defeitos nas proteínas receptoras de Glu EAAT-2 (Rothstein, Martin *et al.*, 1992). Estes defeitos podem ter sua origem em fatores genéticos ou serem causados por lesões nas proteínas.

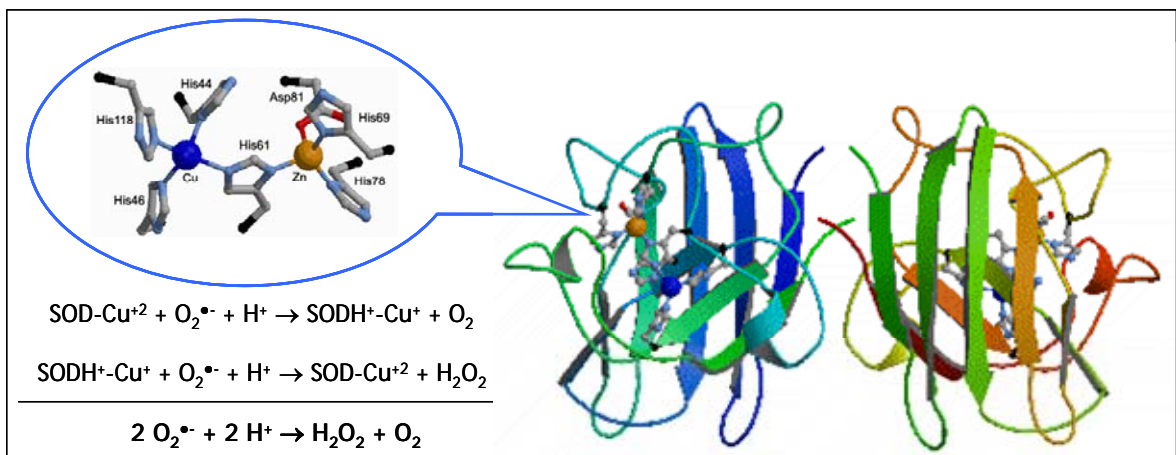
A participação de estresse oxidativo na patologia de ELA é evidenciada pela presença de danos oxidativos em DNA, proteínas e lipídios nos tecidos de pacientes (Shaw, Fitzmaurice *et al.*, 1995; Beal, Ferrante *et al.*, 1997; Ferrante, Browne *et al.*, 1997; Lee, Hyun *et al.*, 2001) e animais modelo da doença (Andrus, Fleck *et al.*, 1998; Hall, Andrus *et al.*, 1998; Liu, Wen *et al.*, 1999; Cha, Chung *et al.*, 2000). Danos oxidativos em proteínas podem ser a causa e consequência do efeito excitotóxico do Glu, podem promover a formação de agregados protéicos e podem causar lesões na mitocôndria levando à morte celular por apoptose ou necrose. Acredita-se também que, ao invés de causar a morte direta dos neurônios motores, as espécies oxidantes podem induzir uma reação neuro-inflamatória que acaba desencadeando o processo de apoptose dos neurônios (Barber, Mead *et al.*, 2006).

A administração de antioxidantes a animais modelo de ELA retardou o aparecimento dos sintomas e aumentou o tempo de vida (Ferrante, Klein *et al.*, 2001; Wu, Kiaei *et al.*, 2003; Crow, Calingasan *et al.*, 2005). Até o momento, a administração de antioxidantes a pacientes não teve efeitos relevantes (Louwerse, Weverling *et al.*, 1995; Lange, Murphy *et al.*, 1998; Ferrante, Shefner *et al.*, 2005; Galbussera, Tremolizzo *et al.*, 2006). Muitos fatores

podem ser levados em consideração para explicar este resultado negativo: a situação do paciente no início do tratamento, o tempo de tratamento, a acessibilidade da droga ao SNC.

### 1.6.1 Cu,Zn-SOD e ELA

A Cu,Zn-SOD, também conhecida por SOD1, é uma importante enzima do sistema antioxidante celular. Ela catalisa a dismutação do superóxido, protegendo as células contra possíveis efeitos deletérios desta espécie. A enzima possui massa molecular de 32.000 Da, sendo formada por duas subunidades idênticas, cada uma com um canal, progressivamente mais estreito com resíduos carregados, que dirige o  $O_2^{\bullet-}$  para o sítio ativo (Tainer, Getzoff *et al.*, 1982). Cada sítio ativo contém um  $Cu^{+2}$  e um  $Zn^{+2}$  unidos por um ligante comum, o anel imidazólico da His 61. O  $Cu^{+2}$  está ligado a outras três His e o  $Zn^{+2}$ , a outras duas His e um Asp. Íons pequenos como o  $CN^-$  e  $N_3^-$  podem atravessar esse canal e inibir a enzima ligando-se diretamente ao cobre (Rigo, Viglino *et al.*, 1975). O  $Zn^{+2}$  é responsável pela geometria do sítio ativo e pelo posicionamento correto do  $Cu^{+2}$ , o qual atua diretamente na dismutação, alternando entre  $Cu^{+2}/Cu^+$  (Mccord e Fridovich, 1969) em dois passos termodinamicamente favoráveis (**figura 1.8**):



**Figura 1.8:** Estrutura da molécula de SOD1 e mecanismo da reação superóxido dismutásica.

Detalhe: estrutura do sítio ativo da enzima.

Os casos familiares de ELA representam 10% dos casos totais da doença, e foram associados a mutações nos genes da enzima SOD1 (*SOD1*), da proteína alsina (*ALS2*), da proteína senataxina (*SETX*), da proteína B associada à VAMP (*VAPB*), da proteína dinactina (*Dinactina*), entre outros (Pasinelli e Brown, 2006). Mutações pontuais no gene da SOD1 representam cerca de 20% dos casos de ELA familiar (Rosen, Siddique *et al.*, 1993) e têm recebido maior atenção. Ainda não sabemos por que a forma mutante desta proteína abundante e expressa em todos os tecidos é particularmente tóxica para os neurônios motores, causando ELA. Mais de uma década de estudos extensivos forneceram fortes evidências de que um “ganho de função tóxica” ao invés da perda da função enzimática normal da enzima é a causa da doença. Primeiramente, trata-se de um fenótipo dominante em humanos, e a maioria das formas mutantes apresenta atividade superóxido dismutásica normal (revisado por Valentine e colaboradores (Valentine, Doucette *et al.*, 2005)). O primeiro modelo animal para ELA - um camundongo contendo cópias do gene da SOD1 humana mutante (Gurney, Pu *et al.*, 1994) - também sugeriu que as mutações conferiam um ganho de função tóxica à SOD1, já que os camundongos carregando o gene da SOD1 mutante desenvolveram a degeneração dos neurônios motores e ficaram paralisados, mesmo contendo a SOD1 normal do próprio animal intacta (animais expressando SOD1 humana nativa não desenvolveram a doença do neurônio motor). Outra evidência que reforça a hipótese de ganho de função tóxica é o fato do animal nocaute para SOD1 não desenvolver ELA (Reaume, Elliott *et al.*, 1996).

Já foram reportadas mais de 100 mutações diferentes no gene da SOD1 relacionadas a ELA familiar. As mutações ocorrem em toda a extensão da proteína: no sítio ativo, nas folhas  $\beta$  e na interface entre os monômeros. As enzimas mutantes apresentam propriedades biofísicas muito diferentes entre si, mas causam exatamente a mesma doença. As mutações alteram o enovelamento da SOD1, a geometria do sítio ativo e a interação entre os monômeros (Valentine, Doucette *et al.*, 2005). O cobre pode ficar mais acessível a outros

substratos, como  $H_2O_2$  (Yim, Kang *et al.*, 1996; Yim, Kang *et al.*, 1997; Yim, Yim *et al.*, 1999), resultando em aumento de atividade peroxidásica, cujos mecanismos ainda não estão totalmente esclarecidos. Trabalhos também indicam que a enzima pode se tornar menos estável e apresentar menor afinidade pelo cobre e pelo zinco, perdendo os metais para o citosol - revisado por Valentine e colaboradores (Valentine, Doucette *et al.*, 2005). Estes fatos podem levar à formação de agregados tóxicos de SOD1. A toxicidade destes agregados ainda é tema de muitos estudos, mas sabe-se que eles interferem no transporte de moléculas essenciais no axônio, podendo até sequestrá-las, e podem diminuir a atividade de chaperonas e do sistema ubiquitina-proteassomo, levando à neurodegeneração (Julien, 2001). Sabe-se que modificações covalentes na SOD1, como oxidações e nitrações, também promovem a agregação, podendo estar associadas aos casos esporádicos (Ross e Poirier, 2004).

A mutação G93A é a mais estudada mundialmente devido aos camundongos transgênicos criados em 1994. Os animais transfectados com SOD1 G93A humana desenvolvem o quadro clínico de ELA, constituindo um excelente modelo para o estudo dos mecanismos da doença. Animais transfectados com SOD1 A4V não apresentaram os sintomas de ELA em idades comparáveis (Gurney, Pu *et al.*, 1994). Diferenças na idade do início da doença dependem predominantemente no número de cópias do transgene, enquanto que a severidade da doença depende do tipo de mutação. Por exemplo, a progressão da doença é muito mais rápida em camundongos com a mutação G85R (7-14 dias) do que com a mutação G93A (60-110 dias). Camundongos transgênicos com aproximadamente 20 cópias de SOD1 G93A são os mais estudados (Bendotti e Carri, 2004).

Entender por que os neurônios motores são particularmente vulneráveis em ELA é importante para decifrar os mecanismos patogênicos e encontrar tratamentos. Algumas características dos neurônios motores podem ser apontadas, como seu enorme tamanho, sua alta atividade metabólica, sua sensibilidade a disfunções mitocondriais, seu elevado conteúdo

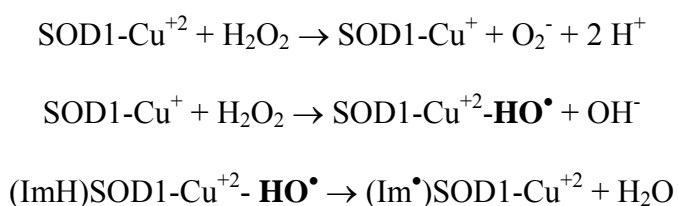
de neurofilamentos e sua capacidade reduzida de controlar a concentração de cálcio intracelular (Goodall e Morrison, 2006). Porém, é preciso ressaltar que os animais que expressam SOD1 G93A em todas as células sofrem severa neurodegeneração, enquanto que a expressão exclusiva em neurônios ou astrócitos não causa a doença. Isto indica que o efeito neurotóxico da SOD1 G93A não é uma simples consequência de sua expressão nos neurônios, mas requer alteração da função de células não-neuronais, como astrócitos e microglia (Boillee, Vande Velde *et al.*, 2006).

Os camundongos e os ratos G93A têm sido largamente estudados, cobrindo todas as hipóteses relacionadas à patologia de ELA - estresse oxidativo, excitotoxicidade por glutamato, formação de agregados protéicos, processos neuro-inflamatórios, disfunções mitocondriais, defeitos no transporte axonal, ativação da apoptose, entre outros. Críticas são feitas a estes animais porque é necessário um aumento de 10-30 vezes no nível da proteína mutante para induzir o fenótipo patológico, enquanto que a SOD1 mutante exerce seu efeito tóxico em nível de expressão normal nos pacientes heterozigotos. Isto se deve a diferenças entre camundongo e homem, as quais não devem ser desprezadas na análise dos resultados (Bendotti e Carri, 2004). Como a ELA esporádica e familiar são patologicamente indistinguíveis, acredita-se que as funções celulares alteradas como consequência da expressão da SOD1 desencadeiam vias que podem ser ativadas por outros fatores nos casos esporádicos. Os animais com SOD1 humana mutante são hoje o único modelo disponível para a realização de teses pré-clínicas de novas terapias para ELA.

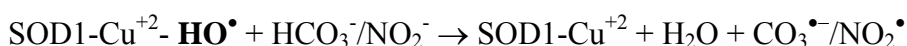
### *1.6.2 Atividade peroxidásica da SOD1 e ELA*

A SOD1 pode interagir diretamente com o  $H_2O_2$ , gerando um forte oxidante. Essa reação tem sido extensivamente estudada e a natureza do oxidante formado tem sido muito discutida. Hodgson e Fridovich (Hodgson e Fridovich, 1975a; b) inicialmente propuseram a

formação de um radical HO• ligado ao Cu<sup>+2</sup>. Hoje, a natureza deste oxidante é debatida: Cu(I)O / Cu(II)-HO• / Cu(III) (Liochev e Fridovich, 2003). Este oxidante atacaria o imidazol de um resíduo de histidina do sítio ativo (ImH), desencadeando o processo de inativação da enzima. Doadores de elétrons exógenos como azida, formato e bicarbonato, os quais são pequenos o bastante para ter acesso ao sítio ativo, poderiam reagir com o radical HO• impedindo a inativação.



Jewett e colaboradores (Jewett, Rocklin et al., 1999) demonstraram através da formação do complexo característico Cu<sup>+</sup>-batocuproína dissulfonato que a oxidação da histidina causava a liberação do cobre na forma de Cu(I). A reação de Fenton entre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e Cu<sup>+</sup> também poderia estar envolvida na atividade pró-oxidante. Outros grupos mostraram fortes evidências de que o sistema SOD1/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxida HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> formando CO<sub>3</sub><sup>•-</sup> (Goss, Singh *et al.*, 1999; Sankarapandi e Zweier, 1999; Zhang, Joseph *et al.*, 2002; Liochev e Fridovich, 2004) e NO<sub>2</sub><sup>-</sup> formando NO<sub>2</sub><sup>•</sup> (Augusto, Bonini *et al.*, 2002), oxidantes que podem se difundir e oxidar diversos substratos em solução. No mecanismo proposto, bicarbonato e nitrito, por serem ânions pequenos, alcançariam o radical •OH ligado ao sítio ativo, a enzima seria reciclada e os produtos da reação se difundiriam. Medinas e colaboradores e Elam e colaboradores também propuseram a formação de um intermediário peroxicarbonato no sistema SOD1/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Medinas, Cerchiaro *et al.*, 2007; Elam, Malek *et al.*, 2003).



Essas propostas mecanísticas têm importância direta na compreensão dos mecanismos de ganho de “atividade tóxica” mediados pelas SOD1 mutantes relacionadas a ELA. Alguns trabalhos indicam que as SOD1 mutantes apresentam maior atividade peroxidásica do que a SOD1 normal *in vitro* (Wiedau-Pazos, Goto *et al.*, 1996; Yim, Kang *et al.*, 1996; Yim, Yim *et al.*, 1999). Leveduras expressando SOD1 A4V, G93A e L38V também produzem quantidades maiores de POBN oxidado (Roe, Wiedau-Pazos *et al.*, 2002).

### *1.6.3 Apoptose de neurônios motores via ativação de p53 na patologia ELA*

Os neurônios do sistema nervoso adulto são células pós-mitóticas, completamente diferenciadas. Isto significa que os mecanismos controladores da divisão celular estão suprimidos, enquanto que aqueles responsáveis por proteger a célula de apoptose estão muito ativos. Sob algumas condições patológicas, como insultos crônicos de estresse oxidativo característicos de doenças neurodegenerativas, estas adaptações são perdidas, e os neurônios podem morrer por apoptose (Krantic, Mechawar *et al.*, 2005).

As doenças neurodegenerativas, incluindo ELA, estão associadas a uma série de insultos que podem desencadear a apoptose de neurônios: agregados protéicos, estresse oxidativo, inibição da mitocôndria, acúmulo de cálcio, excitotoxicidade, entre outros (Bredesen, Rao *et al.*, 2006). Marcadores bioquímicos de apoptose foram detectados em pacientes e modelos animais de ELA, como nível aumentado de liberação de citocromo C da mitocôndria, ativação das caspases-1, 3, 7 e 9 e fragmentação de DNA (Sathasivam, Ince *et al.*, 2001).

Danos em DNA (Ferrante, Browne *et al.*, 1997), deficiência no reparo do DNA (Kisby, Milne *et al.*, 1997) e níveis elevados de p53 são encontrados no SNC de pacientes de ELA (De La Monte, Sohn *et al.*, 1998; Martin, 2000) e modelos animais (Cho, Chung *et al.*, 1999; Gonzalez De Aguilar, Gordon *et al.*, 2000), indicando que p53 deve participar do mecanismo de morte do neurônio motor em ELA em resposta a danos ao DNA.



## 2. Objetivos

Estudar os mecanismos da atividade peroxidásica da SOD1 *in vitro* utilizando o DNA como biomolécula alvo e SOD1 bovina como modelo. Buscar evidências do envolvimento da atividade peroxidásica da SOD1 em um modelo celular de ELA, através da quantificação de lesões no DNA de neuroblastomas transfectados com SOD1 mutante G93A. Avaliar a importância da formação de lesões no DNA no processo de morte dos neuroblastomas mutantes.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Materiais e equipamentos

Ácido fórmico, fosfato de potássio, cloreto de magnésio, hidróxido de sódio, sulfato de magnésio, 2-cloroacetaldeído, 2'-desoxiguanosina, etanol, isopropanol, metanol e sacarose foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). [ $^{15}\text{N}_5$ ]-1, $N^2$ - $\epsilon$ dGuo foi adquirido do Cambridge Isotope Laboratories (Andover, EUA). Acetonitrila para cromatografia foi obtida da EM Science (Gibbstown, EUA) e clorofórmio da Cinética Química (São Paulo, Brasil). Mesilato de desferroxamina foi obtida da Ciba-Geigy S.A. (Basel, Suíça), glicina da Amresco (Solon, EUA) e malonaldeído da Aldrich (Milwaukee, WI). Albumina foi adquirida da Bio Rad Laboratories (Hercules, EUA), dodessilsulfato de sódio (SDS) da Bio Agency (São Paulo, Brasil) e isobutanol da Fisher Scientific Company (Fair Lawn, EUA). Soro fetal bovino e meio DMEM-HAM F12 foram adquiridos da Cultilab (Campinas, Brasil),  $\text{H}_2\text{O}_2$  da Fluka Chemika (Buchs, Suíça), geneticina da Gibco-Invitrogen (Califórnia, USA). Todos os outros reagentes usados são da Sigma (St. Louis, EUA). A água foi purificada em um aparelho Milli-Q da Millipore (Bedford, EUA).

Para as centrifugações foram utilizadas as centrífugas refrigeradas, modelos Centrifuge 5403 da Eppendorf (Hamburg, Alemanha) e Himac CR21E da Hitachi, além da centrífuga para frascos Eppendosfs, não refrigerada, Centrifuge 5415C, também da Eppendorf. Os espectros de absorbância foram adquiridos em um espectrofotômetro Hitachi U3000 (Tóquio, Japão) e os estudos cinéticos foram realizados em um espectrofotômetro UV-1650PC Shimadzu (Kyoto, Japão). As observações microscópicas foram feitas em microscópio Galen III da Cambridge Instruments (Cambridge, Inglaterra). As medidas de pH foram feitas em um potenciômetro da Corning modelo 320 (Nova York, EUA). Para as pesagens, utilizou-se balança analítica da A&D Company (Tóquio, Japan). As incubações em

banho-maria foram feitas em banho modelo 144 da Fanen (São Paulo, Brasil). As soluções foram autoclavadas em autoclave vertical modelo 415 da Fanem (São Paulo, Brasil). As células foram incubadas em uma estufa de CO<sub>2</sub> Napco<sup>®</sup> modelo 5100 da Precision Scientific (Chicago, EUA) e manipuladas em fluxo laminar com módulo para esterilização de ar equipado com luz UV da EACI/ENVIRCO Environmental Air Control (Albuquerque, EUA). Outros equipamentos utilizados serão descritos em Métodos.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 *Eliminação de metais contaminantes da SOD1 bovina*

Toda a SOD1 utilizada nos experimentos foi tratada com a resina Chelex para eliminação de metais contaminantes. Uma alíquota de 1 mL de solução de SOD1 bovina 6,6 g/L em tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM (pH 7,4) foi incubada overnight com 0,01 g de resina Chelex 100 (Sigma) a 20°C e 1000 rpm. A concentração da proteína após a incubação foi determinada a 258 nm ( $\epsilon = 10,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (Rotilio, Calabrese *et al.*, 1972) e a atividade da enzima foi determinada como descrito no item 3.2.3.

### 3.2.2 *Liberação do cobre do sítio ativo da SOD1*

SOD1 (10 e 30  $\mu\text{M}$  do dímero) foi incubada por 1 e 24 h a 37°C e 1000 rpm com batocuproína (1 mM) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5, 1 e 0,5 mM), na presença ou não de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (25 mM), em tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM (pH 7,4) tratado com Chelex. A liberação do cobre do sítio ativo da enzima foi acompanhada pelo aparecimento do espectro característico do complexo Cu(I)-batocuproína (entre 390 e 540 nm). A quantidade de cobre liberada foi determinada pela leitura da absorbância em 485 nm ( $\epsilon = 1,24 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (Jewett, Rocklin *et al.*, 1999). A concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi determinada pela absorbância a 240 nm ( $\epsilon = 43,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

### 3.2.3 Determinação da atividade da SOD1 bovina

Para os estudos de atividade da SOD1 foram feitas incubações da enzima (10 e 30  $\mu\text{M}$  do dímero) com  $\text{H}_2\text{O}_2$  (5, 1 e 0,5 mM), por 1 e 24 h a  $37^\circ\text{C}$  e 1000 rpm, em tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM (pH 7,4) tratado com Chelex. A atividade da SOD1 foi determinada como descrito por McCord e Fridovich (McCord e Fridovich, 1969). Resumidamente, o superóxido gerado pelo sistema xantina (50  $\mu\text{M}$ ) / xantina oxidase (0,1 U/mL) reduz o citocromo C (10  $\mu\text{M}$ ), o qual absorve em 550 nm. A adição de SOD1 ao sistema (0,1  $\mu\text{M}$ ) inibe a formação de superóxido e, conseqüentemente, a redução do citocromo C. As incubações foram realizadas em tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM (pH 7,4) tratado com Chelex,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (0,1 mM) e catalase (20  $\mu\text{g/mL}$ ), a  $25^\circ\text{C}$ . Para dissolução da xantina na solução estoque (500  $\mu\text{M}$ ), adicionou-se KOH. A velocidade da redução do citocromo C foi determinada pela regressão linear da curva de absorbância x tempo entre 60 e 120 min de reação. Uma unidade de SOD1 corresponde à diminuição de 50% na redução do citocromo C em relação ao ensaio somente com xantina oxidase. A atividade da SOD1 em U/ $\mu\text{g}$  de proteína foi calculada dividindo-se as unidades de SOD1 por 3,12  $\mu\text{g}$  (massa total de SOD1 em cada ensaio). A porcentagem de atividade SOD1 foi calculada em relação ao ensaio sem  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### 3.2.4 Purificação do plasmídeo pBlueScript de *E. coli* DH10B

Uma alíquota da suspensão de *E. coli* DH10B foi plaqueada em meio LB-Ágar contendo ampicilina (0,1mg/mL) e a placa foi deixada em estufa a  $37^\circ\text{C}$  overnight. Uma colônia da placa foi transferida para um tubo contendo 3 mL de meio LB com ampicilina, o qual foi incubado a  $37^\circ\text{C}$  e 300 rpm overnight. O pré-inóculo foi diluído para 100 mL em meio LB com ampicilina e incubado overnight a  $37^\circ\text{C}$  e 300 rpm. Ao fim da incubação, as bactérias foram recuperadas por centrifugação a 6000g por 15 min a  $4^\circ\text{C}$ . O pellet foi ressuspenso em 4 mL de tampão P1, gentilmente misturado por inversão a 4 mL de tampão

P2 e incubado a temperatura ambiente por 5 min. Após adição de 4 mL de tampão P3 gelado e leve inversão, incubou-se em gelo por 15 min. Centrifugou-se por duas vezes a 20000g por 30 e 15 min a 4°C, recolhendo-se o sobrenadante contendo os plasmídios. O sobrenadante foi aplicado em coluna Qiagen QIAGEN-tip (Dusseldorf, Alemanha) previamente equilibrada com tampão QBT. Os contaminantes foram eluídos com duas lavagens de 10 mL de tampão QC, e o plasmídio foi eluído com 5 mL de tampão QF. Para precipitação do DNA, 3,5 mL de isopropanol foram adicionados à fração eluída com tampão QF, a qual foi em seguida centrifugada a 15000g por 30 min a 4°C. O pellet foi lavado com 2 mL de etanol 70% e, após centrifugação a 15000g por 10 min, o sobrenadante foi descartado com cuidado. O DNA, seco ao ar por 5 min, foi ressuspensionado em 200 µL de H<sub>2</sub>O. A concentração do DNA foi determinada por espectrofotometria a 260 nm (uma solução 50 µg/mL apresenta A<sub>260</sub> = 1).

*Tampão P1 (ressuspensão):* Tris 50 mM (pH 8); Na<sub>2</sub>EDTA 10 mM; RNase A 100 µg/mL

*Tampão P2 (lise):* NaOH 200 mM; 1% SDS (p/v).

*Tampão P3 (neutralização):* acetato de potássio 3 M (pH 5).

*Tampão QBT (equilíbrio):* NaCl 750 mM; MOPS ácido 50 mM (pH 7); 15% isopropanol (v/v); 0,15% Triton X-100 (v/v).

*Tampão QC (lavagem):* NaCl 1 M; Tris 50 mM (pH 8,5); 15% isopropanol (v/v).

*Tampão QF (eluição):* NaCl 1,25 M; MOPS ácido 50 mM (pH 7); 15% isopropanol (v/v).

### 3.2.5 Incubação de pBlueScript com SOD1 / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

O plasmídio pBlueScript é um DNA dupla fita na forma circular com 2961 pares de base. Oxidantes podem atacar a ribose do DNA e romper a ligação entre as bases, resultando na quebra de uma ou das duas fitas do DNA. Quando apenas uma das fitas é rompida (quebra de fita simples do DNA), o DNA plasmidial adquire uma forma circular aberta (OC), mais

relaxada do que sua forma circular original super enovelada (SC). Estas duas formas podem ser distinguidas por eletroforese em gel de agarose, uma vez que a forma OC, migra mais lentamente no gel do que a forma SC quando submetida a um campo elétrico. O brometo de etídio se intercala entre as bases do DNA e permite a visualização das bandas no gel quando exposto à luz UV.

O plasmídeo pBlueScript (500 ng) foi incubado com SOD1 (10  $\mu$ M do dímero) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5000, 1000, 500 e 200  $\mu$ M) por 1 h a 37°C e 500 rpm em tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM (pH 7,4) tratado com Chelex, na presença ou ausência de batocuproina (1 mM). Cada incubação foi realizada em triplicata. Ao fim da incubação, 5  $\mu$ L de corante foram adicionados a 30  $\mu$ L de amostra para aplicação em gel de agarose 0,8% preparado em tampão TAE com 30  $\mu$ L de brometo de etídio (1 mg/mL). A separação das formas circular aberta (OC) e super enovelada (SC) do plasmídeo foi realizada por eletroforese a 100 V por 2 h em tampão TAE. As bandas foram visualizadas pela irradiação do gel com luz UV no aparelho Epi Chemi II Darkroom da UVP BioImaging Systems (Cambridge, Inglaterra). A quantificação das bandas foi realizada com o software Labwork IV da UVP BioImaging Systems (Cambridge, Inglaterra). A quantidade de quebra de fita simples no DNA foi expressa pela porcentagem de plasmídeo na forma OC em relação à forma SC. Um fator de correção de 1,4 foi aplicado ao valor da forma SC para corrigir sua menor fluorescência em comparação com a forma OC.

*Tampão TAE pH 7,65 (50 vezes concentrado):* 242 g Tris; 57,1 mL ácido acético; 100 mL Na<sub>2</sub>EDTA 0,5 M (pH 8).

*Corante da amostra:* 20% Ficoll 400; Na<sub>2</sub>EDTA 0,1 M (pH 8); 1% SDS; 0,25% azul de bromofenol; 0,25% xileno cianol.

### 3.2.6 Incubações de DNA com SOD1 / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> / batocuproína

Incubações de DNA de timo de bezerro (1 mg) com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 e 5 mM) e SOD1 (10 e 30 μM do dímero) foram realizadas por 1 e 24 h a 37°C e 1000 rpm em tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM (pH 7,4) tratado com Chelex (v<sub>f</sub> = 500 μL), na presença ou não de batocuproína (1 mM) e HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (25 mM). Todos os controles foram incubados da mesma maneira. Cada tratamento foi realizado em triplicata.

### 3.2.7 Precipitação do DNA

Após as incubações, o DNA foi removido do meio reacional por precipitação. Para a precipitação de 1 mg de DNA, adicionou-se 5 μL de acetato de sódio 3 M e 500 μL de isopropanol 100%. A solução foi agitada e centrifugada por 5 min a 10.000 rpm. Por duas vezes, descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 500 μL de álcool e fez-se outra centrifugação. Na primeira, o álcool utilizado foi isopropanol 60%, e na segunda, etanol 70%. Descartou-se o sobrenadante e 500 μL de solução 0,1 mM de mesilato de desferroxamina foram acrescentados para ressuspender o DNA. A concentração do DNA foi determinada por espectrofotometria a 260 nm (uma solução 50 μg/mL apresenta A<sub>260</sub> = 1).

### 3.2.8 Hidrólise do DNA

Para a hidrólise de 100 μg de DNA, foram adicionados 2 μL de tampão acetato de sódio 1 M (pH 5,0) e 1 U de nuclease P<sub>1</sub> à amostra, para incubação a 37°C por 30 min. Em seguida, foram adicionados 10 μL de tampão tris-HCl 1 M (pH 7,4) com acetato de magnésio (100 mM) e 3 U de fosfatase alcalina, para outra incubação a 37°C por 1 h. O mesmo protocolo foi aplicado às amostras para a análise de 8-oxodGuo e 1,N<sup>2</sup>-εdGuo, com exceção de que, para a análise de 1,N<sup>2</sup>-εdGuo, 1 pmol de padrão interno [<sup>15</sup>N<sub>5</sub>]-1,N<sup>2</sup>-εdGuo foi adicionado à amostra de DNA antes do primeiro período de incubação. As enzimas foram

eliminadas ao fim da hidrólise pela adição de um volume de clorofórmio. Para a análise de 8-oxodGuo foram usados 100 µg de DNA, e para a análise de 1,N<sup>2</sup>-εdGuo, 300 µg de DNA.

### 3.2.9 Determinação de 8-oxodGuo

Amostras contendo 100 µg de DNA hidrolisado foram analisadas através de um sistema de HPLC/deteção eletroquímica, constituído por uma bomba LC10AD com injetor Shimadzu Rheodyne modelo 9125i (Kyoto, Japão), conectada a uma coluna Phenomenex Luna C<sub>18</sub> 5 µm de 250 mm x 4,6 mm (Utrecht, Holanda) resfriada a 16°C pelo forno de coluna CTO-10AS VP e ligada ao detector SPD-10 A UV-VIS da Shimadzu. A separação foi obtida através de um eluente isocrático contendo tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25 mM (pH 5,5) e 8% de metanol, com fluxo de 1 mL/min. A deteção eletroquímica foi feita através de um detector coulométrico ESA Coulochem II (Chelmsford, EUA), com cela analítica modelo 5010, acoplado a um sistema de aquisição de espectros Shimadzu Class LC10. O potencial do eletrodo foi fixado em +280 mV. A eluição dos nucleosídeos não modificados foi monitorada simultaneamente por deteção espectrofotométrica a 254 nm. A fração molar de 8-oxodGuo / dGuo de cada amostra de DNA foi determinada baseada na deteção coulométrica a 280 mV para a 8-oxodGuo e absorbância a 254 nm para dGuo. Curvas de calibração, feitas no intervalo da quantidade de dGuo e 8-oxodGuo esperadas nas amostras, foram utilizada para a quantificação. Todos os solventes utilizados foram previamente filtrados com filtros de 0,22 µm e degaseificados com gás He.

### 3.2.10 Síntese dos padrões 1,N<sup>2</sup>-εdGuo e [<sup>15</sup>N<sub>5</sub>]1,N<sup>2</sup>-εdGuo

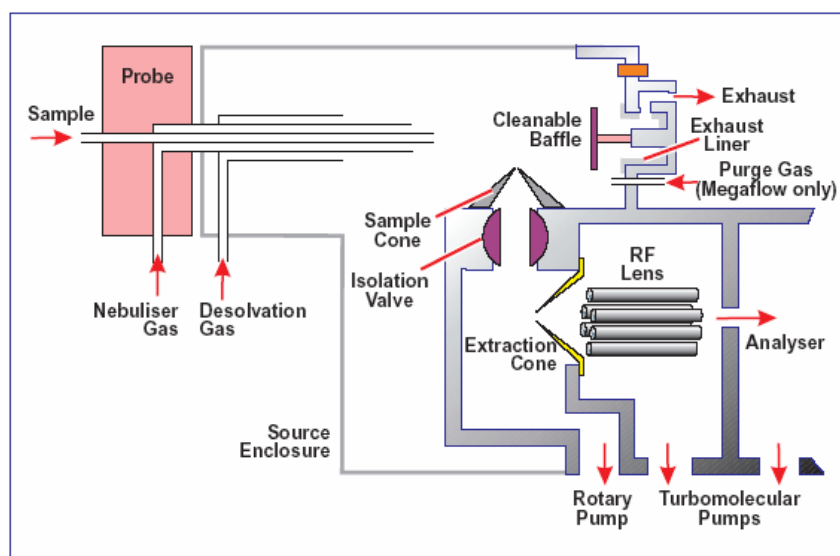
Os padrões de 1,N<sup>2</sup>-εdGuo e [<sup>15</sup>N<sub>5</sub>]1,N<sup>2</sup>-εdGuo foram obtidos pela reação de dGuo e [<sup>15</sup>N<sub>5</sub>]dGuo, respectivamente, com cloroacetaldeído. Após a reação, os padrões foram



purificados por HPLC e caracterizados por espectros de  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR e ESI/MS, como descrito por Loureiro e colaboradores (Loureiro, Di Mascio *et al.*, 2000).

### 3.2.11 Determinação de $1,N^2$ - $\epsilon$ dGuo

Análises por HPLC acoplada à detecção por espectrometria de massa em tandem operando com ionização por *electrospray* no modo positivo (HPLC/ESI/MS-MS) foram feitas num espectrômetro de massa com fonte do tipo Z-spray (**figura 3.1**) e detector triplo quadrupolo Quattro II da Micromass (Manchester, EUA), como descrito em Loureiro e colaboradores (Loureiro, Marques *et al.*, 2002). A fonte tipo Z-spray possui dois cones perpendiculares um ao outro que selecionam íons, dirigindo-os em um caminho em forma de “Z”. Grande parte das impurezas não ionizadas é descartada neste caminho, resultando em grande aumento da sensibilidade. Na fonte, a fase móvel proveniente do HPLC acoplado ao espectrômetro de massa é convertida a um spray aerossol eletrostaticamente carregado. O solvente é evaporado do spray por aquecimento e pela ação do gás de dessolvatação ( $\text{N}_2$ ). Os íons de analito e solvente são dirigidos por diferença de pressão e atração eletrostática à abertura do cone de amostra e depois para o cone extrator, pelo mesmo mecanismo.



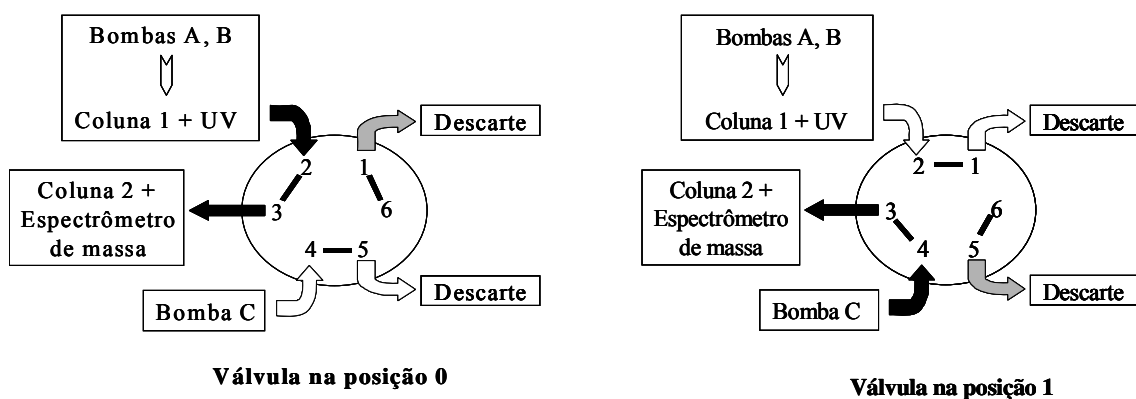
**Figura 3.1:** Diagrama do Z-spray (extraído de Z-spray API Source User's Guide).

Um sistema de HPLC da Shimadzu constituído por um auto-injetor (SIL-10AD/VP), uma válvula automática para direccionar o fluxo (FCV-12AH), duas bombas (Class LC 10 AD), uma coluna analítica Luna C18(2) (250 mm x 4.6 mm i.d., 5 µm) da Phenomenex, um detector espectrofotométrico SPD-10AV/VP controlado por um módulo de comunicação (SCL-10A/VP-CBM 10 A) e um software Class-VP foi utilizado para as análises. O aduto foi eluído da primeira coluna com um gradiente de ácido fórmico (0,1% em água) e acetonitrila, descrito na **tabela 3.1**.

**Tabela 3.1:** Gradiente de fase móvel para separação de 1,N<sup>2</sup>-εdGuo.

<b>Intervalo de tempo (min)</b>	<b>% de acetonitrila</b>	<b>Fluxo (mL/min)</b>
0 – 18	8	0,4
18 – 19	8 – 50	0,4 – 0,2
19 - 19.5	50	0,2 – 0,1
19,5 – 32	50	0,1
32 – 32,5	50	0,1 – 0,05
32.5 – 35	50	0,05
35 – 36	50	0,05 – 0,8
36 – 38	50	0,8
38 – 39	50 – 8	0,8
39 – 40	8	0,8 – 0,4

Uma terceira bomba Shimadzu LC-10AD foi usada para alimentar simultaneamente uma segunda coluna Phenomenex C18(2) Phenosphere-Next 3 µm 150mm x 2 mm, com um fluxo isocrático (0,05 mL/min) de uma solução (50:50) de solução aquosa 0,1% de ácido fórmico : acetonitrila, mantendo um fluxo constante da fase móvel para o espectrômetro de massa durante a análise. A válvula de troca de posição foi mudada duas vezes: a 24 min, permitindo que o eluente da primeira coluna entrasse na segunda coluna (**posição 0, figura 3.2**), e a 35 min, permitindo a lavagem da primeira coluna enquanto o aduto era eluído da segunda coluna para o espectrômetro de massa (**posição 1, figura 3.2**). O tempo total de análise foi de 50 min. As colunas foram mantidas a 22°C por um forno Shimadzu CTO-10AS VP.



**Figura 3.2:** Posições da válvula automática durante a análise em sistema HPLC/ESI/MS-MS.

DNA hidrolisado (300  $\mu\text{g}$ ) contendo 1 pmol de  $[^{15}\text{N}_5]$ -1, $N^2$ - $\epsilon$ dGuo como padrão interno foram injetados no sistema descrito acima. A detecção do aduto 1, $N^2$ - $\epsilon$ dGuo nas amostras de DNA foi feita por um monitoramento de reação múltipla (MRM). As transições  $m/z$  escolhidas para os íons 1, $N^2$ - $\epsilon$ dGuo e  $[^{15}\text{N}_5]$ -1, $N^2$ - $\epsilon$ dGuo  $[\text{M}+\text{H}]^+$  foram 292 para 176 e 297 para 181, respectivamente, com um tempo de residência de 1 segundo. O potencial do eletrodo capilar foi fixado em 3 kV e do eletrodo RF em 0 kV; a voltagem do cone de amostra e do cone extrator em 15 V e 4 V, respectivamente; a energia de colisão foi mantida em 10 eV; a pressão do gás de colisão (argônio) na célula de gás foi ajustada em  $3,9 \times 10^{-3}$  mbar; a temperatura da fonte foi fixada em 100°C e a temperatura de dessolvatação em 250°C; a taxa de fluxo do gás secante e nebulizador (nitrogênio) foi mantida a 350 e 10 L/h, respectivamente. Todos os outros parâmetros do espectrômetro de massa foram ajustados para aquisição da melhor transição  $[\text{M}+\text{H}]^+ / [\text{M}+\text{H}]^+-2\text{-D-eritro-pentose}$ . Os dados foram processados usando o software MassLynx da Micromass.

### 3.2.12 Cultura de neuroblastomas humanos

Neuroblastomas humanos da linhagem SH-SY5Y não transformados (SH) e expressando constitutivamente SOD1 humana nativa (WT) ou SOD1 humana mutante G93A

(G93A), foram gentilmente fornecidos pela Profa. Dra. Maria Teresa Carri da Universidade Tor Vergata de Roma, Itália. A transformação das células SH-SY5Y com SOD1 humana nativa ou mutante G93A foi realizada como descrito em Carri e colaboradores (Carri, Ferri *et al.*, 1997). As células foram cultivadas em meio DEMEM/HAM F12 (pH 7,4), com 15% (v/v) de soro fetal bovino (SFB), penicilina (0,04 g/L), sulfato de estreptomicina (0,1 g/L) e NaHCO<sub>3</sub> (3,7 g/L). Para manter a seleção, adicionou-se geneticina (0,2 g/L) ao meio utilizado nas células transformadas (o plasmídeo pRc/CMV utilizado para inserir o gene da SOD1 confere resistência a geneticina). O meio foi esterilizado por filtração (0,2 µm). As células foram incubadas em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> / ar a 37°C. No início da cultura celular, a suspensão de células (1 mL) foi descongelada e centrifugada a 1000 rpm por 2 min. No fluxo laminar estéril, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 1 mL do meio adequado. Após outra centrifugação, o sobrenadante foi novamente descartado e o pellet ressuspendido em 1 mL de meio. A suspensão de células foi transferida para uma garrafa pequena de cultura e mais 9 mL de meio foram adicionados. Para o repique das células, o meio foi aspirado e as células lavadas duas vezes com PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,47 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM) autoclavado. Em seguida, as células foram destacadas com 1 mL de tripsina 0,05% (p/v) preparada em PBS com Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM. Após 2 min, 25 mL de meio foram adicionados e a suspensão transferida para uma garrafa maior. Para o congelamento das células, 1 mL de dimetilsulfóxido foi adicionado a 10 mL de meio nesta etapa e a suspensão de células foi dividida em 10 frascos crio-gênicos. Os frascos ficaram 30 min no freezer a -20°C, 24 h no freezer a -80°C e foram estocados em nitrogênio líquido.

### 3.2.13 Contagem de células em hemocitômetro

As células foram destacadas com tripsina e ressuspendidas em meio de cultura novo. Uma gota da suspensão de células foi colocada sobre o hemocitômetro e coberta com

lamínula. A contagem foi realizada em cada um dos quatro quadrantes do hemocítômetro, observando através de microscópio óptico. Cada quadrante do hemocítômetro coberto com lamínula possui um volume de  $10^{-4} \text{ cm}^3$  (mL). A concentração de células por mL foi calculada multiplicando a média de células contadas em cada quadrante por  $10^4$ .

#### 3.2.14 Determinação da viabilidade celular após tratamento com $\text{H}_2\text{O}_2$

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de atividade mitocondrial utilizando brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT). O MTT é oxidado nas mitocôndrias das células viáveis ao composto insolúvel azul de formazan (Hansen, Nielsen *et al.*, 1989). Aproximadamente  $5 \times 10^5$  células (SH, WT e G93A, separadamente) foram colocadas em poços de 1,6 cm de raio com 1 mL de meio de cultura com SFB e incubadas por 16 h em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  / ar a  $37^\circ\text{C}$ . Em seguida, as células foram submetidas a tratamento com  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,5 mM) por 2 h em meio DEMEM/HAM F12 com SFB e em meio DMEM incolor sem SFB. O meio foi então aspirado e as células foram incubadas por mais 2 h em 1,5 mL de meio sem SFB + 300  $\mu\text{L}$  de MTT (5 mg/mL) em PBS. O sobrenadante foi removido e as células lisadas com 1 mL de solução 10% SDS em dimetilformamida :  $\text{H}_2\text{O}$  1:1 (v/v), para dissolução do azul de formazan. A viabilidade foi determinada pela absorbância a 595 nm da solução de formazan obtida das células tratadas e das células controle.

#### 3.2.15 Tratamento dos neuroblastomas com $\text{H}_2\text{O}_2$ para extração de DNA

Trinta e duas placas de petri (20 cm de diâmetro) de cada tipo celular (SH, WT e G93A) foram utilizadas para extração do DNA. Quando as placas atingiram 80% de confluência, o meio de cultura foi removido e, após lavagem com PBS, adicionou-se meio DEMEM/HAM F12 novo com SFB e sem geneticina (20 mL de suspensão em cada). Adicionou-se  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,5 mM a dezesseis placas. Após 2 h, o meio de cultura foi aspirado, as

células foram destacadas por raspagem e a suspensão de quatro placas foi transferida para um tubo corning (50 mL), resultando em quatro amostras tratadas e quatro controles. Este experimento completo foi repetido por quatro vezes independentes (n = 16).

### *3.2.16 Extração de DNA dos neuroblastomas pelo método caotrópico*

Após o tratamento, a suspensão de células foi centrifugada por 5 min a 3200 rpm. Por duas vezes seguidas, descartou-se o sobrenadante e foram adicionados 5 mL de tampão A, centrifugando novamente por 10 min a 3200 rpm. Descartou-se o sobrenadante e 4 mL de tampão B e 200 µL de SDS 10% foram acrescentados, agitando bastante. Em seguida, adicionou-se 30 µL de solução de RNase A (10 mg/mL em tampão acetato de sódio 10 mM pH 5,2 - previamente fervida por 15 min) e 8 µL de solução de RNase T<sub>1</sub> (20 U/µL em tampão C). Incubou-se a 37°C por 1 h. Foram acrescentados 150 µL de solução de proteinase K (20 mg/mL) e prosseguiu-se com outra incubação a 37°C por 1 h. O conteúdo foi transferido para um tubo córex (30 mL) e centrifugado por 15 min a 5000g. Coletou-se o sobrenadante e foram adicionados 2 mL de solução de NaI e 4 mL de isopropanol 100%, agitando bastante. Os tubos foram deixados no freezer por 24 h. Centrifugou-se por 15 min a 7000g. Por duas vezes, descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 1 mL de álcool e fez-se outra centrifugação. Na primeira o álcool utilizado foi isopropanol 60% e na segunda, etanol 70%. Descartou-se o sobrenadante e 400 µL de solução de mesilato de desferroxamina (0,1 mM) foram acrescentados. O tubo foi reservado em geladeira até completa dissolução do DNA. A concentração do DNA foi determinada por espectrofotometria a 260 nm e a sua pureza foi avaliada pela razão entre as absorvâncias a 260 e 280 nm:  $A_{260} / A_{280}$  maior do que 1,75. Os níveis de 8-oxodGuo e 1,N<sup>2</sup>-εdGuo no DNA extraído das células foi determinado como descrito nos itens 3.2.9 e 3.2.11, respectivamente.

*Tampão A:* sacarose 320 mM; MgCl<sub>2</sub> 5 mM; Tris 10 mM (pH 7,5); mesilato de desferroxamina 0,1 mM; Triton X-100 1%.

*Tampão B:* Tris 10 mM (pH 8,0); Na<sub>2</sub>EDTA 5 mM; mesilato de desferroxamina 0,15 mM.

*Tampão C:* Tris 10 mM (pH 7,4); Na<sub>2</sub>EDTA 1mM; mesilato de desferroxamina 2,5mM.

*Solução de NaI:* NaI 7,6 M; Tris 40 mM (pH 8,0); Na<sub>2</sub>EDTA 20 mM; mesilato de desferroxamina 0,3 mM.

### *3.2.17 Tratamento dos neuroblastomas para determinação da peroxidação lipídica*

Seis placas de petri (10 cm de diâmetro) de cada tipo celular (SH, WT e G93A) foram utilizadas para o estudo da peroxidação lipídica. Quando as placas atingiram 80% de confluência, o meio de cultura foi removido e, após lavagem com PBS, adicionou-se 7 mL de DMEM incolor sem SFB a cada placa. Três placas foram incubadas por 2 h a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM, e as outras ficaram como controle. Ao fim do tratamento, as células de cada placa foram raspadas e transferidas juntamente com o meio de cultura para um tubo. Uma alíquota da amostra foi reservada para dosagem de proteína (item 3.2.23). Este experimento completo foi repetido por três vezes independentes (n = 9).

### *3.2.18 Determinação do nível de peroxidação lipídica dos neuroblastomas*

O nível de peroxidação lipídica dos neuroblastomas foi determinado pela quantificação do aduto de malonaldeído (MDA), um aldeído resultante do processo de peroxidação de lipídios, com ácido tiobarbitúrico (TBA), de acordo com o método descrito por Tatum e colaboradores (Tatum, Changchit *et al.*, 1990).

Após o tratamento, adicionou-se à suspensão de células 7 mL de solução 0,4% (m/v) de TBA em HCl 0,2 N : H<sub>2</sub>O (2:1) (preparada imediatamente antes do uso) e 1 mL de solução 0,2% de hidroxitolueno butilado (BHT) em etanol 95%. A mistura foi incubada por 45 min

em banho a 90°C. Após esse período, os tubos foram resfriados em gelo e o aduto TBA-MDA foi extraído com 6 mL de isobutanol. Após centrifugação a 1000g por 5 min, a fase isobutanólica foi coletada para posterior quantificação do aduto TBA-MDA por HPLC.

### 3.2.19 Detecção e quantificação do aduto MDA-TBA

O aduto MDA-TBA foi separado em uma coluna Lichrosorb 10 RP-18 (250 mm x 4,6 mm, 10µm) (Phenomenex), utilizando-se fase móvel metanol : KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25 mM (pH 7,0) 1:1, com fluxo de 1 mL/min. A detecção do aduto foi feita por detector de fluorescência RF-10AXL, com comprimento de onda ( $\lambda$ ) de excitação de 515 nm e  $\lambda$  de emissão de 550 nm. O tempo total da análise foi de 6 min. Para a quantificação do aduto MDA-TBA, foi feita uma curva de calibração, preparada conforme descrito por Esterbauer e colaboradores (Esterbauer, Lang *et al.*, 1984), a partir de uma solução estoque de MDA preparada em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% (v/v). A concentração de MDA nesta solução foi determinada pela absorvância em 245 nm ( $\epsilon = 13700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) e soluções de MDA 60, 40, 20, 10, 1 e 0,5 µM foram preparadas. Adicionou-se 1 mL de solução de TBA 0,4% em HCl 0,2 N : H<sub>2</sub>O (2:1) a 1 mL de cada uma das soluções de MDA, e prosseguiu-se com incubação a 90°C por 45 min. Em seguida o aduto foi extraído com igual volume de isobutanol. O nível de MDA em cada amostra de célula foi expresso por mg de proteína na amostra.

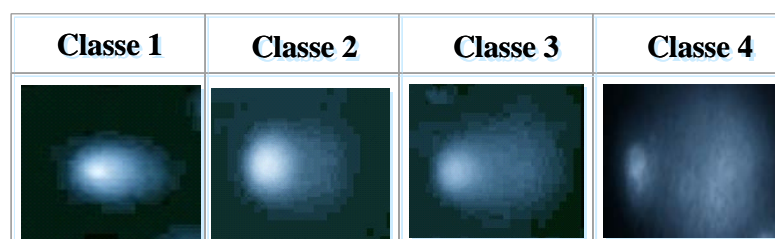
### 3.2.20 Estudo da fragmentação do DNA dos neuroblastomas (Ensaio Cometa)

Seis placas de petri (6 cm de diâmetro) de cada tipo celular (SH, WT e G93A) foram utilizadas para o ensaio cometa, seguindo o protocolo de Malyapa e colaboradores (Malyapa, Bi *et al.*, 1998). Quando as placas atingiram 80% de confluência, o meio de cultura foi removido e, após lavagem com PBS, adicionou-se meio novo com SFB sem genética. Adicionou-se H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 mM) a três placas. Após 2 h, o meio de cultura foi aspirado, as



células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e centrifugadas a 1000 rpm e 4°C por 8 min. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 500 µL de PBS. Uma alíquota de 20 µL desta suspensão (aproximadamente 10.000 células) foi misturada a 100 µL de agarose LMP (aquecida a 37°C). Depositou-se a mistura sobre uma lâmina contendo uma fina camada de agarose NMP (previamente preparada), e cobriu-se a lâmina com uma lamínula (24 x 60 mm). Após 5 min na geladeira, a lamínula foi retirada e a lâmina mergulhada em solução de lise para outra incubação na geladeira por 90 min. As lâminas foram retiradas da solução de lise (no escuro) e transferidas para a cuba de eletroforese (dentro de um banho de gelo), onde ficaram descansando por 20 min mergulhadas no tampão gelado para eletroforese. Em seguida, a cuba foi submetida a 25 V / 300 mA por 20 min. Ao fim da corrida, as lâminas foram lavadas por três vezes em tampão de neutralização, mergulhadas em etanol 100%, e coradas com 50 µL de solução de brometo de etídio (20 µg/mL), imediatamente antes da leitura em microscópio óptico de epifluorescência Diaphot 300 da Nikon (Tóquio, Japão) com filtro de 510-560 nm e barreira de 590 nm. Este experimento completo foi repetido por três vezes independentes (n = 9). O índice de dano ao DNA foi determinado pela contagem e classificação dos “cometas” (células com cauda de DNA fragmentado) observados em uma lâmina. Os “cometas” foram classificados em uma escala de 1 a 4 (como mostrado na **figura 3.3**), e o índice do dano foi calculado de acordo com a equação abaixo.

$$\text{Índice de dano ao DNA} = [(\text{n}^\circ \text{ de cometas classe 1} \times 0) + (\text{n}^\circ \text{ de cometas classe 2} \times 1) + (\text{n}^\circ \text{ de cometas classe 3} \times 2) + (\text{n}^\circ \text{ de cometas classe 4} \times 3)].$$



**Figura 3.3:** Imagens e pontuações de cada classe de cometas observados.

*Solução de lise (estoque):* 800 mL de água destilada; 146,1 g de NaCl; 37,2 g de Na<sub>2</sub>EDTA; 1,2 g de Tris (pH 10).

*Solução de lise:* 89 mL de solução estoque de lise; 10 mL de DMSO; 1 mL de Triton X-100.

*Solução A:* NaOH 10 M.

*Solução B:* Na<sub>2</sub>EDTA 200 mM (pH 10).

*Tampão para eletroforese pH 13:* 30 mL de solução A, 5 mL de solução B, H<sub>2</sub>O q.s.p. 1 L.

*Tampão neutralizador:* Tris 0,4 M (pH 7,5).

*Agarose NMP 1,5%:* 300 mg de agarose ponto de fusão normal em 20 mL de PBS (PF=60°C).

*Agarose LMP 0,5%:* 100 mg de agarose baixo ponto de fusão em 20 mL de PBS (PF=37°C).

### *3.2.21 Transfecção transitória dos neuroblastomas para análise da atividade de p53 através de ensaios de atividade dos genes repórter luciferase e renilla luciferase*

Este experimento foi realizado em colaboração com o Dr. Antero F.A. Macedo, orientado pela profa. Mari Cleide Sogayar, do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP. As três linhagens celulares (SH, WT e G93A) foram plaqueadas em placas de 24 poços (2 cm<sup>2</sup> de área), na densidade de 10<sup>5</sup> células por poço, um dia antes da transfecção. Um total de 0,2 µg de DNA foi usado por poço a ser transfectado, sendo 0,16 µg do vetor p53-luc e 0,04 µg do vetor pRL-TK. O vetor p53-Luc contém o gene da luciferase com um promotor responsivo a p53, ou seja, se p53 é ativado, a transcrição da luciferase é promovida. O vetor pRL-TK foi usado para o controle da eficiência da transfecção. Ele contém o gene da renilla luciferase com um promotor da timidina quinase, ou seja, a transcrição da renilla luciferase é promovida em condições basais na célula. O reagente FuGene 6 da Roche (Basel, Suíça) foi usado como agente carreador para as transfecções. Para cada poço, 0,6 µL de FuGene 6 foi diluído em 20 µL de meio DEMEM / HamF12, na ausência de SFB. Após 5 min, os vetores foram adicionados ao FuGene 6 diluído e incubados

por 15 min, antes de serem adicionados às células. Após 24 h, o meio de cultura foi renovado e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 mM) foi adicionado às células por 2 h. As células foram lisadas com o tampão de lise PLB da Promega (Madison, EUA) e a atividade dos genes repórter luciferase e renilla luciferase foi quantificada em um luminômetro, utilizando o sistema Promega Dual-Luciferase Reporter Assay System, que utiliza dois substratos diferentes, um para cada enzima. A atividade de p53 foi definida como a razão entre a atividade da luciferase pela atividade da renilla luciferase em cada amostra. Este experimento completo foi repetido por três vezes independentes (n = 9).

### *3.2.22 Isolamento de proteínas dos núcleos das células SH-SY5Y*

O isolamento e fracionamento dos núcleos foram realizados baseando-se no método de Fey e Penman (Fey e Penman, 1984). Os três tipos celulares foram cultivados até a 12<sup>o</sup> passagem para a extração dos núcleos. As quantidades de reagentes descritas a seguir são referentes a uma placa de petri (15 cm de diâmetro). O meio de cultura foi removido e as células foram lavadas e raspadas em PBS. Após centrifugação a 1500 rpm por 5 min a 4°C, o sobrenadante foi coletado e o pellet ressuscitado em tampão CSK sem Triton. Outra centrifugação foi realizada, o sobrenadante descartado e o pellet ressuscitado em 100 µL de tampão CSK. Após incubação a 4°C por 10 min, a suspensão foi centrifugada a 3.300 g por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado para a análise das proteínas citoplasmáticas solúveis. O pellet de núcleos foi ressuscitado em 100 µL de tampão RSB-Majic e incubado a 4°C por 15 min. Uma centrifugação a 20.000 g por 5 min a 4°C foi realizada para a separação das proteínas nucleares solúveis (sobrenadante). O sedimento foi lavado com 50 µL de tampão de digestão sem DNase e RNase, centrifugado, ressuscitado em 50 µL de tampão de digestão e incubado a 20°C por 1 h. Adicionou-se sulfato de amônio 2,5 M (5 µL) para dissociar as proteínas da cromatina. Após incubação a temperatura ambiente por 5 min, a suspensão foi

centrifugada a 20.000 g por 10 min a 20°C. O sobrenadante foi coletado para análise das proteínas associadas à cromatina. A quantidade de proteína em cada fração foi determinada pelo método de Bradford, descrito no item 3.2.23.

*Tampão CSK*: NaCl 100 mM; sacarose 300 mM; MgCl<sub>2</sub> 3 mM; EGTA 1 mM; NaF 10 mM; Pipes 10 mM (pH 6,8); 0,5% Triton X-100 (v/v); PMSF\* 1,2 mM; aprotinina\* 1 µg/mL; leupeptina\* 5 µg/mL; pepstatina\* 1 µg/mL.

*Tampão RSB-Majic*: NaCl 10 mM; NaF 10 mM; Tris 10 mM (pH 7,4); 1% Tween 20 (v/v); 0,5% deoxicolato de sódio (m/v); PMSF\* 1,2 mM; aprotinina\* 1 µg/mL; leupeptina\* 5 µg/mL; pepstatina\* 1 µg/mL.

*Tampão de digestão*: NaCl 50 mM; sacarose 300 mM; MgCl<sub>2</sub> 3 mM; EGTA 1 mM; NaF 10 mM; Pipes 10 mM (pH 6,8); 0,5% Triton X-100 (v/v); PMSF\* 1,2 mM; aprotinina\* 1 µg/mL; leupeptina\* 5 µg/mL; pepstatina\* 1 µg/mL; DNase I\* 30 U/50µL; RNase A\* 50 µg/mL.

\* Os inibidores de proteases e as enzimas foram adicionados aos tampões somente na hora do uso. Segue abaixo a lista de soluções estoque dos inibidores e das nucleases:

*DNase I*: 10 U/µL em tampão próprio indicado pelo fabricante (estocar a -20°C)

*RNase A*: 0,5 g/L em tampão próprio indicado pelo fabricante (estocar a 4°C)

*PMSF*: 0,24 M em isopropanol (estocar a -20°C)

*Aprotinina*: 1 g/L em HEPES 0,01 M pH 8 (estocar a -20°C, não recongelar)

*Pepstatina*: 1 g/L em etanol (estocar a -20°C)

*Leupeptina*: 1g/L em H<sub>2</sub>O (estocar a -20°C)

### 3.2.23 Dosagem de Proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada segundo Bradford (Bradford, 1976). Uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  de amostra foi diluída com 90  $\mu\text{L}$  de NaCl 0,15 M e 5 ml de reagente de Bradford para leitura no espectrofotômetro (595 nm, em cubeta de 3 ml). Para a quantificação da proteína foi preparada uma curva de calibração com albumina bovina a partir de uma solução estoque 1 mg/mL, diluída em NaCl 0,15 M ( $v_f = 100 \mu\text{L}$ ) e 5 ml de reagente de Bradford.

*Reagente de Bradford:* 100 mg de azul brilhante de coomassie G-250 dissolvidos em 50 mL de etanol 95%; 100 mL de ácido fosfórico 85% (p/v); H<sub>2</sub>O q.s.p. 1 L.

### 3.2.24 Eletroforese em gel de acrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)

A mistura para o gel de resolução foi preparada e despejada entre dois vidros espaçados por 1 mm, utilizados como suporte para o gel. Adicionou-se lentamente um filme de isobutanol sobre o gel de resolução. Após polimerização, o álcool foi retirado e a mistura para o gel de empacotamento foi despejada sobre o gel de resolução, colocando o pente para aplicação da amostra. Após polimerização, o pente foi retirado e o gel imerso na cuba de eletroforese contendo tampão de corrida. A cada amostra (20  $\mu\text{L}$ ), adicionou-se 5  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra, e a mistura foi submetida a 100°C por 5 min para desnaturação das proteínas. Em seguida, a mistura foi aplicada no gel submerso em tampão de corrida e prosseguiu-se com a eletroforese a 100 V por 2 h. Utilizou-se marcador de peso molecular Amersham Full Range Rainbow (Little Chalfont, Inglaterra).

*Tampão de corrida:* Tris 25 mM (pH 8,3); glicina 250 mM; 0,1% SDS.

*Tampão de amostra* (4 vezes concentrado): Tris 200 mM (pH 6,8); 8% SDS; 0,4% azul de bromofenol; 40% glicerol. Na hora do uso adicionar 20%  $\beta$ -mercaptoetanol.

*Acrilamida/bis-acrilamida:* 29 g acrilamida; 1 g bis-acrilamida; H<sub>2</sub>O q.s.p. 100 mL; pH 7

*Tampão de resolução:* Tris 1,5 M (pH 8,8).

*Tampão de empacotamento:* Tris 1 M (pH 6,8).

*Gel de resolução 15%:* 2,3 mL H<sub>2</sub>O; 5 mL acrilamida/bis-acrilamida; 2,5 mL de tampão de resolução; 100  $\mu$ L SDS 10%; 100  $\mu$ L persulfato de amônio 10%; 4  $\mu$ L TEMED.

*Gel de empacotamento 5%:* 1,4 mL H<sub>2</sub>O; 330  $\mu$ L acrilamida/bis-acrilamida; 250  $\mu$ L de tampão de empacotamento; 20  $\mu$ L SDS 10%; 20  $\mu$ L persulfato de amônio 10%; 2  $\mu$ L TEMED.

### 3.2.25 Western Blot das proteínas do núcleo das células SH-SY5Y

Uma alíquota contendo 40  $\mu$ g de proteína de cada uma das frações obtidas no item 3.2.22 para os três tipos celulares (SH, WT e G93A) foi separada por eletroforese em gel de poliacrilamida 15%. As proteínas foram transferidas do gel para membrana de nitrocelulose Amersham Hybond-C Extra com o auxílio de tampão de transferência e do equipamento Bio-rad *semi-dry* (Hercules, EUA). A membrana e cinco pedaços de papel de cromatografia foram embebidos em tampão de transferência. Sobre dois papéis de cromatografia, colocou-se a membrana, o gel e mais três papéis de cromatografia. Ligou-se o equipamento *semi-dry* a 10 V por 1 h. A membrana foi lavada com tampão TBS por 3 vezes de 10 min e bloqueada com TBST contendo 5% de leite desnatado (incubação em temperatura ambiente por 2 h). O excesso da solução bloqueadora foi removido por 3 lavagens de 10 min com TBST. A membrana foi incubada *overnight* com anticorpo primário anti-SOD1 humana da Calbiochem (Darmstadt, Alemanha) (diluição 1:1500 ou  $C_f = 10 \mu\text{g/mL}$ , preparada em TBST contendo

0,1% de leite em pó desnatado) e novamente lavada com TBST. A incubação com anticorpo secundário anti-IgG (ovelha) conjugado com peroxidase da Calbiochem (diluição 1:10.000 ou  $C_f = 10$  ng/mL), também preparado em TBST contendo 0,1% de leite desnatado, foi feita por 1 h, seguida por lavagens com TBST. A presença da SOD1 foi revelada em filme de raio-X após tratamento da membrana por 5 min com soluções de peróxido e luminol do kit de detecção SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate da Pierce Biotechnology (Rockford, EUA). A mesma membrana foi lavada e o procedimento acima foi repetido utilizando os anticorpos primários anti-cFos da Santa Cruz (Santa Cruz, EUA) (diluição 1:250 ou  $C_f = 2,5$  µg/mL) e anti-histona H1 da Upstate (Danvers, EUA) (diluição 1:1000 ou  $C_f = 1$  µg/mL) e os respectivos anticorpos secundários anti-IgG (coelho e camundongo) conjugados com peroxidase da Calbiochem (diluição 1:10.000 ou  $C_f = 10$  ng/mL).

*Tampão TBS:* NaCl 150 mM; Tris 50 mM (pH 7,5).

*Tampão TBST:* tampão TBS acrescido de 0,05% (v/v) de Tween-20.

*Tampão de transferência:* Tris 48 mM (pH 8,3); glicina 39 mM; SDS 0,037%; metanol 20%.

### 3.2.26 Determinação da atividade SOD1 dos extratos celulares em gel de acrilamida

A determinação da atividade da SOD1 em gel foi realizada como descrito por Beauchamp (Beauchamp e Fridovich, 1971). Uma alíquota contendo 60 µg de proteína de cada uma das frações obtidas no item 3.2.22 para os três tipos celulares (SH, WT e G93A) foi separada por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% não denaturante (o gel não denaturante é feito na ausência de SDS; o tampão de amostra não tem SDS e β-mercaptoetanol, e a amostra não é fervida). Um padrão de SOD1 humana purificada foi aplicado como controle (400 ng). Ao fim da eletroforese (130 V por 2 h), o gel foi retirado e incubado por 20 min em solução A, coberto por papel alumínio, com leve agitação. O papel

alumínio foi retirado e 25 mL de solução B foram adicionados. Após alguns minutos, o gel tornou-se azul escuro e bandas claras apareceram onde havia atividade superóxido dismutásica.

*Solução A:* 25 mg nitro blue tetrazolium (NBT), 10 mg riboflavina, 100 mL de H<sub>2</sub>O. Preparar imediatamente antes do uso. Manter a solução sob abrigo da luz.

*Solução B:* 1% TEMED em H<sub>2</sub>O. Preparar imediatamente antes do uso.

### 3.2.27 Determinação da atividade SOD1 dos extratos celulares em espectrofotômetro

Análises espectrofotométricas da atividade SOD1 nos extratos celulares foram realizadas como descrito por Beauchamp (Beauchamp e Fridovich, 1971). As reações foram realizadas a 37°C em tampão carbonato de sódio 50 mM (pH 10,2) com ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA) 100 µM, xantina 100 µM, NBT 56 µM, catalase 1 U/mL e xantina oxidase 0,1 U/mL. A redução do NBT pelo superóxido gerado pelo sistema xantina/xantina oxidase a 37°C foi acompanhada a 560 nm em um espectrofotômetro UV-1650PC (Shimadzu). A velocidade da redução do NBT foi determinada pela regressão linear da curva de absorbância x tempo entre 60 e 120 min de reação. A atividade SOD1 foi quantificada pela inibição da redução do NBT na presença de proteínas do extrato total e nuclear (60 µg) obtido a partir dos três tipos celulares (SH, WT e G93A). Uma unidade de SOD1 foi definida como a quantidade de extrato de proteína capaz de inibir a velocidade da redução do NBT em 50%. Para obter os extratos totais, as células foram lisadas por congelamento e descongelamento em PBS com DTPA (100 µM) e inibidores de proteases. Para obter os extratos nucleares, os núcleos dos neuroblastomas foram isolados como descrito no item 3.2.22 e também lisados por congelamento e descongelamento. O congelamento foi realizado por imersão de balão volumétrico contendo a suspensão de núcleos em acetona com



gelo seco, com o cuidado de se formar uma camada fina na parede do balão, garantindo congelamento homogêneo. Após 10 min descongelou-se em banho a 37° C. Este processo foi repetido 5 vezes e posteriormente o sobrenadante foi centrifugado (13.000 rpm, 30 min) e usado imediatamente. Este experimento completo foi repetido por três vezes independentes (n = 9).

### *3.2.28 Quantificação da atividade peroxidásica da SOD1 dos extratos celulares em espectrofotômetro*

O método para determinação da atividade peroxidásica da SOD1 nos extratos celulares foi adaptado de Zhang e colaboradores (Zhang, Joseph *et al.*, 2002). Para obter os extratos totais, as células foram lisadas por congelamento e descongelamento em PBS com DTPA (100  $\mu$ M) e inibidores de proteases, como descrito no item 3.2.27. Para obter os extratos nucleares, os núcleos dos neuroblastomas foram isolados como descrito no item 3.2.22 e também lisados por congelamento e descongelamento. Um alíquota contendo 100  $\mu$ g de proteínas totais ou proteínas nucleares foi incubada com dihidrorodamina (DHR) (80  $\mu$ M), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 mM) e DTPA (100  $\mu$ M) em tampão fosfato de sódio (pH 6,8) tratado com Chelex, na presença ou não de bicarbonato de sódio (25 mM). A oxidação do DHR a 37°C foi acompanhada a 500 nm em um espectrofotômetro Shimadzu UV-1650PC. A velocidade de oxidação da DHR foi determinada pela regressão linear da curva de absorbância x tempo entre 60 e 120 min de reação. Uma unidade de atividade peroxidásica da SOD1 foi definida como a quantidade de extrato de proteína capaz de promover a oxidação da DHR em uma velocidade de 1  $\mu$ M/min ( $\epsilon_{500} = 78.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Para a determinação da atividade peroxidásica da SOD1 nos extratos, a velocidade de oxidação da DHR na ausência de bicarbonato foi subtraída da velocidade da oxidação de DHR na presença de bicarbonato. Este experimento completo foi repetido por três vezes independentes (n = 9).

*3.2.29 Determinação do consumo de ascorbato e da concentração intracelular de ascorbato das células SH-SY5Y utilizando microeletrodo modificado com filme de óxido de rutênio hexacianoferrato*

O consumo de ascorbato pelos três tipos celulares (SH, WT e G93A) foi acompanhado pelo decaimento da concentração de ascorbato no meio de cultura por 3 h, medido através da corrente referente ao processo de oxidação do ascorbato no microeletrodo. Um dia antes das medidas,  $10^6$  células foram plaqueadas em uma placa de 12 poços, em meio DMEM-HAM F12 com 15% de SFB. Imediatamente antes das medidas, as células foram lavadas com PBS e foram adicionados 2 mL de meio MEM incolor sem SFB, com glutathiona reduzida (GSH) (0,5 mM) e ascorbato (0,2 mM). Os experimentos foram realizados com sistema de três eletrodos: fio de platina como eletrodo auxiliar, eletrodo de Ag/AgCl saturado como eletrodo de referência, e microeletrodo de carbono vítreo ( $r = 14 \mu\text{m}$ ) modificado com filme de óxido de rutênio hexacianoferrato (RuOHCF) como eletrodo de trabalho. O microeletrodo de RuOHCF foi desenvolvido pelo Dr. Thiago R.L.C. Paixão, orientado pelo prof. Dr. Mauro Bertotti, do Departamento de Química Analítica do Instituto de Química da USP. Os três eletrodos foram mergulhados no meio de cultura sobre as células e medidas de corrente foram tomadas de 1 em 1 min por 3 h, à temperatura ambiente, utilizando um potenciostato portátil da PalmSens a 0 V (Houten, Holanda), conectado a um microcomputador. O número de células em cada poço foi normalizado por contagem em hemocitômetro antes do experimento e dosagem de proteína depois do experimento. Um controle na ausência de células foi realizado para avaliar a oxidação do ascorbato pelo ar neste sistema. Este experimento completo foi repetido por três vezes independentes ( $n = 3$ ).

Para a determinação da concentração intracelular de ascorbato, as células foram incubadas por 3 h em meio MEM contendo GSH (0,5 mM), na presença ou não de ascorbato (0,2 mM). Após a incubação, o meio de cultura foi renovado. Um microeletrodo de RuOHCF

tipo agulha foi construído inserindo os fios de carbono vítreo modificado dentro de uma pipeta pasteur, com a ajuda de um Micropipet puller da Sutter Instrument (Novato, USA). Este microeletrodo foi fixado em um micromanipulador acoplado a um microscópio óptico de epifluorescência Diaphot 300 da Nikon (Tóquio, Japão). Ascorbato ( $C_f = 1 \text{ mM}$ ) foi injetado no meio de cultura e a corrente transiente registrada para estimativa da concentração intracelular de ascorbato. Em seguida, a ponta do mesmo eletrodo foi introduzida em uma única célula aderida sobre placa de petri, observando através do microscópio. Os eletrodos auxiliar e de referência foram imersos no meio de cultura para que as medidas de corrente fossem tomadas. Imagens foram adquiridas utilizando o software RSIimage versão 1.9.2 da Roper Scientific (Pleasanton, USA).

### *3.2.30 Análises estatísticas*

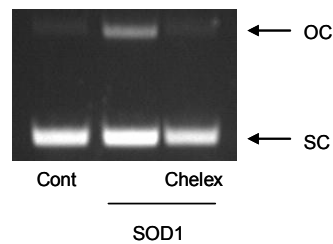
Análises estatísticas foram feitas pelo teste One-Way Analysis of Variance (ANOVA) seguido do teste Tukey Multiple Comparison. Os valores foram considerados estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .

## 4. Resultados

### 4.1 Estudos *in vitro* com SOD1 bovina

#### 4.1.1 Eliminação de metais contaminantes da SOD1 bovina

A incubação do plasmídeo pBlueScript somente com a SOD1 resultou na formação de quebras de fita simples no DNA. Este efeito foi completamente eliminado pelo tratamento da enzima com a resina Chelex 100, indicando a presença de metais contaminantes na preparação de SOD1 (**figura 4.1**). A concentração de SOD1 em solução e sua atividade não foram alteradas pelo tratamento com Chelex. A enzima purificada não promoveu mais quebras no DNA e foi utilizada em todos os experimentos da sessão 4.1.

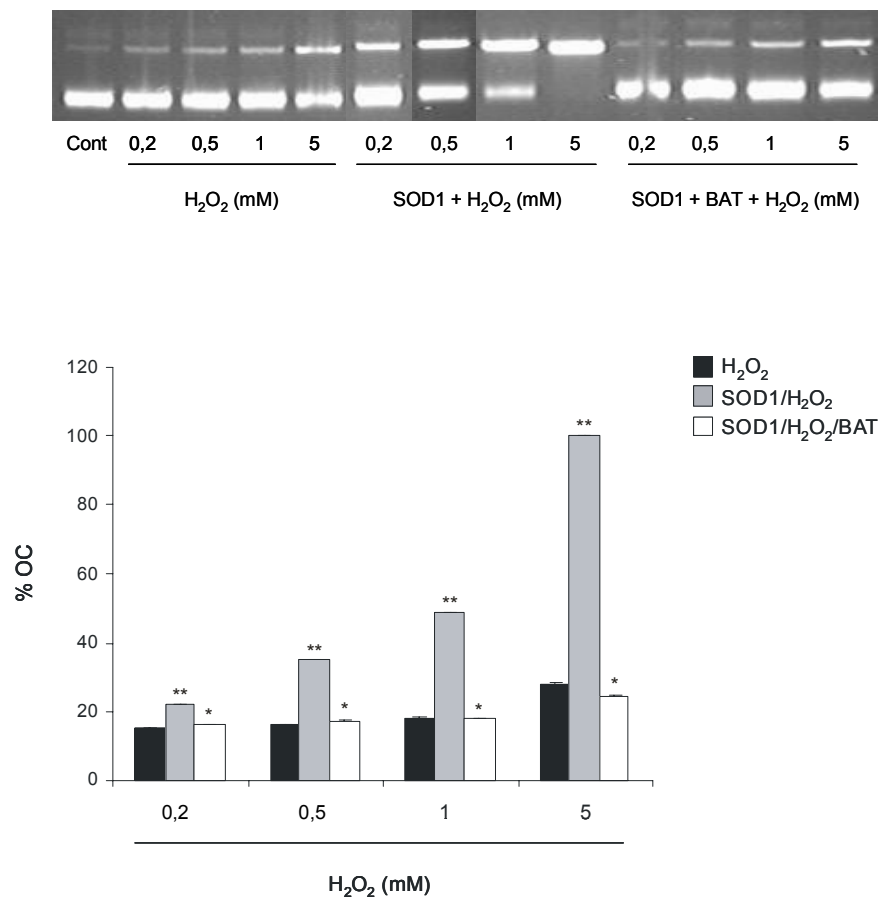


**Figura 4.1:** Gel de agarose com plasmídeo pBlueScript controle (Cont), incubado com SOD1 (10  $\mu$ M) por 1 h a 37°C e 500 rpm, e incubado com SOD1 pré-tratada com Chelex 100 (Chelex). OC: pBlueScript na forma circular aberta resultante de quebra de fita simples do DNA. SC: pBlueScript na forma intacta super enovelada.

#### 4.1.2 Quebras no DNA plasmidial promovidas pelo sistema SOD1/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

A exposição do plasmídeo ao sistema SOD1/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levou à formação de quebras de fita simples no DNA. Este efeito da SOD1 pôde ser observado de 0,2 a 5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 4.2). A adição de SOD1 causou um aumento da quantidade de plasmídeo na forma circular aberta (OC) de 1,5 / 2 / 3 / 3,5 vezes em relação às incubações somente com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,2 / 0,5 / 1 / 5 mM, respectivamente. As quebras no DNA induzidas pelo sistema SOD1/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram

significativamente reduzidas pela adição do quelante de  $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$  batocuproína (**figura 4.2**). Este resultado aponta o envolvimento de íons de cobre liberados do sítio ativo da SOD1 na formação das quebras de DNA. Os íons de cobre liberados da SOD1 podem se ligar diretamente ao DNA (Sagripani, 1991) e catalisar a formação *in situ* de radicais hidroxila, os quais atacariam os resíduos de ribose, resultando na quebra da fita de DNA. A batocuproína compete com o DNA pelo cobre liberado, inibindo a reação de Fenton.

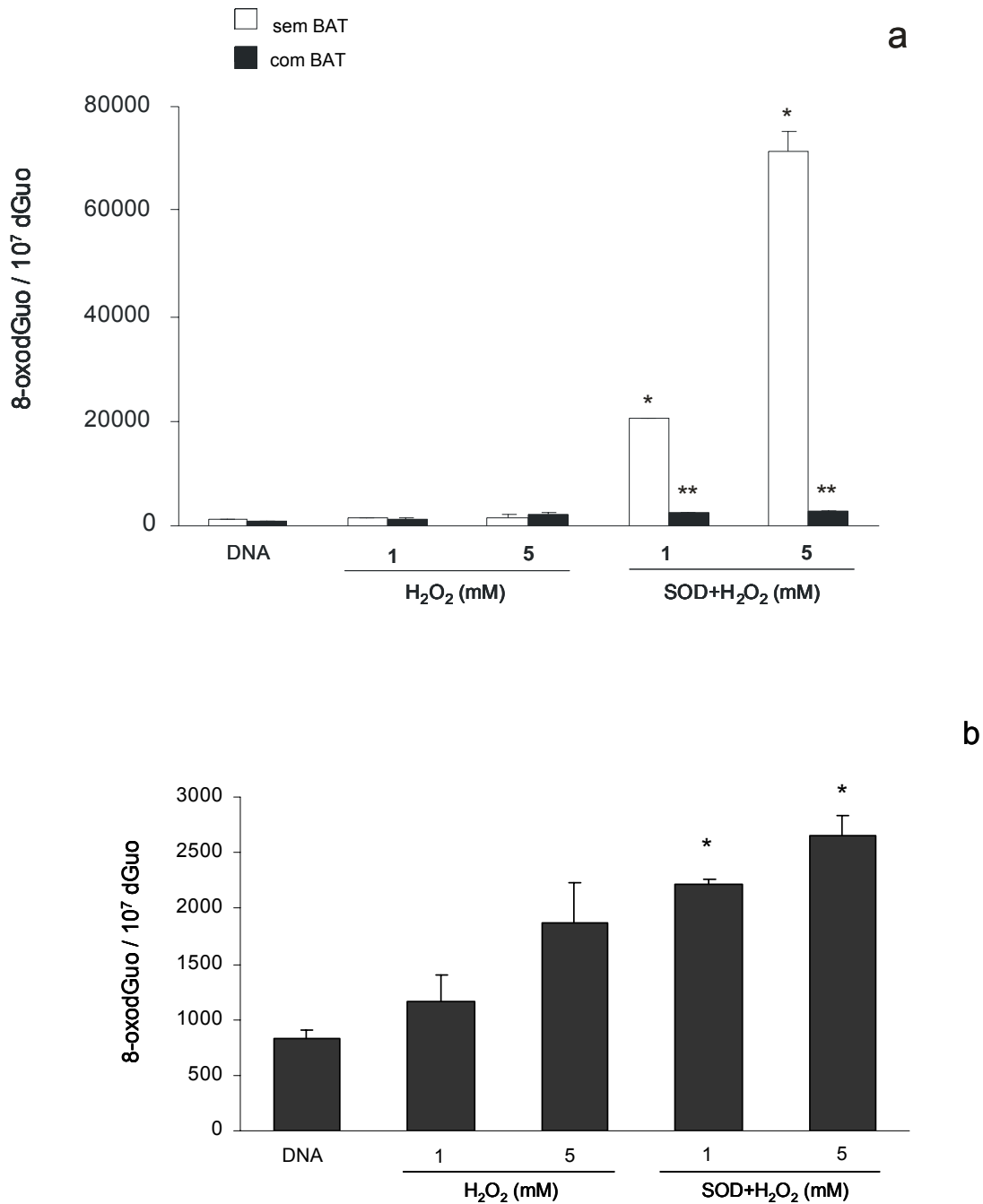


**Figura 4.2:** Gel de agarose com plasmídeo pBlueScript controle (Cont) e incubado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas concentrações indicadas, SOD1 (10  $\mu\text{M}$  do dímero) e batocuproína 1 mM (BAT) por 1 h. OC: pBlueScript na forma circular aberta resultante de quebra de fita simples do DNA. SC: pBlueScript na forma intacta super enovelada. Porcentagem de plasmídeo na forma OC. Cada valor representa a média  $\pm$  desvio padrão de três amostras diferentes. O erro em alguns tratamentos é muito pequeno para ser visualizado no gráfico. \*\*Significativamente diferente da incubação sem SOD1 e mesma concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (One-way ANOVA,  $p < 0,001$ ). \*Significativamente diferente da mesma incubação sem batocuproína (One-way ANOVA,  $p < 0,001$ ).

#### 4.1.3 Formação de 8-oxodGuo em DNA promovida pelo sistema SOD1/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

A exposição de DNA de timo de bezerro ao sistema SOD1/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1 h levou a aumento significativo dos níveis de 8-oxodGuo. Os níveis de 8-oxodGuo foram 14 e 43 vezes maiores do que os níveis em DNA incubado somente com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 e 5 mM, respectivamente (**figura 4.3a**). A adição de batocuproína preveniu a formação de 8-oxodGuo, indicando que, assim como as quebras de DNA, esta lesão é principalmente promovida por íons de cobre liberados da SOD1, os quais podem se ligar diretamente ao DNA e catalisar a formação de radicais hidroxila *in situ*. Frelon e colaboradores mostraram que o sistema cobre / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode oxidar o DNA por um elétron por uma via independente da formação de radicais hidroxila, ainda não esclarecida. Além disso, <sup>1</sup>O<sub>2</sub> também pode ser gerado neste sistema, promovendo oxidações por dois elétrons (Frelon, Douki *et al.*, 2003). Estas hipóteses também podem se aplicar ao sistema SOD1/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Um pequeno, mas significativo aumento nos níveis de 8-oxodGuo foi, ainda, observado na presença de batocuproína, apontando o envolvimento de um outro mecanismo, responsável por 4% e 1,4% da 8-oxodGuo promovida pela SOD1 na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 e 5 mM, respectivamente (**figura 4.3b**). A interação direta da SOD1 com o DNA poderia estar envolvida com este outro mecanismo, pois dificultaria a formação do complexo cobre-batocuproína, uma vez que o cobre liberado da SOD1 se ligaria preferencialmente ao DNA e não à batocuproína.



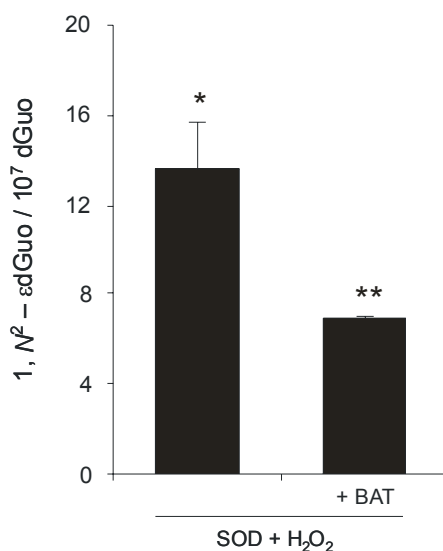
**Figura 4.3:** (a) Níveis de 8-oxodGuo em DNA controle (DNA) e incubado somente com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 e 5 mM), ou com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e SOD1 (10 μM do dímero) por 1 h, na presença ou não de batocuproína 1 mM (BAT). (b) Destaque dos níveis de 8-oxodGuo das incubações na presença de batocuproína. Cada valor representa a média ± desvio padrão de três amostras diferentes. O erro em alguns tratamentos é muito pequeno para ser visualizado no gráfico. \*Significativamente diferente da incubação sem SOD1 e mesma concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (One-way ANOVA,  $p < 0,001$ ). \*\*Significativamente diferente da mesma incubação sem batocuproína (One-way ANOVA,  $p < 0,001$ ).

#### 4.1.4 Formação de 1,N<sup>2</sup>-εdGuo em DNA promovida pelo sistema SOD1/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

A formação de 1,N<sup>2</sup>-εdGuo (13 adutos/10<sup>7</sup> dGuo) também foi observada após 24 h de incubação de DNA de timo de bezerro com SOD1 (30 μM do dímero) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 mM (**figura 4.4**). Nestas condições experimentais, o aduto 1,N<sup>2</sup>-εdGuo não foi detectado no DNA controle ou incubado somente com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Nas condições de reação onde foi detectada a formação de 8-oxodGuo, o aduto 1,N<sup>2</sup>-εdGuo não foi formado. Esta observação não é surpreendente, já que a 8-oxodGuo é o produto da adição direta do radical hidroxila à dGuo (Cadet, Delatour *et al.*, 1999), enquanto que o 1,N<sup>2</sup>-εdGuo é o produto de um mecanismo muito mais complexo que envolve a reação de um aldeído com a dGuo (Bartsch, Barbin *et al.*, 1994). *In vivo*, estes aldeídos são gerados principalmente pela peroxidação de lipídios (Chung, Chen *et al.*, 1996). Mas, neste sistema *in vitro*, a única fonte de aldeído é o próprio DNA. Radicais hidroxila gerados pelo sistema SOD1/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podem oxidar a 2'-desoxiribose resultando na formação de aldeídos reativos. A formação de adutos de dGuo com aldeídos provenientes da oxidação da 2'-desoxiribose já foi demonstrada (Awada e Dedon, 2001; Regulus, Duroux *et al.*, 2007).

A adição de batocuproína reduziu os níveis de 1,N<sup>2</sup>-εdGuo em 50%, apontando a participação de íons de cobre liberados da SOD1 na formação do aduto e também de um segundo mecanismo, não afetado pela batocuproína, que poderia ocorrer se a SOD1 estivesse associada ao DNA (**figura 4.4**).

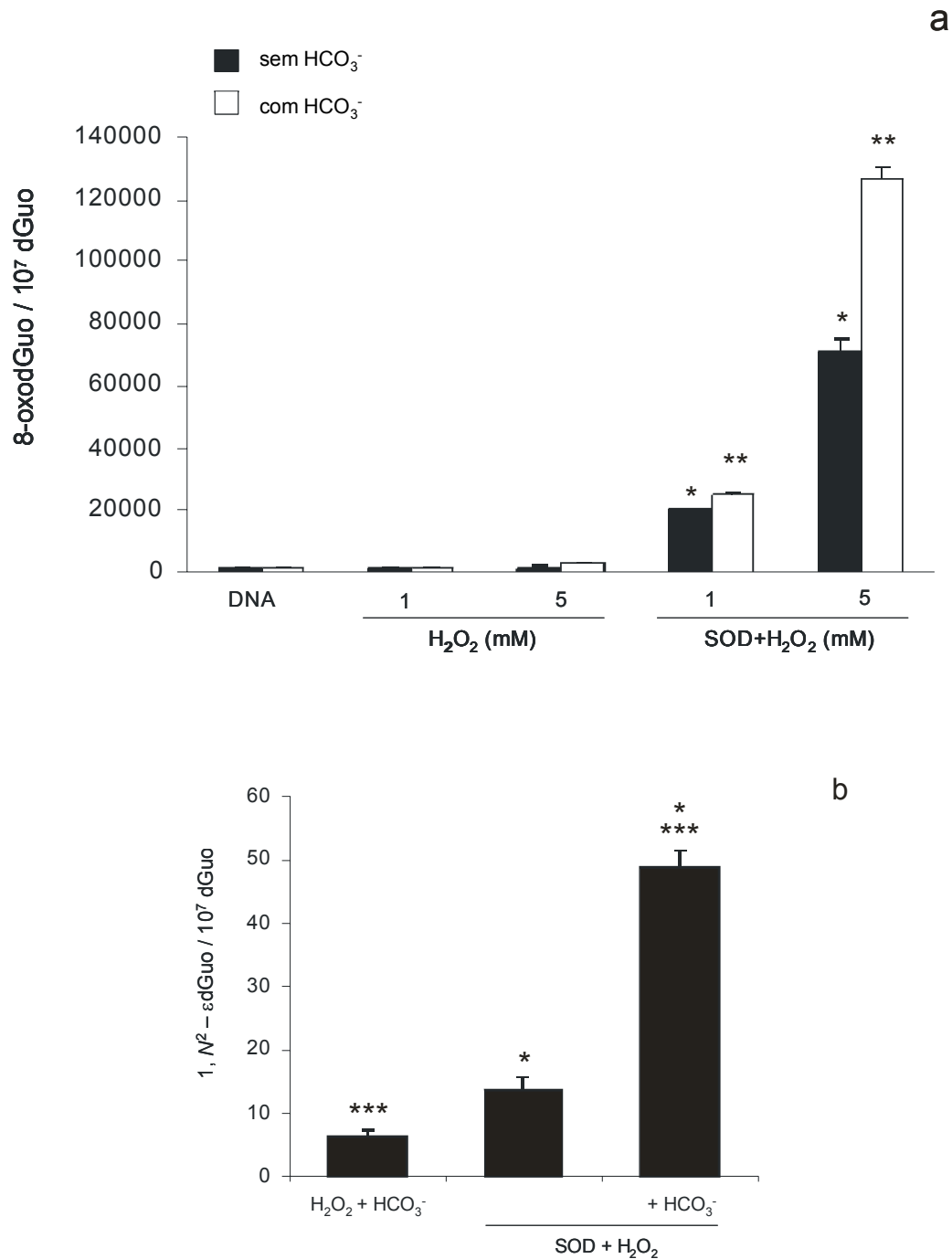




**Figura 4.4:** Níveis de 1,N<sup>2</sup>-εdGuo em DNA incubado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 mM) e SOD1 (30 μM do dímero), na presença ou não de batocuproína 1 mM (BAT) por 24 h. 1,N<sup>2</sup>-εdGuo não foi detectado no DNA controle ou no DNA tratado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cada valor representa a média ± desvio padrão de três amostras diferentes. \*Significativamente diferente da incubação sem SOD1 e mesma concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (One-way ANOVA, p < 0,001). \*\*Significativamente diferente da mesma incubação sem batocuproína (One-way ANOVA, p < 0,001).

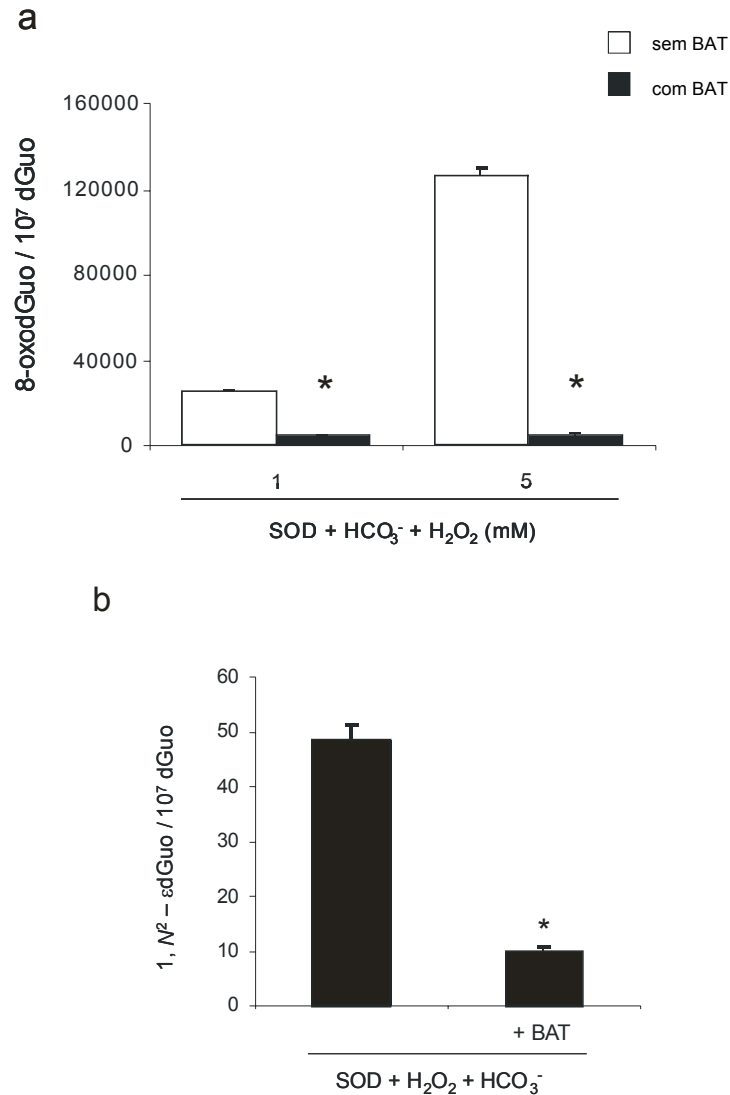
#### 4.1.5 Efeito do bicarbonato nos danos em DNA promovidos pelo sistema SOD1/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Sabe-se que o sistema SOD1/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> gera o radical carbonato (Sankarapandi e Zweier, 1999; Zhang, Joseph *et al.*, 2000; Liochev e Fridovich, 2004). A adição de bicarbonato resultou em aumento significativo dos níveis de 8-oxodGuo e 1,N<sup>2</sup>-εdGuo no DNA. O nível de 8-oxodGuo quase dobrou com a adição de bicarbonato (**figura 4.5a**) e o nível de 1,N<sup>2</sup>-εdGuo aumentou 3,6 vezes (**figura 4.5b**) em relação às incubações de DNA com SOD1/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 mM). A reação do radical carbonato com dGuo formando 8-oxodGuo já foi demonstrada anteriormente (Shafirovich, Dourandin *et al.*, 2001; Joffe, Geacintov *et al.*, 2003; Crean, Geacintov *et al.*, 2005). Mas, esta é a primeira vez que se mostra a formação de 1,N<sup>2</sup>-εdGuo promovida pelo sistema SOD1/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/bicarbonato.



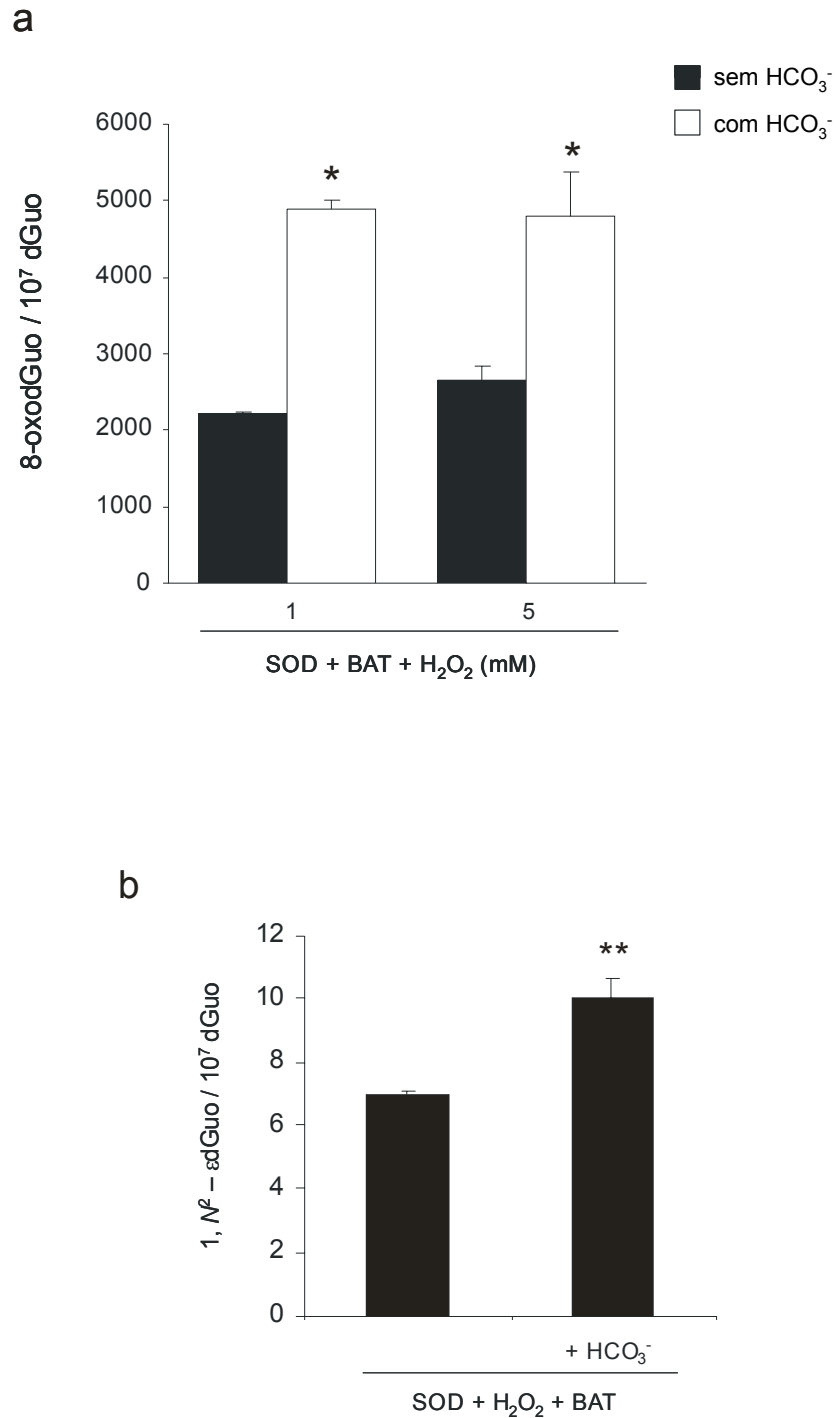
**Figura 4.5:** (a) Níveis de 8-oxodGuo em DNA controle (DNA) e incubado somente com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 e 5 mM), ou com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e SOD1 (10 μM do dímero) por 1 h. (b) Níveis de 1,N<sup>2</sup>-εdGuo em DNA incubado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 mM), ou com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e SOD1 (30 μM do dímero) por 24 h. 1,N<sup>2</sup>-εdGuo não foi detectado em DNA controle ou em DNA tratado somente com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As incubações foram feitas na presença ou não de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 25 mM. Cada valor representa a média ± desvio padrão de três amostras. O erro em alguns tratamentos é muito pequeno para ser visualizado no gráfico. \*Significativamente diferente da incubação sem SOD1 na mesma concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (One-way ANOVA,  $p < 0,001$ ). Significativamente diferente da mesma incubação sem HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (One-way ANOVA, \*\* $p < 0,01$  ou \*\*\* $p < 0,001$ ).

A adição de batocuproína às incubações de DNA com SOD1/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> praticamente eliminou o efeito do bicarbonato nos danos em DNA promovidos pela SOD1. Os níveis de 8-oxodGuo e 1,N<sup>2</sup>-εdGuo foram reduzidos aos valores inferiores àqueles obtidos na ausência de bicarbonato (**figuras 4.6a e 4.6b**).



**Figura 4.6:** (a) Níveis de 8-oxodGuo em DNA após 1 h de incubação com SOD1 (10 μM do dímero), HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (25 mM) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 e 5 mM), na presença ou não de batocuproína 1 mM (BAT). (b) Níveis de 1, N<sup>2</sup>-εdGuo em DNA após 24 h de incubação com SOD1 (30 μM do dímero), HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (25 mM) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 mM), na presença ou não de batocuproína 1 mM (BAT). Cada valor representa a média ± desvio padrão de três amostras. O erro em alguns tratamentos é muito pequeno para ser visualizado no gráfico. \*Significativamente diferente da mesma incubação sem batocuproína (One-way ANOVA, p < 0,001).

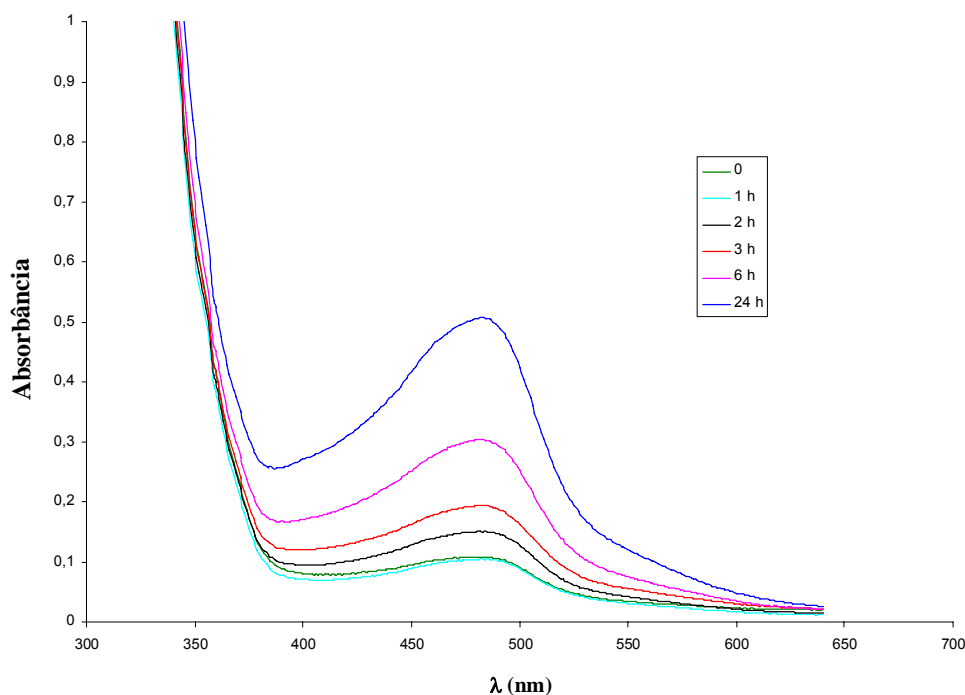
Este resultado indica que o efeito do bicarbonato nos danos em DNA depende do cobre liberado da SOD1. Ramirez e colaboradores (Ramirez, Gomez Mejiba *et al.*, 2005) mostraram que o cobre liberado do sítio ativo da SOD1 poderia se ligar a outros resíduos de aminoácido na proteína, gerando múltiplos sítios de formação de radical carbonato na presença de bicarbonato. No sistema aqui descrito, o cobre liberado do sítio ativo da SOD1 pode se ligar diretamente ao DNA e catalisar a formação de radical carbonato próximo aos resíduos de guanina. Outra possibilidade é a formação de radical carbonato no sítio ativo da SOD1, o qual poderia se difundir para atacar o DNA em solução. Não é possível distinguir entre estes dois mecanismos nas incubações de DNA com SOD1/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Entretanto, quando a batocuproína está presente, sítios ativos intactos da SOD1 são os únicos sítios possíveis de formação do radical carbonato, já que o quelante compete com o DNA e com a proteína pelo cobre liberado. Portanto, em incubações de DNA com SOD1/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/batocuproína, radicais carbonato gerados no sítio ativo da SOD1 se difundem para atacar o DNA. É possível observar um pequeno, porém significativo efeito deste radical carbonato na formação de lesões no DNA. Os níveis de 8-oxodGuo e 1,N<sup>2</sup>-edGuo aumentaram 2 e 1,5 vezes, respectivamente, em comparação com o DNA incubado com SOD1/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/batocuproína (**figuras 4.7a e 4.7b**). O aumento dos níveis de 1,N<sup>2</sup>-edGuo nestas condições foi surpreendente, uma vez que não existem relatos na literatura sobre a oxidação da ribose pelo radical carbonato.



**Figura 4.7:** (a) Níveis de 8-oxodGuo em DNA após 1 h de incubação com SOD1 (10  $\mu$ M do dímero), batocuproína 1 mM (BAT) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 e 5 mM), na presença ou não de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 25 mM. (b) Níveis de 1, N<sup>2</sup>-εdGuo em DNA após 24 h de incubação com SOD1 (30  $\mu$ M do dímero), batocuproína 1 mM (BAT) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 mM), na presença ou não de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 25 mM. Cada valor representa a média  $\pm$  desvio padrão de três amostras. Significativamente diferente da mesma incubação sem HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (One-way ANOVA, \*p < 0,001 ou \*\*p < 0,05).

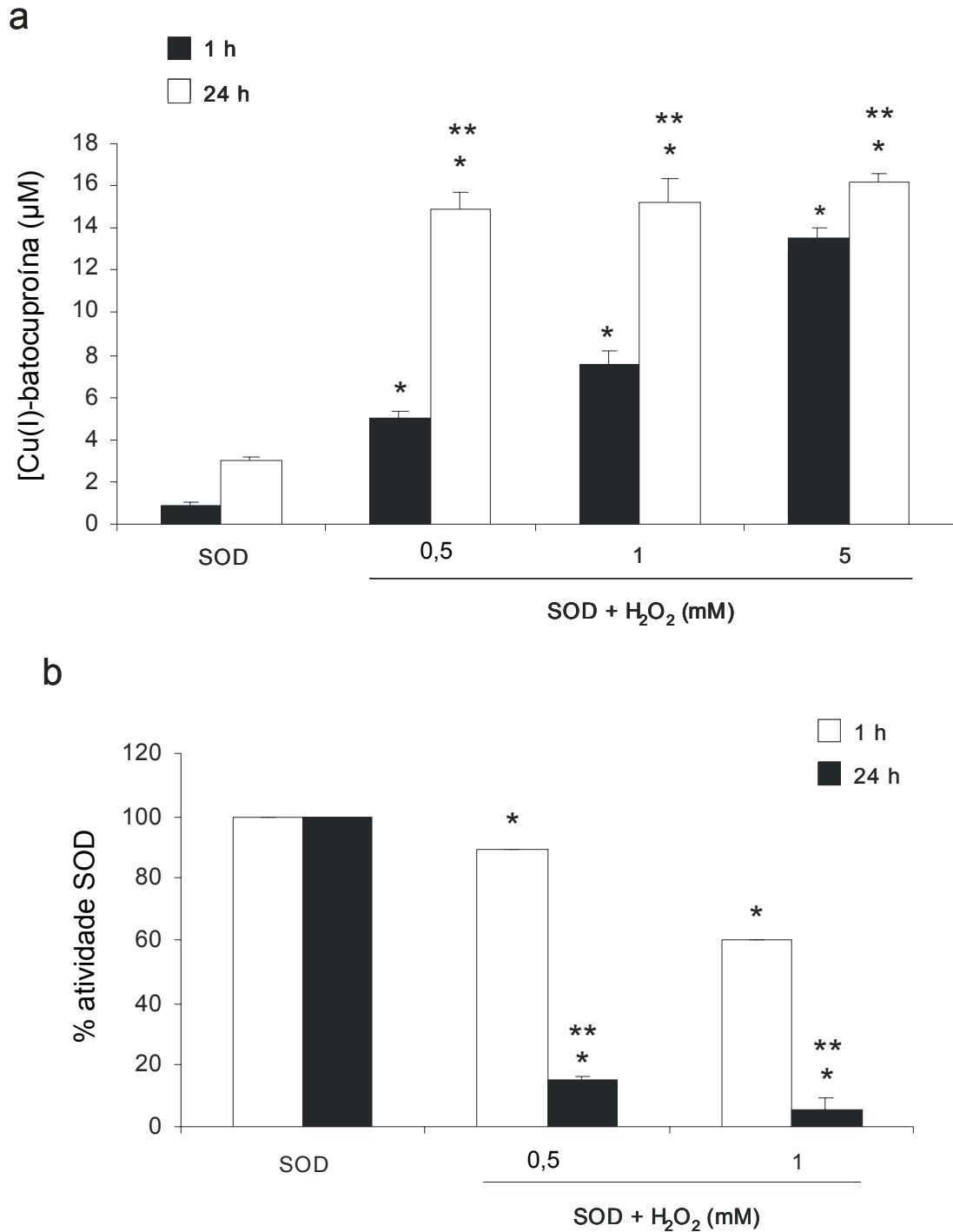
#### 4.1.6 Liberação de cobre do sítio ativo da SOD1 e inativação da enzima: efeito da concentração de $H_2O_2$ e do tempo de incubação

A quantificação do cobre liberado do sítio ativo da SOD1 e a determinação da atividade da SOD1 após a incubação com  $H_2O_2$  foram realizadas para confirmar o papel central do cobre liberado da enzima na formação de lesões no DNA promovidas pelo sistema SOD1 /  $H_2O_2$ . A liberação do cobre foi acompanhada pelo espectro de absorção característico do complexo Cu(I)-batocuproína entre 390 e 540 nm (**figura 4.8**), e a atividade superóxido dismutásica foi determinada pela inibição da redução do citocromo C, como descrito em Métodos. Os experimentos foram realizados nas mesmas condições experimentais das incubações de DNA.



**Figura 4.8:** Espectro de absorção característico do complexo Cu(I)-batocuproína formado pela incubação de SOD1 com  $H_2O_2$  nos tempos indicados.

Incubações de SOD1 (10  $\mu$ M) com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 / 1 / 5 mM) por 1 h (condições utilizadas para determinação de quebras em DNA plasmidial e formação de 8-oxodGuo) resultaram na liberação de 5 / 7,5 / 14  $\mu$ M de cobre, respectivamente (**figura 4.9a**). Como esperado, a liberação de cobre do sítio ativo da SOD1 aumentou com a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 70% das moléculas de SOD1 perderam o cobre após 1 h de incubação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 mM). Após 24 h de incubação, esta porcentagem foi alcançada mesmo com 0,5 e 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A atividade superóxido dismutásica observada foi coerente com os níveis de cobre liberados da enzima. Uma pequena perda de atividade foi observada após 1 h de incubação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM (10%) e uma perda significativa com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM (40%). Nenhuma atividade foi detectada após 1 h de incubação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 mM (**figura 4.9b**). Após 24 h, a atividade SOD1 foi drasticamente reduzida, mesmo nas incubações com 0,5 e 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (85% e 94% de redução, respectivamente). As incubações de SOD1 (30  $\mu$ M) com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 mM) por 24 h (condições utilizadas para determinação de 1,N<sup>2</sup>- $\epsilon$ dGuo em DNA) resultaram na liberação de 36  $\mu$ M de cobre e redução de 95% da atividade da enzima.



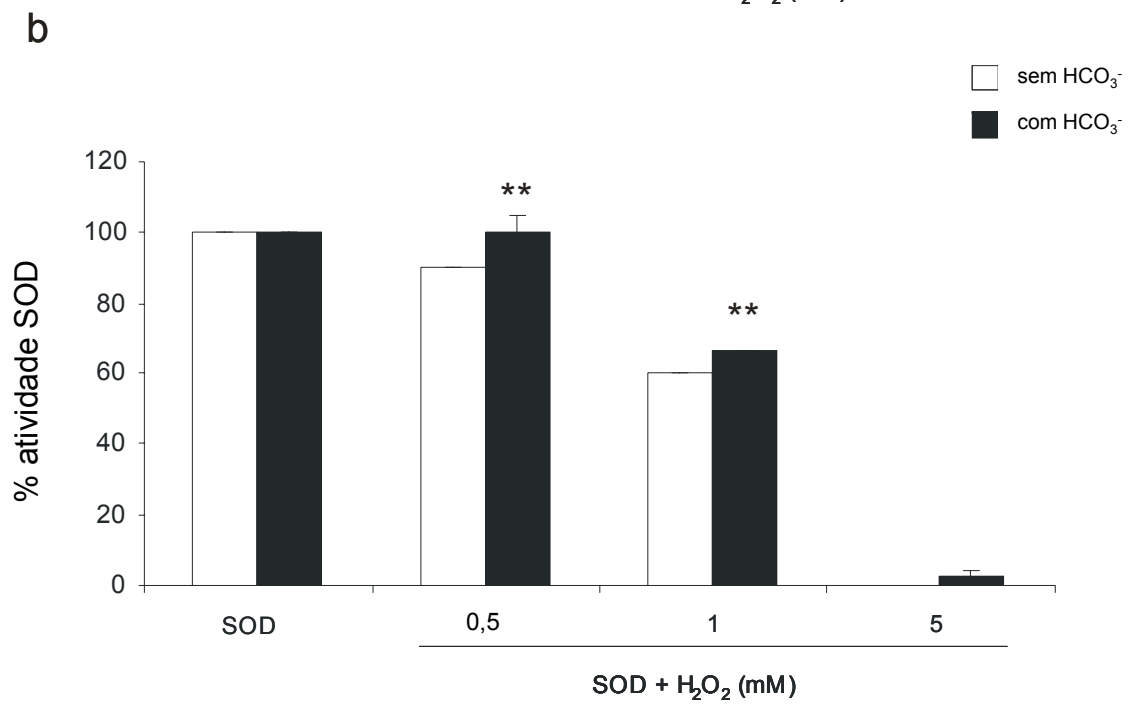
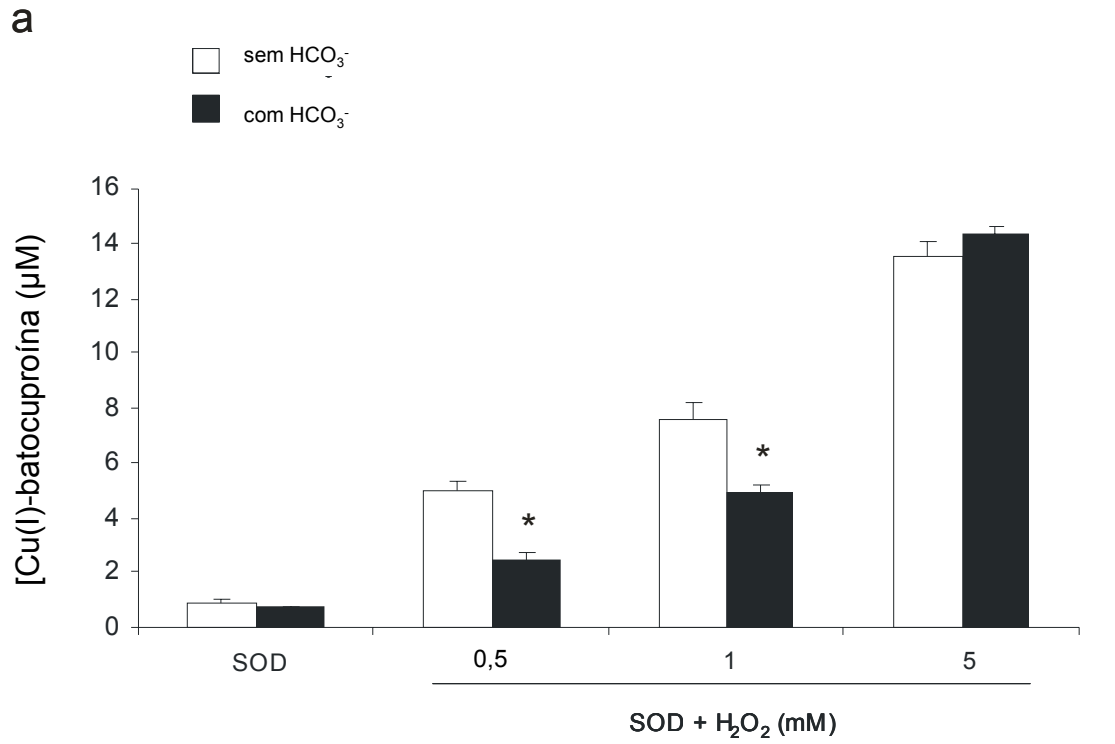
**Figura 4.9:** (a) Cobre liberado da SOD1 (10 µM do dímero) e (b) atividade da SOD1 após 1 e 24 h de incubação em condições controle (SOD) e após incubação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5/1/5 mM). Cada valor representa a média ± desvio padrão de três amostras. O erro em alguns tratamentos é muito pequeno para ser visualizado no gráfico. \*Significativamente diferente da incubação de SOD1 sem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (One-way ANOVA,  $p < 0,001$ ). \*\*Significativamente diferente da mesma incubação por 1 h (One-way ANOVA,  $p < 0,01$ ).

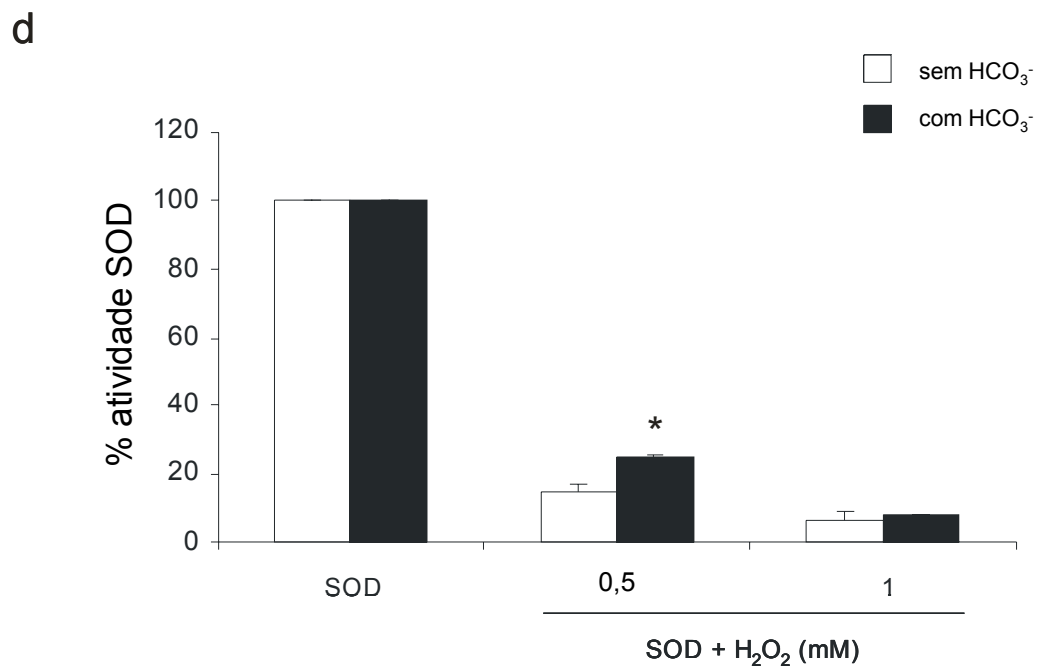
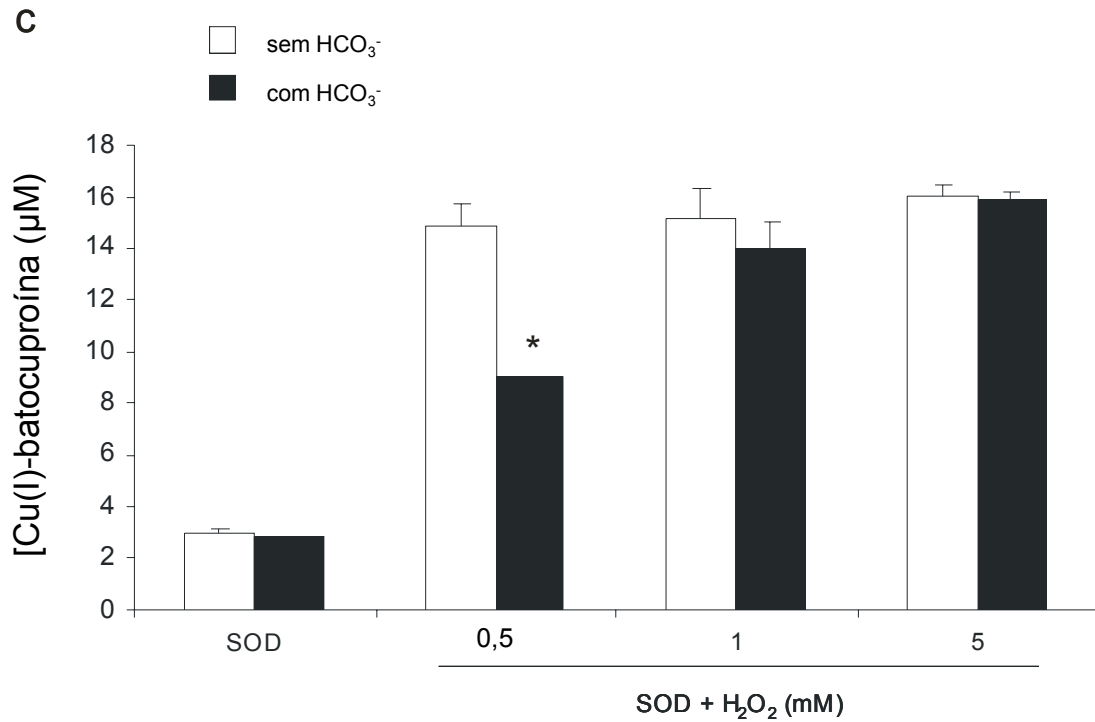


A formação do complexo Cu(I)-batocuproína (Jewett, Rocklin *et al.*, 1999) e a perda da atividade da SOD1 após incubação com peróxido já havia sido demonstrada (Hodgson e Fridovich, 1975b; Uchida e Kawakishi, 1994; Gunther, Peters *et al.*, 2002) e foi confirmada nas condições experimentais aqui apresentadas. Estes resultados são claras evidências de que o cobre é liberado do sítio ativo da SOD1 durante a reação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e suportam um papel central do cobre liberado da SOD1 no mecanismo proposto nos itens acima para a formação das lesões em DNA, *in vitro*, com altas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 4.1.7 Liberação de cobre do sítio ativo da SOD1 e inativação da enzima: efeito do bicarbonato

O efeito do bicarbonato na formação do complexo Cu(I)-batocuproína e na atividade da SOD1 também foi avaliado. Após 1 h, o bicarbonato preveniu a liberação de cobre em 50% e 35% nas incubações de SOD1 com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 e 1 mM, respectivamente (**figura 4.10a**). A atividade da SOD1 nas mesmas incubações também foi preservada na presença de bicarbonato (**figura 4.10b**). Nas incubações com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 mM por 1 h, o bicarbonato não teve efeito protetor. Após 24 h, o bicarbonato protegeu significativamente somente a SOD1 incubada com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM. Neste caso, houve redução de 40% na liberação de cobre (**figura 4.10c**) e a atividade SOD1 foi 10% maior do que aquela observada na incubação sem bicarbonato (**figura 4.10d**). Nas incubações de SOD1 (30 µM) com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 mM) por 24 h, o bicarbonato não exerceu nenhum efeito protetor.





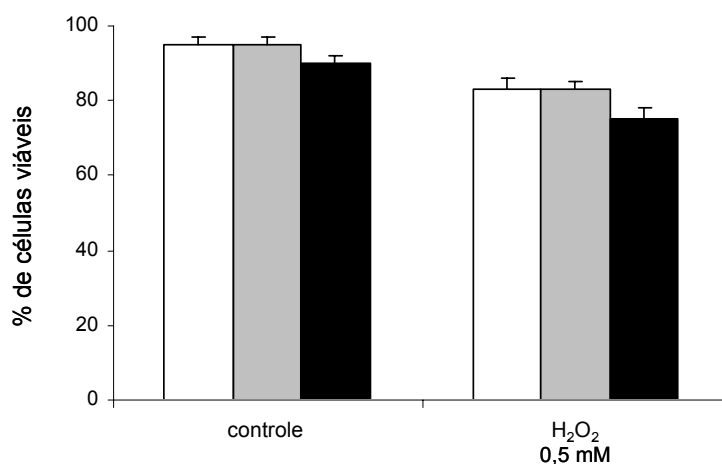
**Figura 4.10:** (a) Cobre liberado da SOD1 (10 µM do dímero) e (b) atividade da SOD1 após 1 h de incubação em condições controle (SOD) e após incubação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5/1/5 mM), na presença ou não de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. (c) Cobre liberado da SOD1 e (d) atividade da SOD1 após 24 h de incubação em condições controle (SOD) e após incubação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5/1/5 mM), na presença ou não de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Cada valor representa a média ± desvio padrão de três amostras. O erro em alguns tratamentos é muito pequeno para ser visualizado no gráfico. Significativamente diferente da mesma incubação sem HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (One-way ANOVA, \*p < 0,001 ou \*\*p < 0,05).

A literatura sobre os efeitos do bicarbonato na inativação da SOD1 são controversos. Um estudo mostrou um efeito protetor do bicarbonato (Jewett, Olmsted *et al.*, 2000), enquanto outros mostraram aumento da inativação da enzima (Elam, Malek *et al.*, 2003; Liochev e Fridovich, 2004). Os resultados aqui apresentados mostraram que o bicarbonato preveniu a liberação do cobre nas condições oxidantes mais brandas ( $\text{H}_2\text{O}_2$  0,5 e 1 mM por 1 h). Nas incubações com  $\text{H}_2\text{O}_2$  5 mM ou por 24 h, a liberação do cobre e a perda da atividade da SOD1 ocorreram mesmo na presença de bicarbonato. O bicarbonato causou um aumento bastante significativo dos níveis de 8-oxodGuo e 1,*N*<sup>2</sup>- $\epsilon$ dGuo no DNA incubado com  $\text{H}_2\text{O}_2$  5 mM por 1 e 24 h. Nestas condições, o bicarbonato não preveniu a liberação do cobre e a inativação da SOD1, o que reforça a hipótese apresentada no item 4.1.5 de que a maior parte das lesões em DNA promovidas pelo radical carbonato dependeram do cobre liberado do sítio ativo da SOD1.

## **4.2 Estudos com modelo celular de Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA)**

### *4.2.1 Viabilidade celular dos neuroblastomas SH-SY5Y*

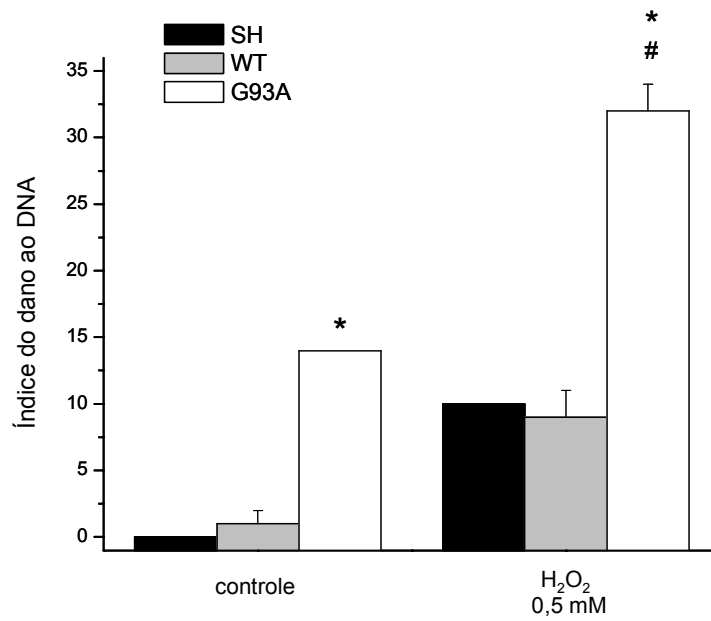
Em condições controle, não foi observada diferença significativa entre a viabilidade dos neuroblastomas parentais (SH) ou transfectados com SOD1 nativa (WT) ou mutante (G93A). Os neuroblastomas G93A resistiram menos ao tratamento com  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,5 mM) por 2 h. Entretanto, o tratamento com peróxido não comprometeu mais de 25% de células, em nenhuma das linhagens (**figura 4.11**). Os resultados de viabilidade celular obtidos na presença ou ausência de SFB foram semelhantes.



**Figura 4.11:** Porcentagem de células viáveis SH-SY5Y parentais (SH), e transfectadas com SOD1 nativa (WT) ou SOD1 mutante G93A (G93A), em condições controle e após tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM por 2 h, na presença e na ausência de SFB. A viabilidade foi determinada pelo método do MTT, descrito em Métodos.

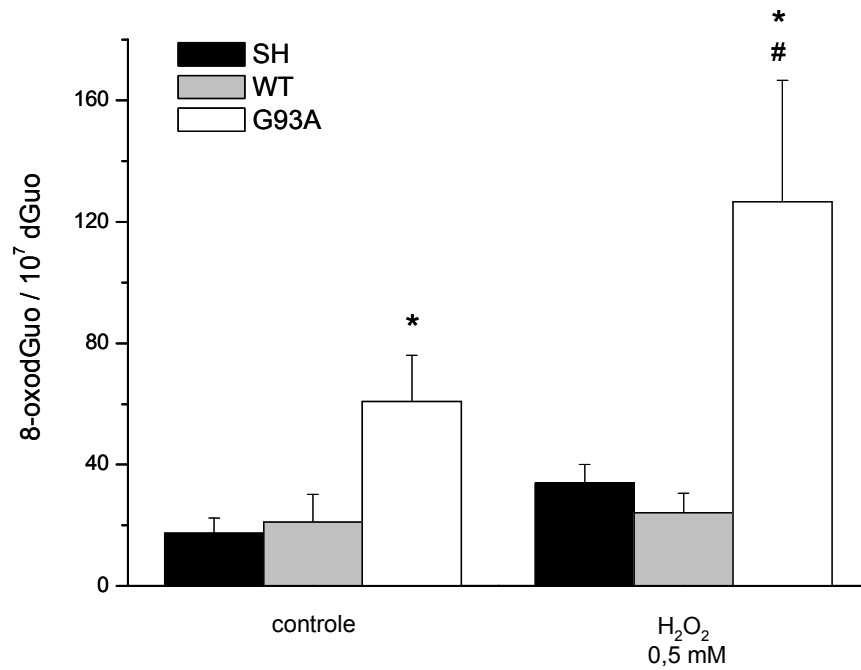
#### 4.2.2 Lesão em DNA e peroxidação lipídica nos neuroblastomas SH-SY5Y

O ensaio cometa mostrou que o nível de quebras no DNA dos neuroblastomas transfectados com SOD1 G93A (G93A) foi 10 vezes maior do que o nível de quebras das células parentais (SH) ou transfectadas com SOD1 nativa (WT). O tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentou as quebras de DNA nos três tipos celulares, mas as células G93A alcançaram o maior índice de dano ao DNA após o tratamento (**figura 4.12**).



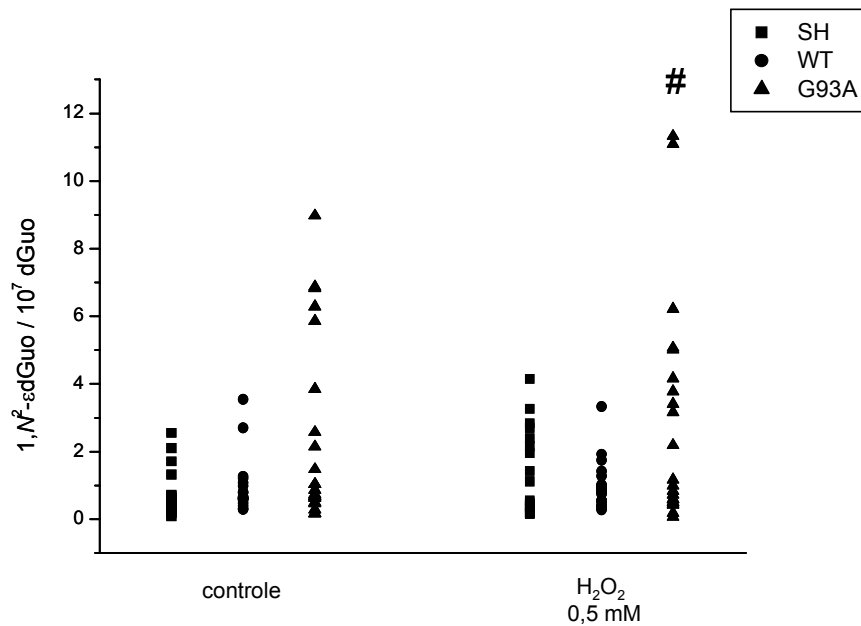
**Figura 4.12:** Nível de quebra em DNA genômico das células SH-SY5Y parentais (SH), e transfectadas com SOD1 nativa (WT) ou SOD1 mutante G93A (G93A), em condições controle e após tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM por 2 h. O índice do dano ao DNA foi definido como descrito em Métodos pela intensidade da “cauda dos cometas”, isto é, pela quantidade de DNA fragmentado em cada célula. \*Significativamente diferente de SH e WT nas mesmas condições; #significativamente diferente de G93A controle ( $p < 0,001$ ). O desvio de alguns grupos é muito pequeno para ser visualizado no gráfico.

O nível basal de 8-oxodGuo das células G93A foi 3 vezes maior ( $\sim 60$  8-oxodGuo /  $10^7$  dGuo) do que os níveis das células SH e WT ( $\sim 20$  8-oxodGuo /  $10^7$  dGuo). O tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não causou diferença significativa nos níveis de 8-oxodGuo das células SH e WT, mas dobrou o nível das células G93A (**figura 4.13**).



**Figura 4.13:** Nível de 8-oxodGuo no DNA genômico obtido de células SH-SY5Y parentais (SH), e transfectadas com SOD1 nativa (WT) ou SOD1 mutante G93A (G93A), em condições controle e após tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM por 2 h. A razão molar entre 8-oxodGuo e dGuo em cada amostra de DNA foi determinada pela detecção coulométrica a 280 mV da 8-oxodGuo e absorvância a 254 nm da dGuo em cada injeção de HPLC, como descrito em Métodos. \*Significativamente diferente de SH e WT na mesma condição; # significativamente diferente de G93A controle ( $p < 0,001$ ).

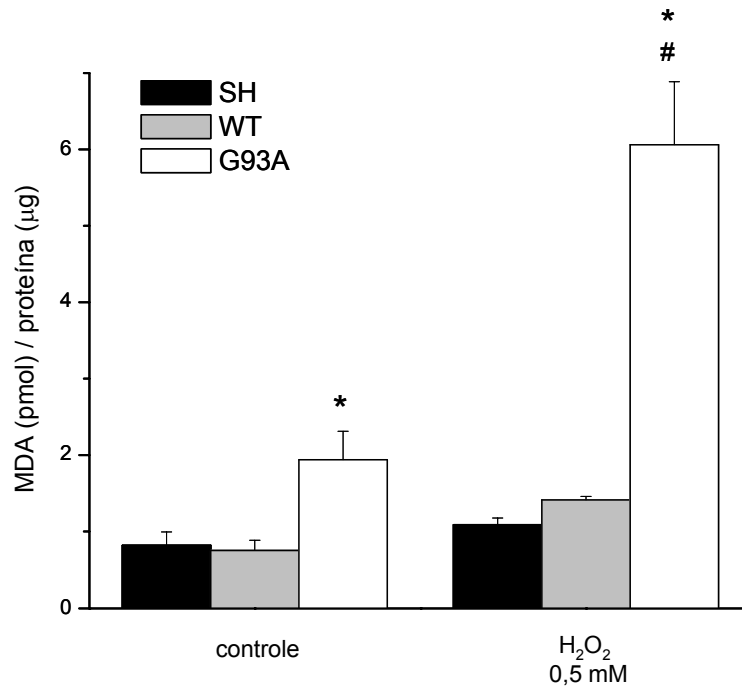
Foi observada somente uma tendência de aumento, não significativa estatisticamente, no nível basal de 1,N<sup>2</sup>-εdGuo das células G93A, em comparação com as células SH e WT. Após o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o nível de 1,N<sup>2</sup>-εdGuo das células G93A foi significativamente maior (~3 vezes) do que o nível das células WT (**figura 4.14**).



**Figura 4.14:** Nível de  $1,N^2$ - $\epsilon$ dGuo no DNA genômico obtido de células SH-SY5Y parentais (SH), e transfectadas com SOD1 nativa (WT) ou SOD1 mutante G93A (G93A), em condições controle e após tratamento com  $H_2O_2$  0,5 mM por 2 h. A razão molar entre  $1,N^2$ - $\epsilon$ dGuo e dGuo em cada amostra de DNA foi determinada pela detecção por espectrometria de massa de  $1,N^2$ - $\epsilon$ dGuo e absorvância a 254 nm da dGuo em cada injeção de HPLC, como descrito em Métodos. #Significativamente diferente de WT na mesma condição ( $p < 0,05$ ).

A formação de  $1,N^2$ - $\epsilon$ dGuo depende da reação de aldeídos ativados ( $\alpha,\beta$  insaturados) com a dGuo. Em células, estes aldeídos são principalmente gerados pela oxidação de lipídios (como DDE e HNE), mas também podem ser gerados pela oxidação de aminoácidos (como a acroleína) ou açúcares (como o glioxal) (West e Marnett, 2006). O MDA é o produto de oxidação lipídica mais estudado na literatura, utilizado como marcador de lipoperoxidação. O nível de MDA observado nas células G93A foi o dobro dos níveis das células SH e WT em condições controle. E após o tratamento com  $H_2O_2$ , as células G93A sofreram o maior aumento nos níveis de MDA (**figura 4.15**).



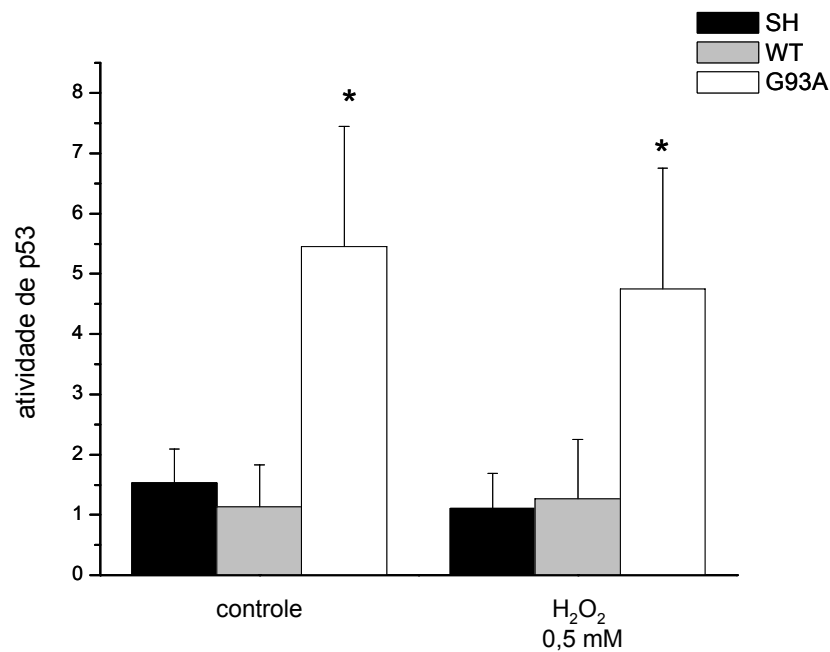


**Figura 4.15:** Oxidação de lipídios determinada pelo nível de MDA no extrato celular obtido de células SH-SY5Y parentais (SH), e transfectadas com SOD1 nativa (WT) ou SOD1 mutante G93A (G93A), em condições controle e após tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM por 2 h. A concentração de MDA em cada amostra foi determinada pela fluorescência a 550 nm em cada injeção de HPLC, como descrito em Métodos. \*Significativamente diferente de SH e WT na mesma condição; #significativamente diferente de G93A controle (p < 0,001).

#### 4.2.3 Atividade de p53 nos neuroblastomas SH-SY5Y

Cerqueira e Ciriolo mostraram anteriormente que os neuroblastomas transfectados com SOD1 G93A (G93A) apresentam níveis aumentados de marcadores moleculares de apoptose (fragmentação do DNA, exposição de fosfatidilserina, liberação de citocromo C, super expressão de Bcl-2, atividade de caspase 3) em relação aos neuroblastomas parentais (SH) ou transfectados com SOD1 nativa (WT) (Ciriolo, De Martino *et al.*, 2000; Cerqueira, 2007). O acúmulo de lesões no DNA pode desencadear o processo de apoptose via ativação da proteína p53. Níveis aumentados da proteína p53 foram mostrados nas células G93A (Ciriolo, De Martino *et al.*, 2000). Com o intuito de mostrar que as lesões no DNA das células

G93A mostradas no item 4.2.2 poderiam ser uma das causas da morte dessas células por apoptose, a atividade de p53 (e não a quantidade da proteína) foi quantificada. Estes experimentos foram realizados em colaboração com o Dr. Antero F. A. Macedo, orientado pela profa. Mari Cleide Sogayar, no Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP. Em condições basais, as células G93A apresentaram atividade de p53 três vezes maior do que as células SH e WT. O tratamento com peróxido não alterou a atividade de p53 em nenhuma das células (**figura 4.16**). Os níveis de lesão no DNA das células SH e WT após o tratamento podem não ter atingido o nível necessário para disparar a atividade de p53. Ao contrário, a atividade de p53 nas células G93A poderia estar no nível ótimo, uma vez que a atividade basal de p53 e o nível de lesão em DNA já eram altos nesta célula.

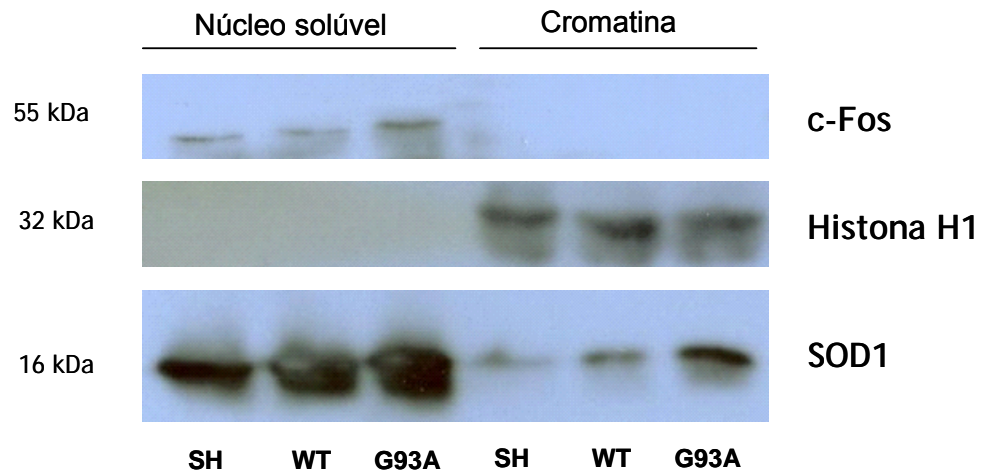


**Figura 4.16:** Atividade de p53 nas células SH-SY5Y parentais (SH), e transfectadas com SOD1 nativa (WT) ou SOD1 mutante G93A (G93A), em condições controle e após tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM por 2 h. A atividade de p53 foi determinada pela atividade do gene repórter luciferase no extrato celular, como descrito em Métodos. \*Significativamente diferente de SH e WT na mesma condição (p < 0,001).

#### 4.2.4 SOD1 no núcleo dos neuroblastomas: proteína livre ou associada à cromatina

O *western blot* realizado com anti-corpo anti-SOD1 mostrou que os neuroblastomas parentais (SH) e os neuroblastomas transfectados com SOD1 nativa (WT) ou SOD1 mutante G93A (G93A) possuem SOD1 no núcleo, como uma proteína solúvel e também associada à cromatina (**figura 4.17**). As células WT e G93A possuem mais SOD1 no núcleo do que a célula SH, provavelmente devido à expressão duplicada de SOD1 nas células transformadas (Carri, Ferri *et al.*, 1997; Cerqueira, 2007). A presença de SOD1 no núcleo de células de mamífero já foi descrita anteriormente (Slot, Geuze *et al.*, 1986; Chang, Slot *et al.*, 1988; Del Maestro e McDonald, 1989) e nossos resultados corroboram esta informação. Entretanto, nossos resultados são contrastantes com àqueles de Sau e colaboradores (Sau, De Biasi *et al.*, 2007), que mostraram que a SOD1 G93A era excluída do núcleo de neurônios motores imortalizados NSC34 em cultura. Diferenças metodológicas podem explicar esta discrepância, uma vez que eles usaram células de camundongo NSC34, e nós usamos neuroblastomas humanos SH-SY5Y.

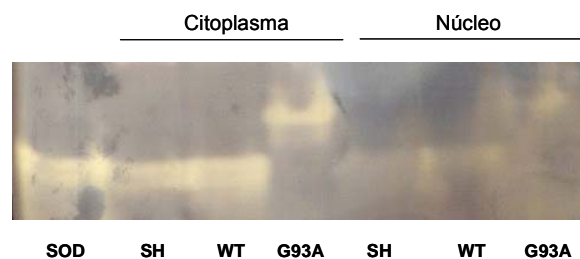
A SOD1 também foi isolada com as proteínas da cromatina. É improvável que este resultado seja contaminação da SOD1 da fração de proteínas nucleares solúveis, uma vez que a proteína nuclear solúvel c-Fos não foi detectada na fração da cromatina. Já a histona H1, proteína fortemente associada ao DNA, foi isolada somente na fração da cromatina. Portanto, esta é a primeira vez que se observou que a SOD1 pode estar associada à cromatina, sugerindo uma interação forte entre a proteína e o DNA. Além disso, o nível de SOD1 G93A associado à cromatina foi maior do que o da SOD1 nativa, indicando que a SOD1 mutante possui maior afinidade pelo DNA (**figura 4.17**).



**Figura 4.17:** Análise de *western blot* realizado com extrato de proteínas (40 $\mu$ g) nucleares solúveis (Núcleo solúvel) e proteínas associadas ao DNA (Cromatina) obtidos de células SH-SY5Y parentais (SH), e transfectadas com SOD1 nativa (WT) ou SOD1 mutante G93A (G93A). As proteínas c-Fos e histona H1 foram usadas como marcadores de núcleo solúvel e cromatina, respectivamente, para normalizar a quantidade de proteína aplicada e mostrar a pureza de cada fração.

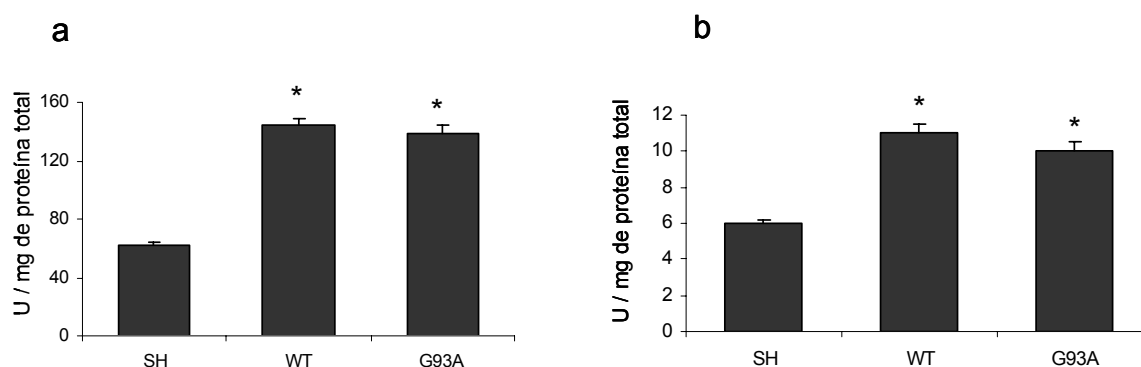
#### 4.2.5 Atividade superóxido dismutásica e atividade peroxidásica da SOD1 no núcleo dos neuroblastomas

Atividade superóxido dismutásica foi identificada no extrato de proteínas citosólicas e no extrato de proteínas nucleares dos três tipos celulares (**figura 4.18**).



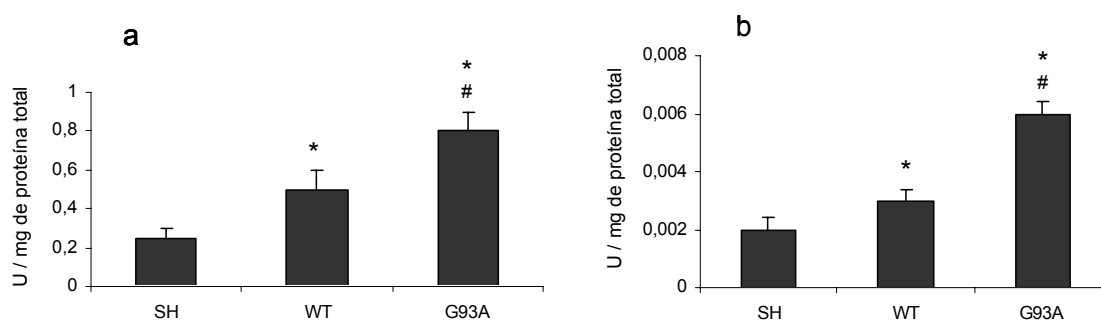
**Figura 4.18:** Atividade superóxido dismutásica de extratos de proteínas citosólicas e nucleares (60  $\mu$ g) obtidos de células SH-SY5Y parentais (SH), e transfectadas com SOD1 nativa (WT) ou SOD1 mutante G93A (G93A). Um padrão de SOD1 humana pura (400 ng) foi aplicado como controle (SOD).

A quantificação espectrofotométrica desta atividade mostrou que as células transfectadas com SOD1 nativa (WT) ou SOD1 mutante G93A (G93A) possuem aproximadamente duas vezes mais atividade SOD1 do que as células parentais (SH), tanto no citosol (**figura 4.19a**), quanto no núcleo (**figura 4.19b**). Este resultado está de acordo com a quantidade duplicada de SOD1 na fração citosólica e na fração nuclear das células transformadas (**figura 4.17**) e informa que a SOD1 G93A retém completa atividade superóxido dismutásica no citosol e no núcleo das células SH-SY5Y. A atividade SOD1 nos extratos totais já havia sido determinada por Carri e Cerqueira (Carri, Ferri *et al.*, 1997; Cerqueira, 2007). Os resultados aqui apresentados corroboram os dados apresentados anteriormente e quantificam pela primeira vez a atividade da SOD1 no núcleo das células SH, WT e G93A.



**Figura 4.19:** Atividade superóxido dismutásica de extratos de (a) proteínas totais (60 µg) e (b) proteínas nucleares (60 µg) obtidos de células SH-SY5Y parentais (SH), e transfectadas com SOD1 nativa (WT) ou SOD1 mutante G93A (G93A). Uma unidade de SOD1 foi definida como a quantidade de extrato que promoveu 50% de inibição na velocidade de redução do NBT, acompanhada pela absorvância a 560 nm. \*Significativamente diferente de SH ( $p < 0,001$ ).

A atividade peroxidásica da SOD1 também foi quantificada no extrato total e extrato nuclear dos três tipos de células (SH, WT e G93A), através da análise da oxidação da DHR pelos extratos celulares na presença de peróxido. A DHR não foi oxidada pelos extratos celulares ou pelo peróxido, separadamente. Um quelante de ferro e cobre (DTPA) foi adicionado ao extrato para inibir a reação de Fenton após a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, garantindo que oxidação da DHR fosse promovida pela atividade de peroxidases. É conhecido que a atividade peroxidásica da SOD1 é aumentada pela presença de bicarbonato, enquanto que outras peroxidases (citocromo C e peroxidase de raiz forte) não sofrem este efeito (Zhang, Joseph *et al.*, 2002; Kim, Lim *et al.*, 2006). O aumento da oxidação de DHR causado pela presença de bicarbonato foi então atribuído à atividade peroxidásica da SOD1 presente nos extratos. A atividade peroxidásica da SOD1 no extrato total obtido das células G93A foi maior do que das células WT e SH (1,6 e 3,2 vezes, respectivamente) (**figura 4.20a**). No extrato nuclear das células G93A, a atividade peroxidásica da SOD1 também foi maior do que das células WT e SH (2 e 3 vezes, respectivamente) (**figura 4.20b**).



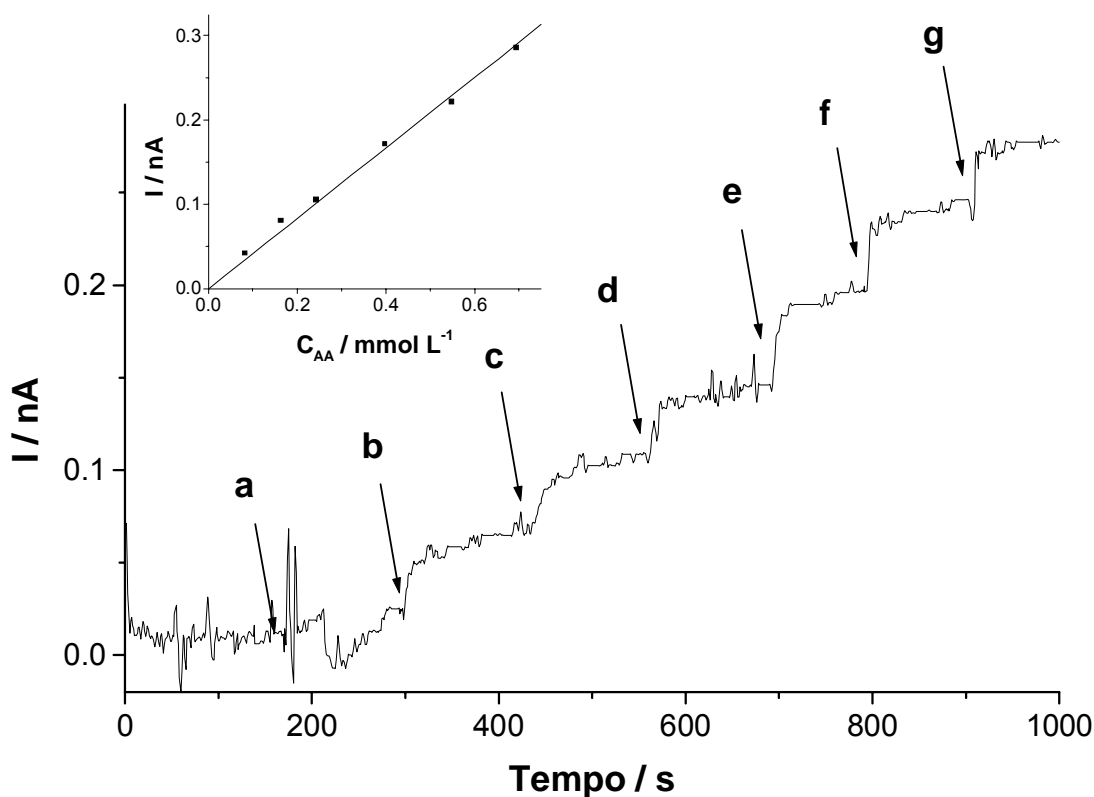
**Figura 4.20:** Atividade peroxidásica da SOD1 nos extratos de (a) proteínas totais (100 µg) e (b) proteínas nucleares (100 µg) obtidos de células SH-SY5Y parentais (SH), e transfectadas com SOD1 nativa (WT) ou SOD1 mutante G93A (G93A). Uma unidade de SOD1 foi definida como a quantidade de extrato que promoveu a oxidação da DHR na velocidade de 1 µM/min, acompanhada pela absorbância a 500 nm devido à formação de rodamina. Para determinação da atividade peroxidásica da SOD1, a velocidade de oxidação da DHR na ausência de bicarbonato foi subtraída da velocidade na presença de bicarbonato. Significativamente diferente de \*SH ou #WT ( $p < 0,001$ ).

Utilizando o mesmo modelo celular aqui apresentado, Cerqueira já havia descrito maior atividade peroxidásica da SOD1 no extrato total de células G93A (Cerqueira, 2007). Este resultado foi confirmado agora e, pela primeira vez, foi demonstrado que o extrato nuclear das células G93A também apresenta maior atividade peroxidásica da SOD1 em relação às células WT e SH. Cerqueira, Ciriolo e Beretta também observaram maior geração intracelular de ROS nas células G93A, em relação às células WT e SH (Ciriolo, De Martino *et al.*, 2000; Beretta, Sala *et al.*, 2003; Cerqueira, 2007). Zhang e colaboradores mostraram maior oxidação de 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCF) pelo extrato protéico obtido da medula espinhal de camundongos expressando SOD1 G93A (Zhang, Joseph *et al.*, 2002). Além disso, não existem trabalhos com células de mamífero na literatura comparando a atividade peroxidásica de SOD1s mutantes com a SOD1 nativa.

#### *4.2.6 Determinação do consumo de ascorbato e da concentração intracelular de ascorbato nas células SH-SY5Y utilizando microeletrodo modificado com filme de óxido de rutênio hexacianoferrato*

Estes experimentos foram realizados em colaboração com o Dr. Thiago R.L.C. Paixão, orientado pelo prof. Dr. Mauro Bertotti, no Departamento de Química Analítica do Instituto de Química da USP. O microeletrodo de carbono vítreo modificado com filme de óxido de rutênio hexacianoferrato (RuOHCF) foi desenvolvido pelo Dr. Paixão para detecção de ascorbato intracelular. Devido a sua pequena dimensão, o microeletrodo pode ser inserido em uma única célula em meio de cultura, sem danificá-la, e fazer uma medida seletiva da quantidade de ascorbato intracelular *in vivo*, utilizando potencial de 0 V.

Inicialmente, foi avaliado se componentes do meio de cultura ou a glutatona reduzida (GSH) interferiam na resposta do eletrodo, e se o eletrodo apresentava uma resposta linear a concentrações crescentes de ascorbato (**figura 4.21**).



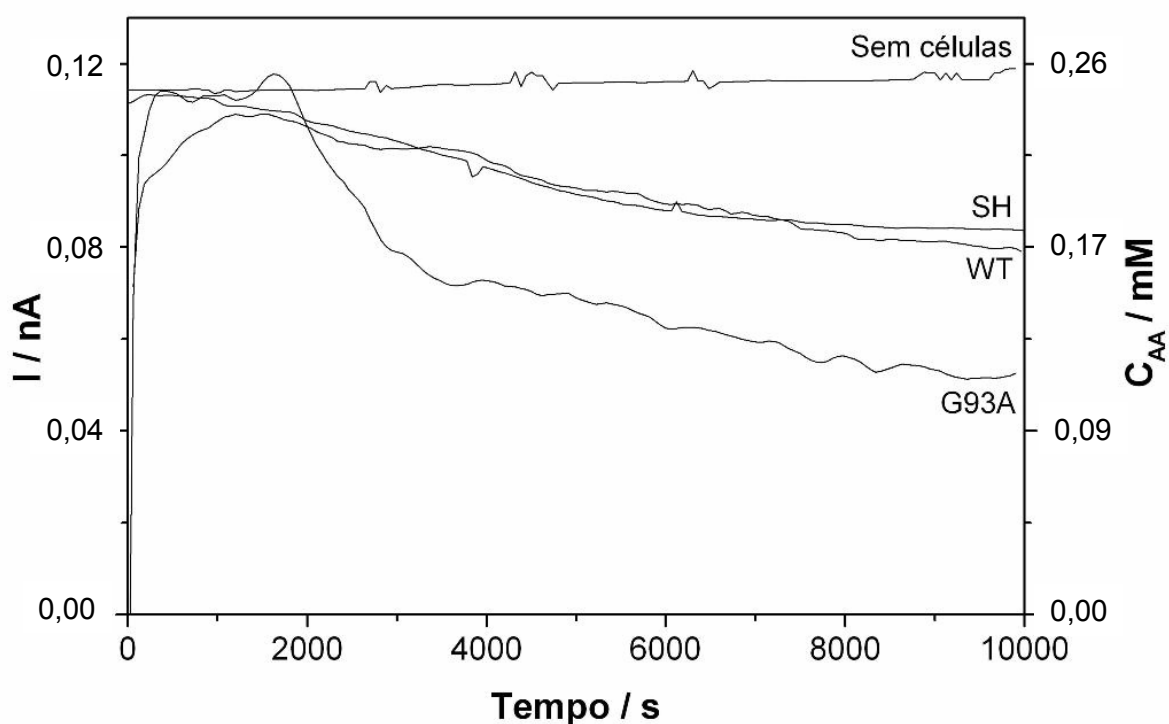
**Figura 4.21:** Sinal amperométrico registrado pela injeção de 40  $\mu\text{L}$  de GSH 100 mM à solução de trabalho (6 mL de MEM) (a). Aliquotas de ácido ascórbico foram injetadas (b-g) para construção da curva de calibração de correntes de estado estacionário pela concentração final de ácido ascórbico (AA) no meio (detalhe).

Os componentes do meio de cultura não apresentam resposta no microeletrodo, nem a GSH (**figura 4.21**). Já o ascorbato é eficientemente oxidado, apresentando uma resposta linear no microeletrodo que segue a equação  $(I / \text{nA}) = 0,00797 + 0,40107 (C / \text{mM})$ , com coeficiente de correlação  $R^2 = 0,9986$ .

O consumo de ascorbato pelos três tipos celulares (SH, WT e G93A) foi estudado. Adicionou-se ao meio de cultura 0,2 mM de ascorbato e 0,5 mM de GSH (para evitar a oxidação do ascorbato pelo ar). Medidas de corrente no meio de cultura foram tomadas de 1



em 1 min por 3 h. Os valores de corrente foram convertidos à concentração de ascorbato no meio de cultura utilizando a equação da reta dada no parágrafo anterior. O decaimento da corrente com o tempo, proporcional ao decaimento da concentração de ascorbato no meio, foi acompanhado (**figura 4.22**).



**Figura 4.22:** Decaimento da concentração de ascorbato (AA) no meio de cultura devido à captação pelas células. Eixo y esquerdo: corrente em nA. Eixo y direito: concentração de ascorbato em mM. As células foram incubadas por 3 h em meio MEM contendo GSH (0,5 mM) e ascorbato (0,2 mM).

O controle feito na ausência de células mostrou que o ascorbato não foi oxidado pelo ar na presença de GSH durante o período do experimento (3 h), sugerindo que o decaimento da concentração de ascorbato no meio de cultura ocorreu devido à captação de ascorbato pelas células SH, WT e G93A. Sabe-se que as células SH-SY5Y expressam receptores funcionais de ascorbato (May, Li *et al.*, 2006). Utilizando HPLC acoplado à detecção eletroquímica,

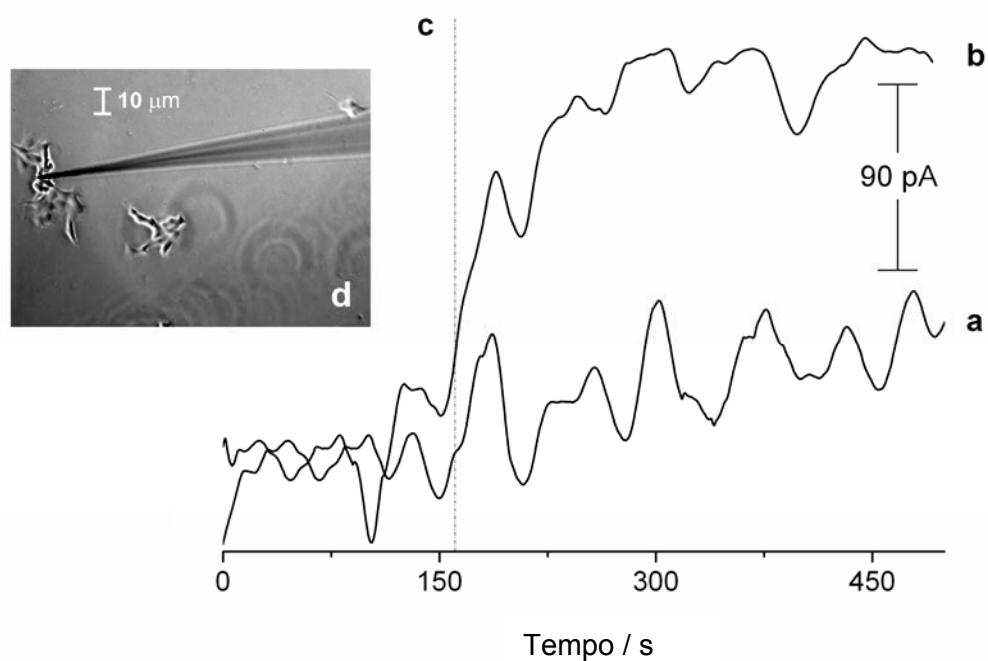
May mostrou que a incubação das células SH com ascorbato resulta em um consumo linear por até 1 h, mas que é possível observar consumo até 18 h de incubação. Também relatou que a absorção de ascorbato atinge um valor máximo (7 mM intracelular) nas incubações com 0,2 mM de ascorbato no meio de cultura. Por esse motivo, esta concentração de ascorbato foi escolhida para os experimentos aqui apresentados.

Após 3 h de incubação, as células SH e WT consumiram cerca de 30% do ascorbato presente no meio, enquanto as células G93A consumiram cerca de 50%. Ou seja, não houve diferença no consumo de ascorbato entre as células SH e WT, e as células G93A consumiram aproximadamente o dobro de ascorbato. A quantidade de células em cada poço foi normalizada por contagem em hemocitômetro ( $10^6$ ) e dosagem de proteína após os experimentos.

Sabe-se que o ascorbato é um importante antioxidante em neurônios, chegando a atingir concentrações intracelulares de 10 mM (Rice e Russo-Menna, 1998). As células transfectadas com SOD G93A produzem maior quantidade de espécies reativas de oxigênio do que as células controle (Beretta, Sala *et al.*, 2003; Cerqueira, 2007), e apresentam nível de lesão em DNA e lipoperoxidação aumentados (**item 4.2.2**). Estes dados indicam que as células G93A encontram-se em uma situação de estresse oxidativo, o que poderia justificar o seu maior consumo de ascorbato.

O microeletrodo de RuOHCF tipo agulha foi utilizado para medidas intracelulares da concentração de ascorbato nas células SH-SY5Y nativas (SH). Não foi possível inserir o eletrodo nas células WT e G93A devido ao seu tamanho reduzido em relação às células SH. Um aumento de corrente (90 pA) foi detectado quando o eletrodo foi inserido em uma única célula SH pré-incubada com ascorbato (**figura 4.23b**). Nenhum sinal foi observado quando o eletrodo foi inserido em uma célula SH sem prévia incubação com ascorbato (**figura 4.23a**). A concentração intracelular de ascorbato foi estimada em 1,3 mM através do valor da corrente

transiente obtida após a injeção de ascorbato (1 mM) neste mesmo sistema. Este valor está de acordo com o nível intracelular de ascorbato descrito na literatura para esta linhagem celular, variando de 0,5 a 6 mM (May, Li *et al.*, 2006).



**Figura 4.23:** Medidas de corrente monitoradas a 0 V vs eletrodo de Ag/AgCl com um eletrodo tipo agulha de RuOHCF em uma única célula SH-SY5Y em condições controle (a) e após 3 h de incubação com 0,2 mM ascorbato (b). A linha pontilhada (c) corresponde ao momento de inserção do eletrodo na célula. O detalhe (d) mostra uma imagem do eletrodo inserido na célula, adquirida em microscópio óptico.

## 5. Discussão

### 5.1 Estudos *in vitro* com SOD1 bovina

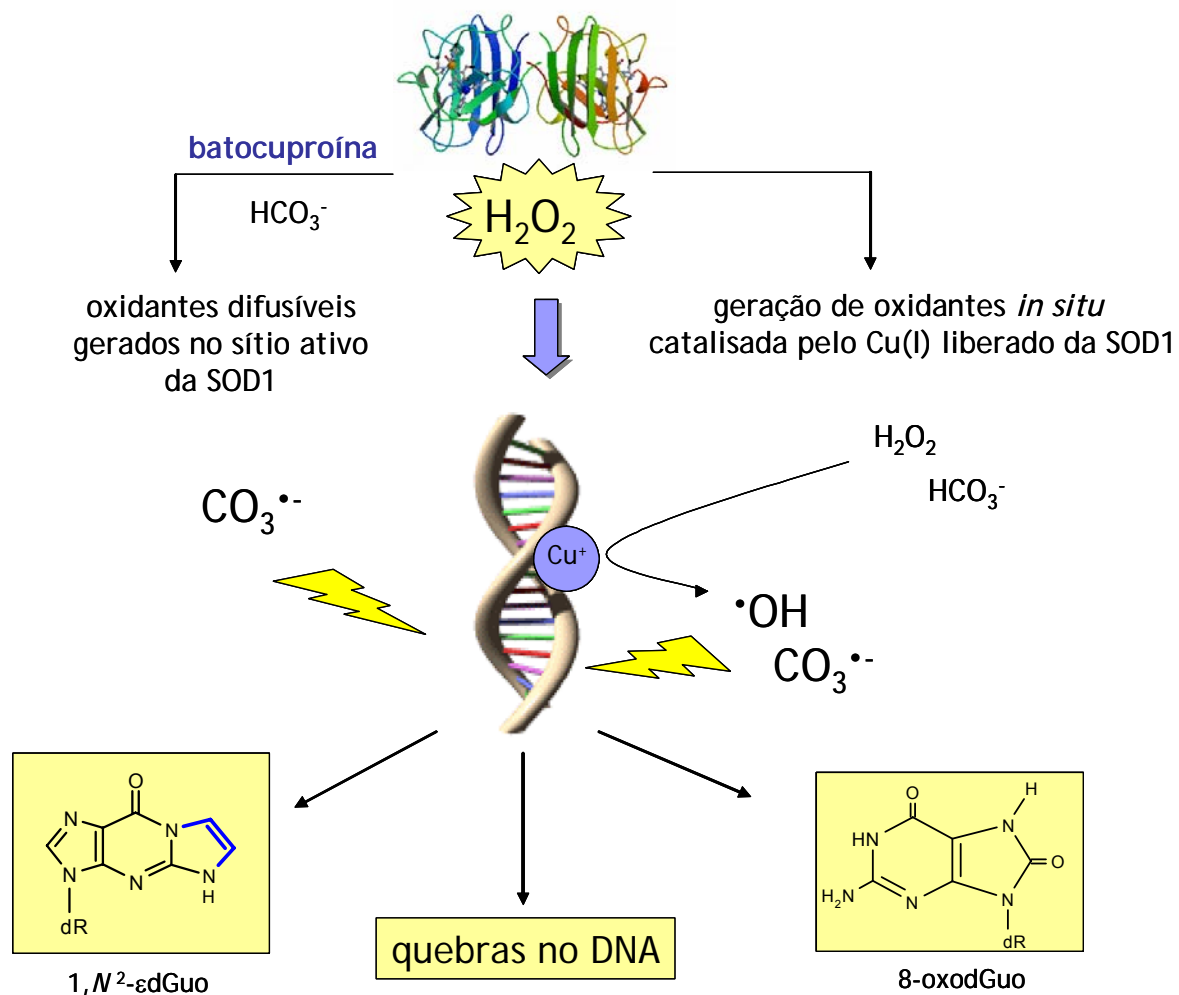
Confirmou-se neste trabalho que a SOD1 pode promover a formação de quebras em DNA e a formação de 8-oxodGuo na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vitro* (Kang e Kim, 1997; Kim, Lee *et al.*, 1998; Yoon, Koh *et al.*, 2000; Han, Shen *et al.*, 2007), e foi mostrado pela primeira vez que o sistema SOD1/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode promover a formação de 1,N<sup>2</sup>-εdGuo em DNA de timo de bezerro.

A inibição da formação de lesões no DNA causada pela adição de batocuproína indica que a formação de quebras no DNA, 8-oxodGuo e 1,N<sup>2</sup>-εdGuo é, principalmente, promovida por íons de cobre liberados do sítio ativo da SOD1. Os dados obtidos pela formação do complexo Cu(I)-batocuproína e pela perda da atividade SOD1 estão de acordo com esta hipótese, uma vez que os níveis mais altos de lesão no DNA foram obtidos nas incubações onde houve maior liberação de cobre da SOD1 (incubações de SOD1 com 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 24 h). Íons de cobre podem se ligar ao DNA com alta afinidade (Sagripanti, Goering *et al.*, 1991) e catalisar a geração de radicais hidroxila *in situ*. Outra possibilidade é a ligação do cobre liberado em outros sítios da própria SOD1, o que pode dar origem a radicais de aminoácidos na superfície da proteína (Ramirez, Gomez Mejiba *et al.*, 2005) capazes de oxidar resíduos de guanina no DNA. Uma transferência de elétron de uma guanina para um radical triptofanil na superfície da SOD1 é possível, já que o potencial de redução da guanina e do triptofano são semelhantes (1,29 e 1 V, respectivamente) (Butler, Land *et al.*, 1986; Steenken e Jovanovic, 1997) e os potenciais reais podem ser ainda mais próximos, dependendo da vizinhança dos resíduos. Se a SOD1 estiver associada ao DNA, a ligação do cobre liberado do sítio ativo à batocuproína se torna muito menos provável do que a sua ligação a outros sítios na proteína ou ao DNA. Esta associação SOD1-DNA, meramente especulativa neste contexto, seria um

mecanismo plausível para explicar os danos em DNA formados mesmo na presença da batocuproína.

A adição de bicarbonato resultou em aumento significativo nos níveis de 8-oxodGuo e 1,N<sup>2</sup>-εdGuo no DNA incubado com SOD1 e 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1 e 24 h. Os resultados mostraram que, na presença deste excesso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o bicarbonato não foi capaz de impedir a liberação do cobre e a inativação da SOD1. Isto significa que o efeito do bicarbonato sobre os danos em DNA dependeu do cobre liberado do sítio ativo da SOD1. Esta hipótese é reforçada pelo fato que a adição de batocuproína praticamente inibiu o efeito do bicarbonato. Portanto, neste trabalho, a atividade peroxidásica da SOD1 caracterizada pelo *turnover* da enzima e produção de radical carbonato difusível - revisado por (Medinas, Cerchiaro *et al.*, 2007) - teve pouca importância na formação dos danos em DNA. O aumento das lesões em DNA causado pelo bicarbonato pode ser explicado por um efeito modulador do CO<sub>2</sub> em oxidações catalisadas por cobre, como proposto por Ramirez e colaboradores (Ramirez, Mejiba *et al.*, 2005). Ramirez mostrou que o CO<sub>2</sub> impediu a fragmentação sítio-específica da SOD1 promovida por radicais hidroxila, mas aumentou a formação de radicais de proteína promovida por radicais carbonato. Uma modulação semelhante pode ter ocorrido no sistema aqui estudado, e poderia explicar porque o bicarbonato aumentou os níveis de 8-oxodGuo. O radical hidroxila pode oxidar as quatro bases e a ribose do DNA (Cadet, Delatour *et al.*, 1999). O radical carbonato, entretanto, por ser um oxidante mais fraco, é capaz de oxidar somente a guanina, que possui o menor potencial de redução (Shafirovich, Dourandin *et al.*, 2001). O efeito do bicarbonato também pode estar relacionado à sua habilidade de formar complexos com íons metálicos, como ferro, manganês e cobre, e então modular a sua reatividade (Stadtman, Berlett *et al.*, 1990; Arai, Berlett *et al.*, 2005). O cobre pode ser complexado pelo bicarbonato assim que é liberado do sítio ativo da SOD1, e este complexo pode interagir de maneira diferente com o DNA ou com outros sítios na proteína. Esta

hipótese pode explicar porque o bicarbonato aumentou os níveis de 8-oxodGuo e 1,*N*<sup>2</sup>-εdGuo em DNA incubado com SOD1/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



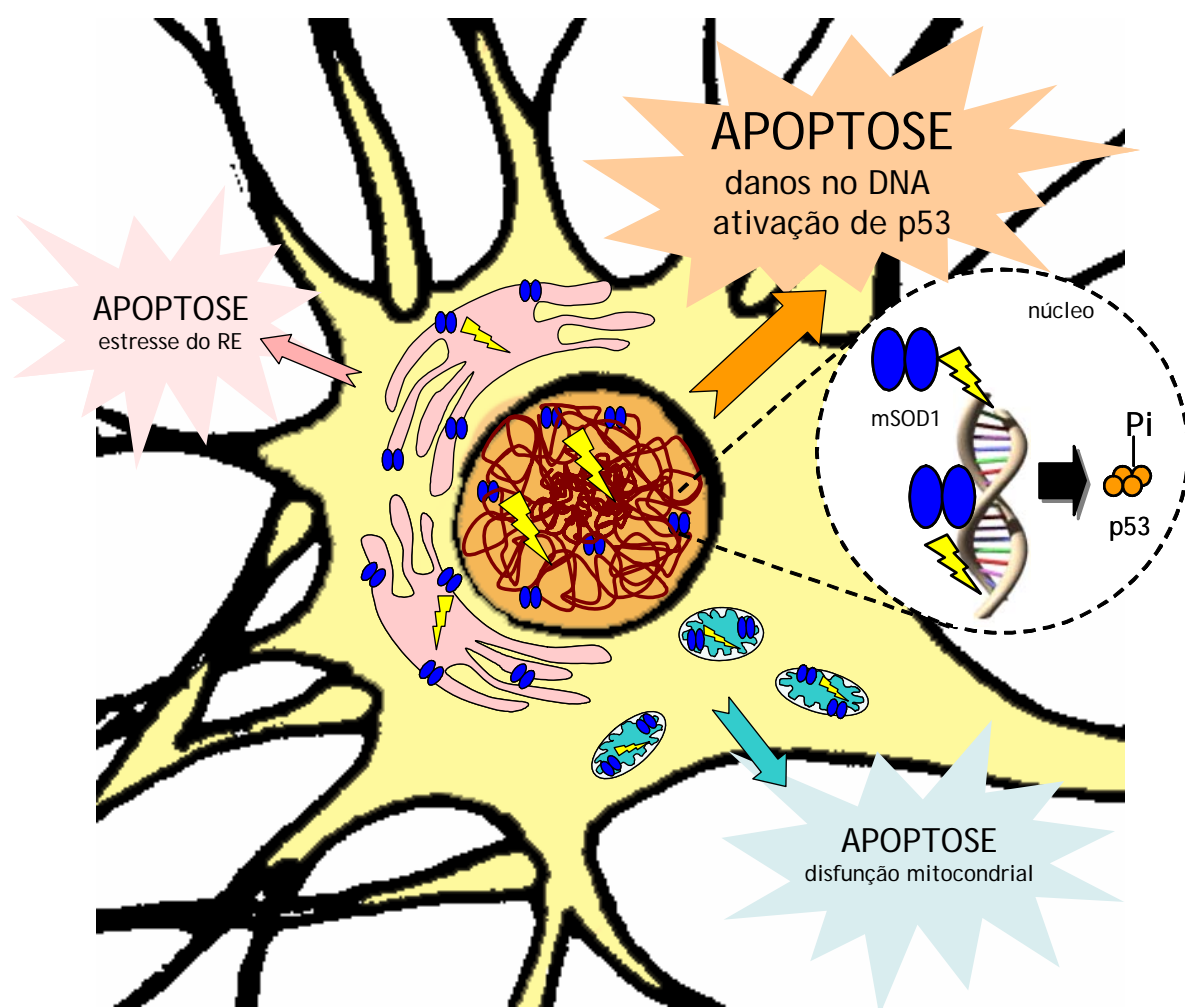
**Esquema 5.1:** Mecanismos envolvidos na formação de lesões no DNA promovidas pela SOD1 na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e bicarbonato.

## 5.2 Estudos com modelo celular de Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA)

Os neuroblastomas transfectados com SOD1 G93A possuem níveis aumentados de danos no DNA, como evidenciado pelo ensaio cometa e pela quantificação de 8-oxodGuo e 1,N<sup>2</sup>-εdGuo. Níveis elevados de 8-oxodGuo já foram observados anteriormente no DNA de pacientes e animais modelo de ELA (Fitzmaurice, Shaw *et al.*, 1996; Ferrante, Browne *et al.*, 1997; Bogdanov, Brown *et al.*, 2000; Ihara, Nobukuni *et al.*, 2005), mas a quantificação de eteno adutos de DNA nunca foi reportada em pacientes ou modelos da doença. Níveis elevados de eteno adutos já foram associados ao envelhecimento e a doenças crônicas envolvidas com estresse redox, como aterosclerose, Doença de Wilson, Doença de Crohn e câncer hepático (Nair, Sone *et al.*, 1996; Nair, Carmichael *et al.*, 1998; Nair, Sinitsina *et al.*, 2005; Nair, Gansauge *et al.*, 2006; Nair, De Flora *et al.*, 2007). Os níveis de eteno aduto apresentados neste trabalho estão de acordo com os níveis basais reportados na literatura (0-30 adutos/10<sup>8</sup> dGuo) (Nair, 1999; Nair, Bartsch *et al.*, 2007). Apesar dos níveis basais de 8-oxodGuo (0,1-5 adutos/10<sup>6</sup> dGuo) serem sempre mais elevados, a 8-oxodGuo é muito menos mutagênica do que os eteno-adutos (Levine, Yang *et al.*, 2000).

Ciriolo e Cerqueira mostraram que neuroblastomas transfectados com SOD1 G93A possuem níveis elevados de marcadores apoptóticos (Ciriolo, De Martino *et al.*, 2000; Cerqueira, 2007) e da proteína p53 (Ciriolo, De Martino *et al.*, 2000). Entretanto, o acúmulo de lesão no DNA e a ativação de p53 nunca foram investigados em um mesmo trabalho. No presente estudo, foi mostrado que o acúmulo de lesões no DNA das células G93A é responsável pela ativação da proteína p53, a qual desencadeia o processo apoptótico. O aumento do nível de 8-oxodGuo na urina, sangue e fluido cerebro-espinhal de pacientes com ELA foi correlacionado à severidade e à progressão da doença (Bogdanov, Brown *et al.*, 2000). Além disso, foi observado que pacientes de ELA possuem atividade alterada de enzimas de reparo do DNA (Kisby, Milne *et al.*, 1997; Shaikh e Martin, 2002; Kim,

Engelhardt *et al.*, 2004). Estas observações indicam que o acúmulo de danos no DNA pode ser um mecanismo inicial na degeneração dos neurônios motores, assim como o acúmulo de agregados protéicos (Julien, 2001) e a disfunção mitocondrial (Bacman, Bradley *et al.*, 2006), que acabam desencadeando a apoptose via estresse do retículo endoplasmático (RE) ou da mitocôndria (Liu, Lillo *et al.*, 2004; Ferri, Cozzolino *et al.*, 2006; Yamagishi, Koyama *et al.*, 2007; Nishitoh, Kadowaki *et al.*, 2008).



**Esquema 5.2:** Mecanismos envolvidos na ativação da apoptose de neurônios motores na patologia de ELA.



A participação da apoptose na patologia de ELA foi contestada em alguns trabalhos, devido à ausência de marcadores apoptóticos na análise de tecidos de pacientes (He e Strong, 2000; Embacher, Kaufmann *et al.*, 2001; Yamazaki, Esumi *et al.*, 2005) e também em modelos animais (Martin, Liu *et al.*, 2007). A grande limitação dos trabalhos feitos com tecidos de pacientes é que são análises *post-mortem*, ou seja, no estágio final da doença. A ativação da apoptose pode ser um evento inicial na doença que, com o agravamento dos sintomas, pode adquirir um quadro mais próximo à necrose. Já em animais modelo, não é surpreendente o mecanismo de morte estar mais próximo de necrose do que de apoptose, uma vez que o nível de expressão da SOD1 mutante é muito elevado (cerca de 20 vezes) e os animais desenvolvem os sintomas em tempo muito curto, em comparação com os humanos (Gurney, Pu *et al.*, 1994; Howland, Liu *et al.*, 2002). Entretanto, outros trabalhos com pacientes e animais modelo mostraram que vias apoptóticas estão envolvidas na patologia de ELA (Martin, 1999; Schoser, Wehling *et al.*, 2001; Sathasivam e Shaw, 2005), inclusive a via ativada pela proteína p53 (De La Monte, Sohn *et al.*, 1998; Martin, 2000; Eve, Dennis *et al.*, 2007). Isto indica que o estudo de modelos celulares, com nível de expressão da SOD1 mais próxima ao normal, são ainda necessários para compreender os mecanismos iniciais da patologia de ELA.

No presente trabalho, se propõe que os danos em DNA observados no modelo celular de ELA podem ser resultado direto da atividade peroxidásica da SOD1. A presença da SOD1 no núcleo de células de mamífero já havia sido descrita anteriormente (Slot, Geuze *et al.*, 1986; Chang, Slot *et al.*, 1988; Del Maestro e McDonald, 1989). Os resultados aqui apresentados corroboram esta informação e mostram pela primeira vez que a SOD1 pode se associar ao DNA. Tal fato tornou possível uma correlação direta entre a atividade peroxidásica da SOD1 mutante e o aumento dos níveis de lesão em DNA observados nas células G93A. Uma vez associada ao DNA, a SOD1 G93A pode diretamente promover danos

no DNA, através da geração de oxidantes *in situ*. Foi observado que a SOD1 G93A nuclear se associa mais ao DNA e possui atividade peroxidásica aumentada em relação à SOD1 nativa. O aumento dos danos em DNA após tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi muito mais pronunciado nas células G93A, comparado com as células SH e WT, o que também pode ser um indício da maior atividade peroxidásica da enzima mutante presente no núcleo celular. Este resultado é muito valioso, uma vez que *in vitro*, não existe diferença entre a atividade peroxidásica da SOD1 mutante e a SOD1 nativa (comunicação pessoal com Ohara Augusto). Isto porque *in vivo* a conformação da enzima mutante, inclusive o seu conteúdo de zinco e cobre, pode ser muito diferente do que em um sistema *in vitro* simplificado, onde a interação com outras biomoléculas é muito restrita. Quantificar a atividade peroxidásica da SOD1 *in vivo* ou em extratos celulares não é uma tarefa fácil, devido à extensa gama de interferentes existentes na célula. Além de nós, poucos grupos se propuseram a realizar este trabalho (Zhang, Joseph *et al.*, 2002; Cerqueira, 2007), extremamente necessário para comprovar que as mutações na SOD1 características de ELA conferem maior atividade peroxidásica à enzima.

Os resultados sobre o consumo de ascorbato pelos neuroblastomas acrescentaram informações inéditas e complementares aos resultados obtidos sobre lesões no DNA. Foi mostrado que as células G93A consomem quase o dobro de ascorbato que as células SH e WT, o que pode ser resultado da situação de estresse redox na qual se encontram as células com SOD1 mutante. Devido à elevada concentração do ascorbato em neurônios, diversos trabalhos buscam uma relação entre um distúrbio na homeostase de ascorbato e a morte dos neurônios motores em ELA. É conhecido que a concentração de ascorbato no sangue e nas células diminui com a idade, e que existe um acoplamento entre a liberação de ascorbato e a captação de glutamato (Moor, Shohami *et al.*, 2006). Além disso, a administração de doses altas de ascorbato aumentou o tempo de vida de animais modelo de ELA (Nagano, Fujii *et al.*, 2003).

## 6. Conclusões

As causas da morte dos neurônios motores em ELA são ainda muito debatidas. Acúmulo de lesões em biomoléculas, excitotoxicidade por glutamato, disfunção e agregação de proteínas, problemas no transporte axonal e processos neuro-inflamatórios estão envolvidos neste complexo cenário. Mutações na SOD1 foram associadas a alguns casos familiares de ELA, mas apesar de todo o progresso feito nos últimos anos, o mecanismo responsável pela toxicidade das SOD1s mutantes ainda não foi totalmente compreendido. Por apresentar menor afinidade pelo zinco e diferente conformação, acredita-se que as SOD1s mutantes possuam maior atividade peroxidásica. Esta atividade peroxidásica poderia estar diretamente envolvida com o acúmulo de lesões em biomoléculas observado nos pacientes de ELA. Estudos com sistemas modelo são ainda necessários e podem ajudar a elucidar o papel da atividade peroxidásica da SOD1 na complexa patologia de ELA.

O estudo *in vitro* aqui apresentado ajudou a compreender o mecanismo envolvido na formação de danos em DNA promovida pelo sistema SOD1/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, mostrando a participação do radical carbonato e o papel central de íons de cobre liberados do sítio ativo da enzima. Concentrações elevadas de cobre foram detectadas em pacientes de ELA e outras doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson (Sayre, Smith *et al.*, 2001; Doraiswamy e Finefrock, 2004; Ihara, Nobukuni *et al.*, 2005; Tabner, El-Agnaf *et al.*, 2005). Sabe-se que excesso de cobre pode desencadear apoptose neuronal (Levenson, 2005). A SOD1 é uma enzima muito abundante no sistema nervoso (aproximadamente 0,2% da proteína total) e um dos principais estoques intracelulares de cobre (Rotilio, Calabrese *et al.*, 1972). Portanto, a liberação do cobre da SOD1 pode ter um papel importante na formação de danos a biomoléculas nos neurônios.

Utilizando um modelo celular de ELA, foi observado pela primeira vez que a SOD1 pode estar associada à cromatina, e que a SOD1 G93A possui maior afinidade pelo DNA.

Além disso, os resultados obtidos apontaram para uma atividade pró-oxidante e pró-apoptótica da SOD1 G93A no núcleo, e indicaram que lesões no DNA podem ter um papel importante no mecanismo de morte dos neurônios motores na patologia de ELA, via ativação de p53. A toxicidade das SOD1s mutantes foi muito associada ao seu recrutamento para a mitocôndria e retículo endoplasmático (RE), desencadeando o processo de apoptose (Liu, Lillo *et al.*, 2004; Ferri, Cozzolino *et al.*, 2006; Yamagishi, Koyama *et al.*, 2007; Nishitoh, Kadowaki *et al.*, 2008). Neste trabalho, é proposto que o recrutamento da SOD1 G93A para o núcleo pode ser tão tóxico quanto para a mitocôndria e RE, uma vez que a enzima pode se associar ao DNA e promover diretamente danos nesta biomolécula, desencadeando o processo apoptótico via ativação da proteína p53.

A eficiência do microeletrodo modificado com filme de RuOHCF como um sensor de ascorbato em meio de cultura e no meio intracelular foi comprovada. O microeletrodo se mostrou muito sensível e seletivo, sendo adequado para monitorar o consumo de ascorbato em ambientes celulares. O microeletrodo é uma ferramenta potente para estudos *in situ*, permitindo determinar a concentração de ascorbato dentro de uma única célula. Utilizando este microeletrodo, observou-se que as células G93A consomem mais ascorbato do que as células controle, indicando que uma alteração na homeostase do ascorbato pode estar envolvida em ELA.

## 7. Considerações finais e perspectivas

O projeto de doutorado que se finaliza com esta tese teve desde o início duas frentes de interesse: estudar os mecanismos da atividade peroxidásica da SOD1 e buscar evidências do envolvimento desta atividade na patologia de ELA. Para o estudo dos mecanismos da atividade peroxidásica da SOD1, foram conduzidos experimentos *in vitro* com a SOD1 bovina. E para o estudo da atividade peroxidásica da SOD1 em um modelo celular de ELA, foram utilizados os neuroblastomas transfectados com SOD1 mutante G93A. Em ambas as frentes, o DNA ganhou o foco central dos experimentos, sendo utilizado como biomolécula alvo nos estudos *in vitro*, e como biomarcador nos estudos celulares. A quantificação de lesões no DNA trouxe informações muito valiosas sobre o comportamento da SOD1 na presença de  $H_2O_2$ , principalmente sobre a alteração da afinidade do sítio ativo da enzima pelo cobre. A homeostase do cobre é um assunto de extrema relevância biológica, mas não trata propriamente da atividade peroxidásica da SOD1, e sim de um papel pró-oxidante da enzima. No modelo celular de ELA, a quantificação de lesões no DNA permitiu confirmar o caráter pró-oxidante e pró-apoptótico da SOD1 mutante G93A. A atenção ao núcleo das células culminou na mais importante descoberta deste trabalho: a interação entre a SOD1 e o DNA. Um assunto nunca antes abordado na literatura, talvez um novo papel para esta enzima tão abundante nas células, e um novo elemento na complexa conexão entre SOD1 e ELA. Cada uma das frentes trouxe contribuições independentes sobre SOD1 e ELA, a qual está muito longe de estar completa. Curiosamente, uma perspectiva única resultou das duas abordagens: estudar a natureza da interação entre SOD1 e DNA e descobrir se esta interação possui um papel no metabolismo normal da célula e na patologia de ELA.

## 8. Referências

- Agarwal, R. e G. S. Shukla. **Potential role of cerebral glutathione in the maintenance of blood-brain barrier integrity in rat.** Neurochem Res, v.24, n.12, Dec, p.1507-14. 1999.
- Aikens, J. e T. A. Dix. **Perhydroxyl radical (HOO.) initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides.** J Biol Chem, v.266, n.23, Aug 15, p.15091-8. 1991.
- Akaishi, T., T. Shiomi, H. Sawada e H. Yokosawa. **Purification and properties of the 26S proteasome from the rat brain: evidence for its degradation of myelin basic protein in a ubiquitin-dependent manner.** Brain Res, v.722, n.1-2, May 25, p.139-44. 1996.
- Andersen, J. K. **Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?** Nat Med, v.10 Suppl, Jul, p.S18-25. 2004.
- Andrus, P. K., T. J. Fleck, M. E. Gurney e E. D. Hall. **Protein oxidative damage in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis.** J Neurochem, v.71, n.5, Nov, p.2041-8. 1998.
- Arai, H., B. S. Berlett, P. B. Chock e E. R. Stadtman. **Effect of bicarbonate on iron-mediated oxidation of low-density lipoprotein.** Proc Natl Acad Sci U S A, v.102, n.30, Jul 26, p.10472-7. 2005.
- Augusto, O., M. G. Bonini, A. M. Amanso, E. Linares, C. C. Santos e S. L. De Menezes. **Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology.** Free Radic Biol Med, v.32, n.9, May 1, p.841-59. 2002.
- Awada, M. e P. C. Dedon. **Formation of the 1,N2-glyoxal adduct of deoxyguanosine by phosphoglycolaldehyde, a product of 3'-deoxyribose oxidation in DNA.** Chem Res Toxicol, v.14, n.9, Sep, p.1247-53. 2001.
- Bacman, S. R., W. G. Bradley e C. T. Moraes. **Mitochondrial involvement in amyotrophic lateral sclerosis: trigger or target?** Mol Neurobiol, v.33, n.2, Apr, p.113-31. 2006.
- Barber, S. C., R. J. Mead e P. J. Shaw. **Oxidative stress in ALS: a mechanism of neurodegeneration and a therapeutic target.** Biochim Biophys Acta, v.1762, n.11-12, Nov-Dec, p.1051-67. 2006.
- Bartsch, H. **Studies on biomarkers in cancer etiology and prevention: a summary and challenge of 20 years of interdisciplinary research.** Mutat Res, v.462, n.2-3, Apr, p.255-79. 2000.
- Bartsch, H., A. Barbin, M. J. Marion, J. Nair e Y. Guichard. **Formation, detection, and role in carcinogenesis of ethenobases in DNA.** Drug Metab Rev, v.26, n.1-2, p.349-71. 1994.
- Bartsch, H. e J. Nair. **Ultrasensitive and specific detection methods for exocyclic DNA adducts: markers for lipid peroxidation and oxidative stress.** Toxicology, v.153, n.1-3, Nov 16, p.105-14. 2000.

Basso, M., S. Giraud, D. Corpillo, B. Bergamasco, L. Lopiano e M. Fasano. **Proteome analysis of human substantia nigra in Parkinson's disease.** Proteomics, v.4, n.12, Dec, p.3943-52. 2004.

Basu, A. K., M. L. Wood, L. J. Niedernhofer, L. A. Ramos e J. M. Essigmann. **Mutagenic and genotoxic effects of three vinyl chloride-induced DNA lesions: 1,N6-ethenoadenine, 3,N4-ethenocytosine, and 4-amino-5-(imidazol-2-yl)imidazole.** Biochemistry, v.32, n.47, Nov 30, p.12793-801. 1993.

Beal, M. F., R. J. Ferrante, S. E. Browne, R. T. Matthews, N. W. Kowall e R. H. Brown, Jr. **Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis.** Ann Neurol, v.42, n.4, Oct, p.644-54. 1997.

Beauchamp, C. e I. Fridovich. **Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels.** Anal Biochem, v.44, n.1, Nov, p.276-87. 1971.

Bendotti, C. e M. T. Carri. **Lessons from models of SOD1-linked familial ALS.** Trends Mol Med, v.10, n.8, Aug, p.393-400. 2004.

Beretta, S., G. Sala, L. Mattavelli, C. Ceresa, A. Casciati, A. Ferri, M. T. Carri e C. Ferrarese. **Mitochondrial dysfunction due to mutant copper/zinc superoxide dismutase associated with amyotrophic lateral sclerosis is reversed by N-acetylcysteine.** Neurobiol Dis, v.13, n.3, Aug, p.213-21. 2003.

Blair, I. A. **DNA adducts with lipid peroxidation products.** J Biol Chem, v.283, n.23, Jun 6, p.15545-9. 2008.

Bogdanov, M., R. H. Brown, W. Matson, R. Smart, D. Hayden, H. O'donnell, M. Flint Beal e M. Cudkowicz. **Increased oxidative damage to DNA in ALS patients.** Free Radic Biol Med, v.29, n.7, Oct 1, p.652-8. 2000.

Boillee, S., C. Vande Velde e D. W. Cleveland. **ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors.** Neuron, v.52, n.1, Oct 5, p.39-59. 2006.

Boiteux, S., L. Gellon e N. Guibourt. **Repair of 8-oxoguanine in Saccharomyces cerevisiae: interplay of DNA repair and replication mechanisms.** Free Radic Biol Med, v.32, n.12, Jun 15, p.1244-53. 2002.

Bradford, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Anal Biochem, v.72, May 7, p.248-54. 1976.

Brannan, T. S., H. S. Maker e I. P. Raes. **Regional distribution of catalase in the adult rat brain.** J Neurochem, v.36, n.1, Jan, p.307-9. 1981.

Bredesen, D. E., R. V. Rao e P. Mehlen. **Cell death in the nervous system.** Nature, v.443, n.7113, Oct 19, p.796-802. 2006.

Burcham, P. C. **Internal hazards: baseline DNA damage by endogenous products of normal metabolism.** Mutat Res, v.443, n.1-2, Jul 15, p.11-36. 1999.

Burcham, P. C. **Potentialities and pitfalls accompanying chemico-pharmacological strategies against endogenous electrophiles and carbonyl stress.** Chem Res Toxicol, v.21, n.4, Apr, p.779-86. 2008.

Burrows, C. J. e J. G. Muller. **Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission.** Chem Rev, v.98, n.3, May 7, p.1109-1152. 1998.

Burton, G. W., U. Wronska, L. Stone, D. O. Foster e K. U. Ingold. **Biokinetics of dietary RRR-alpha-tocopherol in the male guinea pig at three dietary levels of vitamin C and two levels of vitamin E. Evidence that vitamin C does not "spare" vitamin E in vivo.** Lipids, v.25, n.4, Apr, p.199-210. 1990.

Butler, J., E. J. Land, W. A. Prutz e A. J. Swallow. **Reversibility of Charge-Transfer between Tryptophan and Tyrosine.** Journal of the Chemical Society-Chemical Communications, n.4, Feb 15, p.348-349. 1986.

Cadet, J. DNA Damage caused by oxidation, deamination, ultraviolet radiation and photoexcited psoralens. In: (Ed.). **DNA Adducts: Identification and Biological Significance.** Lyon: IARC Scientific Publications, v.125, 1994. DNA Damage caused by oxidation, deamination, ultraviolet radiation and photoexcited psoralens

Cadet, J., T. Delatour, T. Douki, D. Gasparutto, J. P. Pouget, J. L. Ravanat e S. Sauvaigo. **Hydroxyl radicals and DNA base damage.** Mutat Res, v.424, n.1-2, Mar 8, p.9-21. 1999.

Cadet, J., T. Douki e J. L. Ravanat. **Oxidatively generated damage to the guanine moiety of DNA: mechanistic aspects and formation in cells.** Acc Chem Res, v.41, n.8, Aug, p.1075-83. 2008.

Carri, M. T., A. Ferri, A. Battistoni, L. Famhy, R. Gabbianelli, F. Poccia e G. Rotilio. **Expression of a Cu,Zn superoxide dismutase typical of familial amyotrophic lateral sclerosis induces mitochondrial alteration and increase of cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration in transfected neuroblastoma SH-SY5Y cells.** FEBS Lett, v.414, n.2, Sep 8, p.365-8. 1997.

Carri, M. T., A. Ferri, M. Cozzolino, L. Calabrese e G. Rotilio. **Neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis: the role of oxidative stress and altered homeostasis of metals.** Brain Res Bull, v.61, n.4, Aug 30, p.365-74. 2003.

Cerqueira, F. **Conseqüências da expressão da enzima Cu,Zn-superóxido dismutase (SOD1) e sua mutante G93A em neuroblastomas. Implicações para a esclerose lateral amiotrófica.** Departamento de Bioquímica do Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Cha, C. I., Y. H. Chung, C. M. Shin, D. H. Shin, Y. S. Kim, M. E. Gurney e K. W. Lee. **Immunocytochemical study on the distribution of nitrotyrosine in the brain of the transgenic mice expressing a human Cu/Zn SOD mutation.** Brain Res, v.853, n.1, Jan 17, p.156-61. 2000.



Chang, L. Y., J. W. Slot, H. J. Geuze e J. D. Crapo. **Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes.** J Cell Biol, v.107, n.6 Pt 1, Dec, p.2169-79. 1988.

Charcot, J. e A. Joffroy. **Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lesion de la substance grise et des faisceaux antero-lateraux de la moelle epiniere.** Arch Physiol Neurol Path v.2, p.744-754. 1869.

Cheng, K. C., B. D. Preston, D. S. Cahill, M. K. Dosanjh, B. Singer e L. A. Loeb. **The vinyl chloride DNA derivative N2,3-ethenoguanine produces G----A transitions in Escherichia coli.** Proc Natl Acad Sci U S A, v.88, n.22, Nov 15, p.9974-8. 1991.

Cho, K. J., Y. H. Chung, C. Shin, D. H. Shin, Y. S. Kim, M. E. Gurney, K. W. Lee e C. I. Cha. **Reactive astrocytes express p53 in the spinal cord of transgenic mice expressing a human Cu/Zn SOD mutation.** Neuroreport, v.10, n.18, Dec 16, p.3939-43. 1999.

Chung, F. L., H. J. Chen e R. G. Nath. **Lipid peroxidation as a potential endogenous source for the formation of exocyclic DNA adducts.** Carcinogenesis, v.17, n.10, Oct, p.2105-11. 1996.

Ciriolo, M. R., A. De Martino, E. Lafavia, L. Rossi, M. T. Carri e G. Rotilio. **Cu,Zn-superoxide dismutase-dependent apoptosis induced by nitric oxide in neuronal cells.** J Biol Chem, v.275, n.7, Feb 18, p.5065-72. 2000.

Coyle, J. T. e P. Puttfarcken. **Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders.** Science, v.262, n.5134, Oct 29, p.689-95. 1993.

Cozzolino, M., A. Ferri e M. T. Carri. **Amyotrophic lateral sclerosis: from current developments in the laboratory to clinical implications.** Antioxid Redox Signal, v.10, n.3, Mar, p.405-43. 2008.

Crean, C., N. E. Geacintov e V. Shafirovich. **Oxidation of guanine and 8-oxo-7,8-dihydroguanine by carbonate radical anions: insight from oxygen-18 labeling experiments.** Angew Chem Int Ed Engl, v.44, n.32, Aug 12, p.5057-60. 2005.

Crow, J. P., N. Y. Calingasan, J. Chen, J. L. Hill e M. F. Beal. **Manganese porphyrin given at symptom onset markedly extends survival of ALS mice.** Ann Neurol, v.58, n.2, Aug, p.258-65. 2005.

Danial, N. N. e S. J. Korsmeyer. **Cell death: critical control points.** Cell, v.116, n.2, Jan 23, p.205-19. 2004.

De La Monte, S. M., Y. K. Sohn, N. Ganju e J. R. Wands. **P53- and CD95-associated apoptosis in neurodegenerative diseases.** Lab Invest, v.78, n.4, Apr, p.401-11. 1998.

Dean, R. T., S. Fu, R. Stocker e M. J. Davies. **Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation.** Biochem J, v.324 ( Pt 1), May 15, p.1-18. 1997.

Dedon, P. C. **The chemical toxicology of 2-deoxyribose oxidation in DNA.** Chem Res Toxicol, v.21, n.1, Jan, p.206-19. 2008.

Dedon, P. C. e I. H. Goldberg. **Free-radical mechanisms involved in the formation of sequence-dependent bistranded DNA lesions by the antitumor antibiotics bleomycin, neocarzinostatin, and calicheamicin.** Chem Res Toxicol, v.5, n.3, May-Jun, p.311-32. 1992.

Del Maestro, R. e W. McDonald. **Subcellular localization of superoxide dismutases, glutathione peroxidase and catalase in developing rat cerebral cortex.** Mech Ageing Dev, v.48, n.1, Apr, p.15-31. 1989.

Doraiswamy, P. M. e A. E. Finefrock. **Metals in our minds: therapeutic implications for neurodegenerative disorders.** Lancet Neurol, v.3, n.7, Jul, p.431-4. 2004.

Elam, J. S., K. Malek, J. A. Rodriguez, P. A. Doucette, A. B. Taylor, L. J. Hayward, D. E. Cabelli, J. S. Valentine e P. J. Hart. **An alternative mechanism of bicarbonate-mediated peroxidation by copper-zinc superoxide dismutase: rates enhanced via proposed enzyme-associated peroxy carbonate intermediate.** J Biol Chem, v.278, n.23, Jun 6, p.21032-9. 2003.

Embacher, N., W. A. Kaufmann, R. Beer, H. Maier, K. A. Jellinger, W. Poewe e G. Ransmayr. **Apoptosis signals in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: an immunocytochemical study.** Acta Neuropathol, v.102, n.5, Nov, p.426-34. 2001.

Esterbauer, H., J. Lang, S. Zdravec e T. F. Slater. **Detection of malonaldehyde by high-performance liquid chromatography.** Methods Enzymol, v.105, p.319-28. 1984.

Eve, D. J., J. S. Dennis e B. A. Citron. **Transcription factor p53 in degenerating spinal cords.** Brain Res, v.1150, May 30, p.174-81. 2007.

Ferrante, K. L., J. Shefner, H. Zhang, R. Betensky, M. O'brien, H. Yu, M. Fantasia, J. Taft, M. F. Beal, B. Traynor, K. Newhall, P. Donofrio, J. Caress, C. Ashburn, B. Freiberg, C. O'Neill, C. Paladenech, T. Walker, A. Pestronk, B. Abrams, J. Florence, R. Renna, J. Schierbecker, B. Malkus e M. Cudkowicz. **Tolerance of high-dose (3,000 mg/day) coenzyme Q10 in ALS.** Neurology, v.65, n.11, Dec 13, p.1834-6. 2005.

Ferrante, R. J., S. E. Browne, L. A. Shinobu, A. C. Bowling, M. J. Baik, U. Macgarvey, N. W. Kowall, R. H. Brown, Jr. e M. F. Beal. **Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis.** J Neurochem, v.69, n.5, Nov, p.2064-74. 1997.

Ferrante, R. J., A. M. Klein, A. Dedeoglu e M. F. Beal. **Therapeutic efficacy of EGb761 (Ginkgo biloba extract) in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.** J Mol Neurosci, v.17, n.1, Aug, p.89-96. 2001.

Ferri, A., M. Cozzolino, C. Crosio, M. Nencini, A. Casciati, E. B. Gralla, G. Rotilio, J. S. Valentine e M. T. Carri. **Familial ALS-superoxide dismutases associate with mitochondria and shift their redox potentials.** Proc Natl Acad Sci U S A, v.103, n.37, Sep 12, p.13860-5. 2006.

Ferri, K. F. e G. Kroemer. **Organelle-specific initiation of cell death pathways.** Nat Cell Biol, v.3, n.11, Nov, p.E255-63. 2001.

Fey, E. G. e S. Penman. **Tumor promoters induce a specific morphological signature in the nuclear matrix-intermediate filament scaffold of Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell colonies.** Proc Natl Acad Sci U S A, v.81, n.14, Jul, p.4409-13. 1984.

Finkel, T. e N. J. Holbrook. **Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing.** Nature, v.408, n.6809, Nov 9, p.239-47. 2000.

Fitzmaurice, P. S., I. C. Shaw, H. E. Kleiner, R. T. Miller, T. J. Monks, S. S. Lau, J. D. Mitchell e P. G. Lynch. **Evidence for DNA damage in amyotrophic lateral sclerosis.** Muscle Nerve, v.19, n.6, Jun, p.797-8. 1996.

Floyd, R. A., J. J. Watson, P. K. Wong, D. H. Altmiller e R. C. Rickard. **Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine: sensitive detection and mechanisms of formation.** Free Radic Res Commun, v.1, n.3, p.163-72. 1986.

Frelon, S., Douki, T., Favier, A. e Cadet, J. **Hydroxyl radical is not the main reactive species involved in the degradation of DNA bases by copper in the presence of hydrogen peroxide.** Chem Res Toxicol, v.16, n.2, Feb, p.191-7. 2003.

Galbusera, A., L. Tremolizzo, L. Brighina, D. Testa, R. Lovati, C. Ferrarese, G. Cavaletti e G. Filippini. **Vitamin E intake and quality of life in amyotrophic lateral sclerosis patients: a follow-up case series study.** Neurol Sci, v.27, n.3, Jul, p.190-3. 2006.

Gonzalez De Aguilar, J. L., J. W. Gordon, F. Rene, M. De Tapia, B. Lutz-Bucher, C. Gaiddon e J. P. Loeffler. **Alteration of the Bcl-x/Bax ratio in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: evidence for the implication of the p53 signaling pathway.** Neurobiol Dis, v.7, n.4, Aug, p.406-15. 2000.

Goodall, E. F. e K. E. Morrison. **Amyotrophic lateral sclerosis (motor neuron disease): proposed mechanisms and pathways to treatment.** Expert Rev Mol Med, v.8, n.11, p.1-22. 2006.

Goss, S. P., R. J. Singh e B. Kalyanaraman. **Bicarbonate enhances the peroxidase activity of Cu,Zn-superoxide dismutase. Role of carbonate anion radical.** J Biol Chem, v.274, n.40, Oct 1, p.28233-9. 1999.

Gros, L., A. A. Ishchenko e M. Saporbaev. **Enzymology of repair of etheno-adducts.** Mutat Res, v.531, n.1-2, Oct 29, p.219-29. 2003.

Gunther, M. R., J. A. Peters e M. K. Sivaneri. **Histidinyl radical formation in the self-peroxidation reaction of bovine copper-zinc superoxide dismutase.** J Biol Chem, v.277, n.11, Mar 15, p.9160-6. 2002.

Gurney, M. E., H. Pu, A. Y. Chiu, M. C. Dal Canto, C. Y. Polchow, D. D. Alexander, J. Caliendo, A. Hentati, Y. W. Kwon, H. X. Deng e Et Al. **Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation.** Science, v.264, n.5166, Jun 17, p.1772-5. 1994.

Ha, H. C. e S. H. Snyder. **Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion.** Proc Natl Acad Sci U S A, v.96, n.24, Nov 23, p.13978-82. 1999.

Hall, E. D., P. K. Andrus, J. A. Oostveen, T. J. Fleck e M. E. Gurney. **Relationship of oxygen radical-induced lipid peroxidative damage to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS.** J Neurosci Res, v.53, n.1, Jul 1, p.66-77. 1998.

Halliwell, B. **Oxygen radicals, nitric oxide and human inflammatory joint disease.** Ann Rheum Dis, v.54, n.6, Jun, p.505-10. 1995.

Halliwell, B. **Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment.** Drugs Aging, v.18, n.9, p.685-716. 2001.

Halliwell, B. **Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?** J Neurochem, v.97, n.6, Jun, p.1634-58. 2006.

Halliwell, B. e J. Gutteridge. **Free radicals in biology and medicine.** Oxford: University Press. 1999

Han, Y., T. Shen, W. Jiang, Q. Xia e C. Liu. **DNA cleavage mediated by copper superoxide dismutase via two pathways.** J Inorg Biochem, v.101, n.2, Feb, p.214-24. 2007.

Hansen, M. B., S. E. Nielsen e K. Berg. **Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill.** J Immunol Methods, v.119, n.2, May 12, p.203-10. 1989.

Harris, E. D. **The iron-copper connection: the link to ceruloplasmin grows stronger.** Nutr Rev, v.53, n.6, Jun, p.170-3. 1995.

Harrison, J. E. e J. Schultz. **Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase.** J Biol Chem, v.251, n.5, Mar 10, p.1371-4. 1976.

Harrison, P. M. e P. Arosio. **The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation.** Biochim Biophys Acta, v.1275, n.3, Jul 31, p.161-203. 1996.

He, B. P. e M. J. Strong. **Motor neuronal death in sporadic amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is not apoptotic. A comparative study of ALS and chronic aluminium chloride neurotoxicity in New Zealand white rabbits.** Neuropathol Appl Neurobiol, v.26, n.2, Apr, p.150-60. 2000.

Hobbs, A. J., A. Higgs e S. Moncada. **Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target.** Annu Rev Pharmacol Toxicol, v.39, p.191-220. 1999.

Hodgson, E. K. e I. Fridovich. **The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: chemiluminescence and peroxidation.** Biochemistry, v.14, n.24, Dec 2, p.5299-303. 1975a.

Hodgson, E. K. e I. Fridovich. **The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme.** Biochemistry, v.14, n.24, Dec 2, p.5294-9. 1975b.

Howland, D. S., J. Liu, Y. She, B. Goad, N. J. Maragakis, B. Kim, J. Erickson, J. Kulik, L. Devito, G. Psaltis, L. J. Degennaro, D. W. Cleveland e J. D. Rothstein. **Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS).** Proc Natl Acad Sci U S A, v.99, n.3, Feb 5, p.1604-9. 2002.

Hussain, S. P. e C. C. Harris. **Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes.** Cancer Res, v.58, n.18, Sep 15, p.4023-37. 1998.

Ihara, Y., K. Nobukuni, H. Takata e T. Hayabara. **Oxidative stress and metal content in blood and cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients with and without a Cu, Zn-superoxide dismutase mutation.** Neurol Res, v.27, n.1, Jan, p.105-8. 2005.

Ischiropoulos, H. e J. S. Beckman. **Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association?** J Clin Invest, v.111, n.2, Jan, p.163-9. 2003.

Jewett, S. L., H. K. Olmsted, J. A. Marach, F. Rojas e K. Silva. **Anion protection of CuZnSOD during peroxidative activity with H(2)O(2).** Biochem Biophys Res Commun, v.274, n.1, Jul 21, p.57-60. 2000.

Jewett, S. L., A. M. Rocklin, M. Ghanevati, J. M. Abel e J. A. Marach. **A new look at a time-worn system: oxidation of CuZn-SOD by H2O2.** Free Radic Biol Med, v.26, n.7-8, Apr, p.905-18. 1999.

Joffe, A., N. E. Geacintov e V. Shafirovich. **DNA lesions derived from the site selective oxidation of Guanine by carbonate radical anions.** Chem Res Toxicol, v.16, n.12, Dec, p.1528-38. 2003.

Julien, J. P. **Amyotrophic lateral sclerosis. unfolding the toxicity of the misfolded.** Cell, v.104, n.4, Feb 23, p.581-91. 2001.

Kang, J. H. e S. M. Kim. **DNA cleavage by hydroxyl radicals generated in the Cu,Zn-superoxide dismutase and hydrogen peroxide system.** Mol Cells, v.7, n.6, Dec 31, p.777-82. 1997.

Kim, R. H., S. M. Lee e J. W. Park. **Enhancement by copper, zinc superoxide dismutase of DNA damage and mutagenicity with hydrogen peroxide.** Biochem Mol Biol Int, v.45, n.3, Jul, p.635-42. 1998.

Kim, S. H., J. I. Engelhardt, J. S. Henkel, L. Siklos, J. Soos, C. Goodman e S. H. Appel. **Widespread increased expression of the DNA repair enzyme PARP in brain in ALS.** Neurology, v.62, n.2, Jan 27, p.319-22. 2004.

Kim, Y. M., J. M. Lim, B. C. Kim e S. Han. **Cu,Zn-superoxide dismutase is an intracellular catalyst for the H(2)O(2)-dependent oxidation of dichlorodihydrofluorescein.** Mol Cells, v.21, n.1, Feb 28, p.161-5. 2006.

Kisby, G. E., J. Milne e C. Sweatt. **Evidence of reduced DNA repair in amyotrophic lateral sclerosis brain tissue.** Neuroreport, v.8, n.6, Apr 14, p.1337-40. 1997.

Koppenol, W. H., J. J. Moreno, W. A. Pryor, H. Ischiropoulos e J. S. Beckman. **Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide.** Chem Res Toxicol, v.5, n.6, Nov-Dec, p.834-42. 1992.

Krantic, S., N. Mechawar, S. Reix e R. Quirion. **Molecular basis of programmed cell death involved in neurodegeneration.** Trends Neurosci, v.28, n.12, Dec, p.670-6. 2005.

Kurtzke, J. F. **Risk factors in amyotrophic lateral sclerosis.** Adv Neurol, v.56, p.245-70. 1991.

Lange, D. J., P. L. Murphy, B. Diamond, V. Appel, E. C. Lai, D. S. Younger e S. H. Appel. **Selegiline is ineffective in a collaborative double-blind, placebo-controlled trial for treatment of amyotrophic lateral sclerosis.** Arch Neurol, v.55, n.1, Jan, p.93-6. 1998.

Le Page, F., A. Margot, A. P. Grollman, A. Sarasin e A. Gentil. **Mutagenicity of a unique 8-oxoguanine in a human Ha-ras sequence in mammalian cells.** Carcinogenesis, v.16, n.11, Nov, p.2779-84. 1995.

Lee, M., D. Hyun, P. Jenner e B. Halliwell. **Effect of overexpression of wild-type and mutant Cu/Zn-superoxide dismutases on oxidative damage and antioxidant defences: relevance to Down's syndrome and familial amyotrophic lateral sclerosis.** J Neurochem, v.76, n.4, Feb, p.957-65. 2001.

Levenson, C. W. **Trace metal regulation of neuronal apoptosis: from genes to behavior.** Physiol Behav, v.86, n.3, Oct 15, p.399-406. 2005.

Levine, A. J. **p53, the cellular gatekeeper for growth and division.** Cell, v.88, n.3, Feb 7, p.323-31. 1997.

Levine, R. L., I. Y. Yang, M. Hossain, G. A. Pandya, A. P. Grollman e M. Moriya. **Mutagenesis induced by a single 1,N6-ethenodeoxyadenosine adduct in human cells.** Cancer Res, v.60, n.15, Aug 1, p.4098-104. 2000.

Liochev, S. I. e I. Fridovich. **Reversal of the superoxide dismutase reaction revisited.** Free Radic Biol Med, v.34, n.7, Apr 1, p.908-10. 2003.

Liochev, S. I. e I. Fridovich. **Bicarbonate-enhanced peroxidase activity of Cu,Zn SOD: is the distal oxidant bound or diffusible?** Arch Biochem Biophys, v.421, n.2, Jan 15, p.255-9. 2004.

Lipton, S. A. e P. A. Rosenberg. **Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders.** N Engl J Med, v.330, n.9, Mar 3, p.613-22. 1994.

Liu, D., J. Wen, J. Liu e L. Li. **The roles of free radicals in amyotrophic lateral sclerosis: reactive oxygen species and elevated oxidation of protein, DNA, and membrane phospholipids.** Faseb J, v.13, n.15, Dec, p.2318-28. 1999.

Liu, J., C. Lillo, P. A. Jonsson, C. Vande Velde, C. M. Ward, T. M. Miller, J. R. Subramaniam, J. D. Rothstein, S. Marklund, P. M. Andersen, T. Brannstrom, O. Gredal, P. C. Wong, D. S. Williams e D. W. Cleveland. **Toxicity of familial ALS-linked SOD1 mutants from selective recruitment to spinal mitochondria.** Neuron, v.43, n.1, Jul 8, p.5-17. 2004.

Loureiro, A. P. M., P. Di Mascio, O. F. Gomes e M. H. G. Medeiros. **trans,trans-2,4-decadienal-induced 1,N(2)-etheno-2'-deoxyguanosine adduct formation.** Chem Res Toxicol, v.13, n.7, Jul, p.601-9. 2000.

Loureiro, A. P., S. A. Marques, C. C. M. Garcia, P. Di Mascio e M. H. G. Medeiros. **Development of an on-line liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry assay to quantitatively determine 1,N(2)-etheno-2'-deoxyguanosine in DNA.** Chem Res Toxicol, v.15, n.10, Oct, p.1302-8. 2002.

Louwerse, E. S., G. J. Weverling, P. M. Bossuyt, F. E. Meyjes e J. M. De Jong. **Randomized, double-blind, controlled trial of acetylcysteine in amyotrophic lateral sclerosis.** Arch Neurol, v.52, n.6, Jun, p.559-64. 1995.

Lovell, M. A., C. Xie, S. P. Gabbita e W. R. Markesbery. **Decreased thioredoxin and increased thioredoxin reductase levels in Alzheimer's disease brain.** Free Radic Biol Med, v.28, n.3, Feb 1, p.418-27. 2000.

Lovell, M. A., C. Xie e W. R. Markesbery. **Decreased base excision repair and increased helicase activity in Alzheimer's disease brain.** Brain Res, v.855, n.1, Feb 7, p.116-23. 2000.

Malaspina, A., N. Kaushik e J. De Belleruche. **Differential expression of 14 genes in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord detected using gridded cDNA arrays.** J Neurochem, v.77, n.1, Apr, p.132-45. 2001.

Malyapa, R. S., C. Bi, E. W. Ahern e J. L. Roti Roti. **Detection of DNA damage by the alkaline comet assay after exposure to low-dose gamma radiation.** Radiat Res, v.149, n.4, Apr, p.396-400. 1998.

Marchenko, N. D., A. Zaika e U. M. Moll. **Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling.** J Biol Chem, v.275, n.21, May 26, p.16202-12. 2000.

Marnett, L. J. **Oxyl radicals and DNA damage.** Carcinogenesis, v.21, n.3, Mar, p.361-70. 2000.

Martin, L. J. **Neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis is apoptosis: possible contribution of a programmed cell death mechanism.** J Neuropathol Exp Neurol, v.58, n.5, May, p.459-71. 1999.

Martin, L. J. **p53 is abnormally elevated and active in the CNS of patients with amyotrophic lateral sclerosis.** Neurobiol Dis, v.7, n.6 Pt B, Dec, p.613-22. 2000.

Martin, L. J., K. Chen e Z. Liu. **Adult motor neuron apoptosis is mediated by nitric oxide and Fas death receptor linked by DNA damage and p53 activation.** J Neurosci, v.25, n.27, Jul 6, p.6449-59. 2005.

Martin, L. J., Z. Liu, K. Chen, A. C. Price, Y. Pan, J. A. Swaby e W. C. Golden. **Motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mutant superoxide dismutase-1 transgenic mice: mechanisms of mitochondriopathy and cell death.** J Comp Neurol, v.500, n.1, Jan 1, p.20-46. 2007.

Martinez, G. R., A. P. M. Loureiro, S. A. Marques, S. Miyamoto, L. F. Yamaguchi, J. Onuki, E. A. Almeida, C. C. M. Garcia, L. F. Barbosa, M. H. G. Medeiros e P. Di Mascio. **Oxidative and alkylating damage in DNA.** Mutat Res, v.544, n.2-3, Nov, p.115-27. 2003.

Martinez, G. R., M. H. G. Medeiros, J. L. Ravanat, J. Cadet e P. Di Mascio. **[18O]-labeled singlet oxygen as a tool for mechanistic studies of 8-oxo-7,8-dihydroguanine oxidative damage: detection of spiroiminodihydantoin, imidazolone and oxazolone derivatives.** Biol Chem, v.383, n.3-4, Mar-Apr, p.607-17. 2002.

May, J. M., L. Li, K. Hayslett e Z. C. Qu. **Ascorbate transport and recycling by SH-SY5Y neuroblastoma cells: response to glutamate toxicity.** Neurochem Res, v.31, n.6, Jun, p.785-94. 2006.

Mccord, J. M. e I. Fridovich. **Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein).** J Biol Chem, v.244, n.22, Nov 25, p.6049-55. 1969.

Medinas, D. B., G. Cerchiaro, D. F. Trindade e O. Augusto. **The carbonate radical and related oxidants derived from bicarbonate buffer.** IUBMB Life, v.59, n.4-5, Apr-May, p.255-62. 2007.

Mello Filho, A. C. e R. Meneghini. **In vivo formation of single-strand breaks in DNA by hydrogen peroxide is mediated by the Haber-Weiss reaction.** Biochim Biophys Acta, v.781, n.1-2, Feb 24, p.56-63. 1984.

Moor, E., E. Shohami, E. Kanevsky, N. Grigoriadis, C. Symeonidou e R. Kohen. **Impairment of the ability of the injured aged brain in elevating urate and ascorbate.** Exp Gerontol, v.41, n.3, Mar, p.303-11. 2006.

Mroczkowska, M. M. e J. T. Kusmierk. **Miscoding potential of N2,3-ethenoguanine studied in an Escherichia coli DNA-dependent RNA polymerase in vitro system and possible role of this adduct in vinyl chloride-induced mutagenesis.** Mutagenesis, v.6, n.5, Sep, p.385-90. 1991.

Nagano, S., Y. Fujii, T. Yamamoto, M. Taniyama, K. Fukada, T. Yanagihara e S. Sakoda. **The efficacy of trientine or ascorbate alone compared to that of the combined treatment with these two agents in familial amyotrophic lateral sclerosis model mice.** Exp Neurol, v.179, n.2, Feb, p.176-80. 2003.

Nair, J. **Lipid peroxidation-induced etheno-DNA adducts in humans.** IARC Sci Publ, n.150, p.55-61. 1999.

Nair, J., P. L. Carmichael, R. C. Fernando, D. H. Phillips, A. J. Strain e H. Bartsch. **Lipid peroxidation-induced etheno-DNA adducts in the liver of patients with the genetic metal**



**storage disorders Wilson's disease and primary hemochromatosis.** Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, v.7, n.5, May, p.435-40. 1998.

Nair, J., S. De Flora, A. Izzotti e H. Bartsch. **Lipid peroxidation-derived etheno-DNA adducts in human atherosclerotic lesions.** Mutat Res, v.621, n.1-2, Aug 1, p.95-105. 2007.

Nair, J., F. Gansauge, H. Beger, P. Dolara, G. Winde e H. Bartsch. **Increased etheno-DNA adducts in affected tissues of patients suffering from Crohn's disease, ulcerative colitis, and chronic pancreatitis.** Antioxid Redox Signal, v.8, n.5-6, May-Jun, p.1003-10. 2006.

Nair, J., O. Sinitsina, E. A. Vasunina, G. A. Nevinsky, J. Laval e H. Bartsch. **Age-dependent increase of etheno-DNA-adducts in liver and brain of ROS overproducing OXYS rats.** Biochem Biophys Res Commun, v.336, n.2, Oct 21, p.478-82. 2005.

Nair, J., H. Sone, M. Nagao, A. Barbin e H. Bartsch. **Copper-dependent formation of miscoding etheno-DNA adducts in the liver of Long Evans cinnamon (LEC) rats developing hereditary hepatitis and hepatocellular carcinoma.** Cancer Res, v.56, n.6, Mar 15, p.1267-71. 1996.

Nair, U., H. Bartsch e J. Nair. **Lipid peroxidation-induced DNA damage in cancer-prone inflammatory diseases: a review of published adduct types and levels in humans.** Free Radic Biol Med, v.43, n.8, Oct 15, p.1109-20. 2007.

Nath, R. G., J. E. Ocando, J. P. Richie, Jr. e F. L. Chung. **Effect of glutathione depletion on exocyclic adduct levels in the liver DNA of F344 rats.** Chem Res Toxicol, v.10, n.11, Nov, p.1250-3. 1997.

Nishitoh, H., H. Kadowaki, A. Nagai, T. Maruyama, T. Yokota, H. Fukutomi, T. Noguchi, A. Matsuzawa, K. Takeda e H. Ichijo. **ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1.** Genes Dev, v.22, n.11, Jun 1, p.1451-64. 2008.

Pang, B., X. Zhou, H. Yu, M. Dong, K. Taghizadeh, J. S. Wishnok, S. R. Tannenbaum e P. C. Dedon. **Lipid peroxidation dominates the chemistry of DNA adduct formation in a mouse model of inflammation.** Carcinogenesis, v.28, n.8, Aug, p.1807-13. 2007.

Pasinelli, P. e R. H. Brown. **Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics.** Nat Rev Neurosci, v.7, n.9, Sep, p.710-23. 2006.

Podda, M., C. Weber, M. G. Traber e L. Packer. **Simultaneous determination of tissue tocopherols, tocotrienols, ubiquinol, and ubiquinone.** J Lipid Res, v.37, n.4, Apr, p.893-901. 1996.

Proskuryakov, S. Y., A. G. Konoplyannikov e V. L. Gabai. **Necrosis: a specific form of programmed cell death?** Exp Cell Res, v.283, n.1, Feb 1, p.1-16. 2003.

Pryor, W. A. **Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions.** Annu Rev Physiol, v.48, p.657-67. 1986.

Pryor, W. A. e J. W. Lightsey. **Mechanisms of Nitrogen Dioxide Reactions: Initiation of Lipid Peroxidation and the Production of Nitrous Acid.** Science, v.214, n.4519, Oct 23, p.435-437. 1981.

Ramirez, D. C., S. E. Gomez Mejiba e R. P. Mason. **Mechanism of hydrogen peroxide-induced Cu,Zn-superoxide dismutase-centered radical formation as explored by immuno-spin trapping: the role of copper- and carbonate radical anion-mediated oxidations.** Free Radic Biol Med, v.38, n.2, Jan 15, p.201-14. 2005.

Ramirez, D. C., S. E. Mejiba e R. P. Mason. **Copper-catalyzed protein oxidation and its modulation by carbon dioxide: enhancement of protein radicals in cells.** J Biol Chem, v.280, n.29, Jul 22, p.27402-11. 2005.

Reaume, A. G., J. L. Elliott, E. K. Hoffman, N. W. Kowall, R. J. Ferrante, D. F. Siwek, H. M. Wilcox, D. G. Flood, M. F. Beal, R. H. Brown, Jr., R. W. Scott e W. D. Snider. **Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury.** Nat Genet, v.13, n.1, May, p.43-7. 1996.

Regulus, P., B. Duroux, P. A. Bayle, A. Favier, J. Cadet e J. L. Ravanat. **Oxidation of the sugar moiety of DNA by ionizing radiation or bleomycin could induce the formation of a cluster DNA lesion.** Proc Natl Acad Sci U S A, v.104, n.35, Aug 28, p.14032-7. 2007.

Reichert, H. **Introduction to Neurobiology.** Schorndorf: Thiene. 1992

Rice, M. E. e I. Russo-Menna. **Differential compartmentalization of brain ascorbate and glutathione between neurons and glia.** Neuroscience, v.82, n.4, Feb, p.1213-23. 1998.

Rich, T., R. L. Allen e A. H. Wyllie. **Defying death after DNA damage.** Nature, v.407, n.6805, Oct 12, p.777-83. 2000.

Rigo, A., P. Viglino e G. Rotilio. **Kinetic study of O-2 DISMUTATION BY BOVINE SUPEROXIDE DISMUTASE. Evidence for saturation of the catalytic sites by O-2.** Biochem Biophys Res Commun, v.63, n.4, Apr 21, p.1013-8. 1975.

Roe, J. A., M. Wiedau-Pazos, V. N. Moy, J. J. Goto, E. B. Gralla e J. S. Valentine. **In vivo peroxidative activity of FALS-mutant human CuZnSODs expressed in yeast.** Free Radic Biol Med, v.32, n.2, Jan 15, p.169-74. 2002.

Rokita, S. E. e L. Romero-Fredes. **The ensemble reactions of hydroxyl radical exhibit no specificity for primary or secondary structure of DNA.** Nucleic Acids Res, v.20, n.12, Jun 25, p.3069-72. 1992.

Rosen, D. R., T. Siddique, D. Patterson, D. A. Figlewicz, P. Sapp, A. Hentati, D. Donaldson, J. Goto, J. P. O'regan, H. X. Deng e Et Al. **Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis.** Nature, v.362, n.6415, Mar 4, p.59-62. 1993.

Ross, C. A. e M. A. Poirier. **Protein aggregation and neurodegenerative disease.** Nat Med, v.10 Suppl, Jul, p.S10-7. 2004.

Rothstein, J. D., L. J. Martin e R. W. Kuncel. **Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis.** N Engl J Med, v.326, n.22, May 28, p.1464-8. 1992.

Rothstein, J. D., G. Tsai, R. W. Kuncel, L. Clawson, D. R. Cornblath, D. B. Drachman, A. Pestronk, B. L. Stauch e J. T. Coyle. **Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis.** Ann Neurol, v.28, n.1, Jul, p.18-25. 1990.

Rotilio, G., L. Calabrese, F. Bossa, D. Barra, A. F. Agro e B. Mondovi. **Properties of the apoprotein and role of copper and zinc in protein conformation and enzyme activity of bovine superoxide dismutase.** Biochemistry, v.11, n.11, May 23, p.2182-7. 1972.

Sagripanti, J. L., P. L. Goering e A. Lamanna. **Interaction of copper with DNA and antagonism by other metals.** Toxicol Appl Pharmacol, v.110, n.3, Sep 15, p.477-85. 1991.

Sankarapandi, S. e J. L. Zweier. **Bicarbonate is required for the peroxidase function of Cu, Zn-superoxide dismutase at physiological pH.** J Biol Chem, v.274, n.3, Jan 15, p.1226-32. 1999.

Saparbaev, M., S. Langouet, C. V. Privezentzev, F. P. Guengerich, H. Cai, R. H. Elder e J. Laval. **1,N(2)-ethenoguanine, a mutagenic DNA adduct, is a primary substrate of Escherichia coli mismatch-specific uracil-DNA glycosylase and human alkylpurine-DNA-N-glycosylase.** J Biol Chem, v.277, n.30, Jul 26, p.26987-93. 2002.

Sathasivam, S., P. G. Ince e P. J. Shaw. **Apoptosis in amyotrophic lateral sclerosis: a review of the evidence.** Neuropathol Appl Neurobiol, v.27, n.4, Aug, p.257-74. 2001.

Sathasivam, S. e P. J. Shaw. **Apoptosis in amyotrophic lateral sclerosis--what is the evidence?** Lancet Neurol, v.4, n.8, Aug, p.500-9. 2005.

Sau, D., S. De Biasi, L. Vitellaro-Zuccarello, P. Riso, S. Guarnieri, M. Porrini, S. Simeoni, V. Crippa, E. Onesto, I. Palazzolo, P. Rusmini, E. Bolzoni, C. Bendotti e A. Poletti. **Mutation of SOD1 in ALS: a gain of a loss of function.** Hum Mol Genet, v.16, n.13, Jul 1, p.1604-18. 2007.

Sayre, L. M., G. Perry e M. A. Smith. **Oxidative stress and neurotoxicity.** Chem Res Toxicol, v.21, n.1, Jan, p.172-88. 2008.

Sayre, L. M., M. A. Smith e G. Perry. **Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease.** Curr Med Chem, v.8, n.7, Jun, p.721-38. 2001.

Schoser, B. G., S. Wehling e D. Blottner. **Cell death and apoptosis-related proteins in muscle biopsies of sporadic amyotrophic lateral sclerosis and polyneuropathy.** Muscle Nerve, v.24, n.8, Aug, p.1083-9. 2001.

Sekiguchi, M. e T. Tsuzuki. **Oxidative nucleotide damage: consequences and prevention.** Oncogene, v.21, n.58, Dec 16, p.8895-904. 2002.

Sen, C. K., H. Sies e P. A. Baeuerle. **Antioxidant and redox regulation of genes.** San Diego: Academic Press. 2000

Shafirovich, V., A. Dourandin, W. Huang e N. E. Geacintov. **The carbonate radical is a site-selective oxidizing agent of guanine in double-stranded oligonucleotides.** J Biol Chem, v.276, n.27, Jul 6, p.24621-6. 2001.

Shaikh, A. Y. e L. J. Martin. **DNA base-excision repair enzyme apurinic/aprimidinic endonuclease/redox factor-1 is increased and competent in the brain and spinal cord of individuals with amyotrophic lateral sclerosis.** Neuromolecular Med, v.2, n.1, p.47-60. 2002.

Shaw, I. C., P. S. Fitzmaurice, J. D. Mitchell e P. G. Lynch. **Studies on cellular free radical protection mechanisms in the anterior horn from patients with amyotrophic lateral sclerosis.** Neurodegeneration, v.4, n.4, Dec, p.391-6. 1995.

Shibutani, S., M. Takeshita e A. P. Grollman. **Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG.** Nature, v.349, n.6308, Jan 31, p.431-4. 1991.

Sies, H. **Oxidative Stress II. Oxidants and Antioxidants.** London: Academic Press. 1991

Silani, V., L. Cova, M. Corbo, A. Ciammola e E. Polli. **Stem-cell therapy for amyotrophic lateral sclerosis.** Lancet, v.364, n.9429, Jul 10-16, p.200-2. 2004.

Singer, B. e J. M. Essigmann. **Site-specific mutagenesis: retrospective and prospective.** Carcinogenesis, v.12, n.6, Jun, p.949-55. 1991.

Siushansian, R. e J. X. Wilson. **Ascorbate transport and intracellular concentration in cerebral astrocytes.** J Neurochem, v.65, n.1, Jul, p.41-9. 1995.

Slot, J. W., H. J. Geuze, B. A. Freeman e J. D. Crapo. **Intracellular localization of the copper-zinc and manganese superoxide dismutases in rat liver parenchymal cells.** Lab Invest, v.55, n.3, Sep, p.363-71. 1986.

Spector, R., A. Z. Spector e S. R. Snodgrass. **Model for transport in the central nervous system.** Am J Physiol, v.232, n.3, Mar, p.R73-9. 1977.

Stadtman, E. R. **Protein oxidation in aging and age-related diseases.** Ann N Y Acad Sci, v.928, Apr, p.22-38. 2001.

Stadtman, E. R., B. S. Berlett e P. B. Chock. **Manganese-dependent disproportionation of hydrogen peroxide in bicarbonate buffer.** Proc Natl Acad Sci U S A, v.87, n.1, Jan, p.384-8. 1990.

Steenken, S. e S. V. Jovanovic. **How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution.** Journal of the American Chemical Society, v.119, n.3, Jan 22, p.617-618. 1997.

Stewart, Z. A. e J. A. Pietenpol. **p53 Signaling and cell cycle checkpoints.** Chem Res Toxicol, v.14, n.3, Mar, p.243-63. 2001.

- Stokes, A. H., T. G. Hastings e K. E. Vrana. **Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine.** J Neurosci Res, v.55, n.6, Mar 15, p.659-65. 1999.
- Strasser, A., L. O'connor e V. M. Dixit. **Apoptosis signaling.** Annu Rev Biochem, v.69, p.217-45. 2000.
- Tabner, B. J., O. M. El-Agnaf, M. J. German, N. J. Fullwood e D. Allsop. **Protein aggregation, metals and oxidative stress in neurodegenerative diseases.** Biochem Soc Trans, v.33, n.Pt 5, Nov, p.1082-6. 2005.
- Tainer, J. A., E. D. Getzoff, K. M. Beem, J. S. Richardson e D. C. Richardson. **Determination and analysis of the 2 A-structure of copper, zinc superoxide dismutase.** J Mol Biol, v.160, n.2, Sep 15, p.181-217. 1982.
- Tatum, V., C. Changchit e C. Chow. **Measurement of malondialdehyde by high performance liquid chromatography with fluorescence detection.** Lipids, v.25, n.4, p.226-229. 1990.
- Tayarani, I., J. Chaudiere, J. M. Lefauconnier e J. M. Bourre. **Enzymatic protection against peroxidative damage in isolated brain capillaries.** J Neurochem, v.48, n.5, May, p.1399-402. 1987.
- Uchida, K. e S. Kawakishi. **Identification of oxidized histidine generated at the active site of Cu,Zn-superoxide dismutase exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Selective generation of 2-oxo-histidine at the histidine 118.** J Biol Chem, v.269, n.4, Jan 28, p.2405-10. 1994.
- Vaca, C. E., J. Wilhelm e M. Harms-Ringdahl. **Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review.** Mutat Res, v.195, n.2, Mar, p.137-49. 1988.
- Valentine, J. S., P. A. Doucette e S. Zittin Potter. **Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis.** Annu Rev Biochem, v.74, p.563-93. 2005.
- Wang, D., D. A. Kreuzer e J. M. Essigmann. **Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions.** Mutat Res, v.400, n.1-2, May 25, p.99-115. 1998.
- West, J. D. e L. J. Marnett. **Endogenous reactive intermediates as modulators of cell signaling and cell death.** Chem Res Toxicol, v.19, n.2, Feb, p.173-94. 2006.
- Wiedau-Pazos, M., J. J. Goto, S. Rabizadeh, E. B. Gralla, J. A. Roe, M. K. Lee, J. S. Valentine e D. E. Bredesen. **Altered reactivity of superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis.** Science, v.271, n.5248, Jan 26, p.515-8. 1996.
- Winter, C. K., H. J. Segall e W. F. Haddon. **Formation of cyclic adducts of deoxyguanosine with the aldehydes trans-4-hydroxy-2-hexenal and trans-4-hydroxy-2-nonenal in vitro.** Cancer Res, v.46, n.11, Nov, p.5682-6. 1986.
- Wu, A. S., M. Kiaei, N. Aguirre, J. P. Crow, N. Y. Calingasan, S. E. Browne e M. F. Beal. **Iron porphyrin treatment extends survival in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis.** J Neurochem, v.85, n.1, Apr, p.142-50. 2003.

Yamagishi, S., Y. Koyama, T. Katayama, M. Taniguchi, J. Hitomi, M. Kato, M. Aoki, Y. Itoyama, S. Kato e M. Tohyama. **An in vitro model for Lewy body-like hyaline inclusion/astrocytic hyaline inclusion: induction by ER stress with an ALS-linked SOD1 mutation.** PLoS ONE, v.2, n.10, p.e1030. 2007.

Yamazaki, M., E. Esumi e I. Nakano. **Is motoneuronal cell death in amyotrophic lateral sclerosis apoptosis?** Neuropathology, v.25, n.4, Dec, p.381-7. 2005.

Yim, H. S., J. H. Kang, P. B. Chock, E. R. Stadtman e M. B. Yim. **A familial amyotrophic lateral sclerosis-associated A4V Cu, Zn-superoxide dismutase mutant has a lower Km for hydrogen peroxide. Correlation between clinical severity and the Km value.** J Biol Chem, v.272, n.14, Apr 4, p.8861-3. 1997.

Yim, M. B., J. H. Kang, H. S. Yim, H. S. Kwak, P. B. Chock e E. R. Stadtman. **A gain-of-function of an amyotrophic lateral sclerosis-associated Cu,Zn-superoxide dismutase mutant: An enhancement of free radical formation due to a decrease in Km for hydrogen peroxide.** Proc Natl Acad Sci U S A, v.93, n.12, Jun 11, p.5709-14. 1996.

Yim, M. B., H. S. Yim, P. B. Chock e E. R. Stadtman. **Enhanced free radical generation of FALS-associated Cu,Zn-SOD mutants.** Neurotox Res, v.1, n.2, Dec, p.91-7. 1999.

Yoon, S. J., Y. H. Koh, R. A. Floyd e J. W. Park. **Copper, zinc superoxide dismutase enhances DNA damage and mutagenicity induced by cysteine/iron.** Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, v.448, n.1, Mar 14, p.97-104. 2000.

Zecca, L., Youdim, M.B., Riederer, P., Connor, J.R. e Crichton, R.R. **Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders.** Nat Rev Neurosci, v.5, n.11, Nov, p.863-73. 2004.

Zhang, H., J. Joseph, C. Felix e B. Kalyanaraman. **Bicarbonate enhances the hydroxylation, nitration, and peroxidation reactions catalyzed by copper, zinc superoxide dismutase. Intermediacy of carbonate anion radical.** J Biol Chem, v.275, n.19, May 12, p.14038-45. 2000.

Zhang, H., J. Joseph, M. Gurney, D. Becker e B. Kalyanaraman. **Bicarbonate enhances peroxidase activity of Cu,Zn-superoxide dismutase. Role of carbonate anion radical and scavenging of carbonate anion radical by metalloporphyrin antioxidant enzyme mimetics.** J Biol Chem, v.277, n.2, Jan 11, p.1013-20. 2002.

## **LISTA DE ANEXOS**

1- Símula Curricular

## SÚMULA CURRICULAR

### DADOS PESSOAIS

Nome: Lívea Fujita Barbosa

Local e data de nascimento: Santo André, 22/05/1982.

### EDUCAÇÃO

Colégio Gradual, Santo André, 1985-1999.

Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000-2003.

Graduação (Bacharelado em Química com atribuições em Biotecnologia)

### OCUPAÇÃO

Bolsista de Doutorado, Fapesp, 02/2004 a 08/2008.

### PUBLICAÇÕES

#### Artigos Completos

**Barbosa LF**, Cerqueira F, Macedo A, Sogayar MC, Augusto O, Carri MT, Di Mascio P, Medeiros MHG. Increased SOD1 association with chromatin, DNA damage, p53 activation and apoptosis in a cellular model of SOD1-linked ALS. Fase final de preparação para submeter para *Journal of Neurochemistry*.

**Barbosa LF**, Medeiros MHG, Di Mascio P. DNA oxidation, strand-breaks and etheno-adducts formation promoted by Cu,Zn-Superoxide Dismutase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the presence and absence of bicarbonate. *Dalton Transactions (submetido)*.

Paixão TRLC, **Barbosa LF**, Carri MT, Medeiros MHG, Bertotti M. Continuous monitoring of ascorbate transport through neuroblastoma cells with a ruthenium oxide hexacyanoferrate modified microelectrode. *The Analyst*, no prelo, 2008.



Caldeira CC, Cerqueira F, **Barbosa LF**, Medeiros MHG, Kowaltowski AJ. Mild mitochondrial uncoupling in mice affects energy metabolism, redox balance and longevity. *Aging Cell*. **7**(4), 552-602, 2008.

de Almeida EA, Bainy ACD, Loureiro APDM, Martinez GR, Miyamoto S, Onuki J, **Barbosa LF**, Garcia CCM, Prado FM, Ronsein GE, Sigolo CA, Brochini CB, Martins AMG, de Medeiros MHG, Di Mascio P. Oxidative stress in Perna perna and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: Antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. *Comparative Biochemistry and Physiology a molecular & integrative physiology*, **146** (4), 588-600, 2007.

**Barbosa LF**, Medeiros MHG e Augusto O, Danos oxidativos e neurodegeneração: o que aprendemos com animais transgênicos e nocautes? *Quim. Nova*, **29** (6), 1352-1360, 2006.

Martinez GR, Loureiro APM, Marques SA, Miyamoto S, Yamaguchi LF, Onuki J, de Almeida EA, Garcia CCM, **Barbosa LF**, Medeiros MHG e Di Mascio P, Oxidative and alkylating damage in DNA. *Mutation Research* **544**, 115–127, 2003.

### **Resumos em Congressos**

Paixão TRLC, **Barbosa LF**, Medeiros MHG, Bertotti M. Use of a ruthenium oxide hexacyanoferrate modified microelectrode for monitoring the ascorbate transport through a cellular model of amyotrophic lateral sclerosis. Pittcon, Pittsburg, EUA, 2008.

Paixão TRLC, **Barbosa LF**, Medeiros MHG, Bertotti M. Continuous on-line monitoring of ascorbate transport through a cellular model of ALS. XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq e XI Congresso da Sociedade Pan-Americana de Bioquímica e Biologia Molecular (PABMB), em Águas de Lindóia, SP, de 17 a 20 de maio de 2008.

Caldeira CC, Cerqueira F, **Barbosa LF**, Medeiros MHG, Kowaltowski AJ. Low doses of 2,4-dinitrophenol increases life span in mice. Free Radicals in Montevideo 2007, V Meeting of SFRBM – South American Group, V International Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species, em Montevideo, Uruguai, de 2 a 6 de setembro de 2007.

Oliveira MCB, Ronsein GE, **Barbosa LF**, Medeiros MHG, Di Mascio P. Synthesis and characterization of the water-soluble  $^1\text{O}_2$  trap anthracene-9,10-divinylsulfonate. XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular e 10<sup>th</sup> The International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) Conference, em Salvador, BA, de 21 a 25 de maio de 2007.

**Barbosa LF**, Cerqueira F, Macedo A, Sogayar MC, Augusto O, Carri MT, Di Mascio P, Medeiros MHG. DNA damage, p53 activation and apoptosis in a cellular model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. Simpósio internacional “Mutant SOD1 and Familial ALS: from the molecule to man”, em Milão, Itália, de 13 a 16 de setembro de 2007.

**Barbosa LF**, Cerqueira F, Macedo A, Sogayar MC, Augusto O, Carri MT, Di Mascio P, Medeiros MHG. Association of mutant SOD to DNA may be related to increased DNA damage, p53 activation and apoptosis in a cellular model of Amyotrophic Lateral sclerosis. Free Radicals in Montevideo 2007, V Meeting of SFRBM – South American Group, V International Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species, em Montevideo, Uruguai, de 2 a 6 de setembro de 2007.

**Barbosa LF**, Cerqueira F, Macedo A, Sogayar MC, Augusto O, Carri MT, Di Mascio P, Medeiros MHG. DNA damage, p53 activation and apoptosis in a cellular model of Amyotrophic Lateral Sclerosis”. XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular e 10<sup>th</sup> The International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) Conference, em Salvador, BA, de 21 a 25 de maio de 2007.

**Barbosa LF**, Cerqueira F, Macedo A, Sogayar MC, Augusto O, Carri MT, Di Mascio P, Medeiros MHG. DNA damage, p53 activation and apoptosis in a cellular model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. 13<sup>th</sup> Biennial Congress of the International Society for Free Radical Research, em Davos, Suíça, de 15 a 19 de agosto de 2006.

**Barbosa LF**, Di Mascio P, Medeiros MHG. DNA damage promoted by the peroxidase activity of Cu,Zn-Superoxide Dismutase. XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, em Águas de Lindóia, SP, de 1 a 4 de julho de 2006.

**Barbosa LF**, Carri, MT, Di Mascio P, Medeiros MHG. DNA damage in human neuroblastoma cells expressing a mutant SOD typical of Familial Amyotrophic Lateral

Sclerosis. IV Meeting of the South American Group of the Society for Free Radical Biology and Medicine e na XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, em Águas de Lindóia, SP, de 29 de junho a 5 de julho de 2005.

**Barbosa LF**, Loureiro APM, Gomes OF, Di Mascio P, Medeiros MHG. Danos em DNA promovidos pela ação reversa da Cu,Zn-Superóxido Dismutase. XX Semana da Química no Instituto de Química da USP, em São Paulo, SP, de 22 a 26 de setembro de 2003.

**Barbosa LF**, Loureiro APM, Gomes OF, Di Mascio P, Medeiros MHG. Danos em DNA promovidos pela ação reversa da Cu,Zn-Superóxido Dismutase. 11º Simpósio Internacional de iniciação Científica da USP –SIICUSP, em Ribeirão Preto, SP, 4 de novembro de 2003.

**Barbosa LF**, Loureiro APM, Gomes OF, Di Mascio P, Medeiros MHG. Lesões em DNA induzidas pelo sistema mieloperoxidase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Cl<sup>-</sup>. XIX Semana da Química no Instituto de Química da USP, em São Paulo, SP, 11 de outubro de 2002.

**Barbosa LF**, Loureiro APM, Gomes OF, Di Mascio P, Medeiros MHG. Lesões em DNA induzidas pelo sistema mieloperoxidase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Cl<sup>-</sup>. VI Congresso do Departamento de Bioquímica da USP, em São Paulo, SP, 14 e 15 de abril de 2003.

**Barbosa LF**, Loureiro APM, Gomes OF, Di Mascio P, Medeiros MHG. Lesões em DNA induzidas pelo sistema mieloperoxidase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Cl<sup>-</sup>. XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBQ, Caxambu, MG, de 17 a 20 de maio de 2003.

## **PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS**

VI Simpósio Brasileiro de Doenças do Neurônio Motor / Esclerose Lateral Amiotrófica realizado nos dias 29 e 30 de junho de 2007, na Câmara Municipal de São Paulo.

International Symposium “Amyotrophic Lateral Sclerosis: beyond the motor neuron”, em Maldonado, Uruguai, de 30 de março a 2 de abril de 2005.

## PREMIAÇÕES

Travel award para apresentar trabalho no Simpósio internacional “Mutant SOD1 and Familial ALS: from the molecule to man”, em Milão, Itália, de 13 a 16 de setembro de 2007.

Travel award para apresentar trabalho no Free Radicals in Montevideo 2007, V Meeting of SFRBM – South American Group, V International Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species, em Montevideo, Uruguai, de 2 a 6 de setembro de 2007.

Prêmio SBBq Award pelo melhor pôster apresentado durante a XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular e 10<sup>th</sup> The International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) Conference, em Salvador, BA, no período de 21 a 25 de maio de 2007.

Prêmio Young Investigator Award do IV Meeting of the South American Group of the Society for Free Radical Biology and Medicine, em Águas de Lindóia, SP, no período de 29 a 2 de junho de 2005.

Diploma de Melhor Aluno do Curso de Bacharelado em Química com atribuições em Biotecnologia do Instituto de Química da USP no período de 2000 a 2003.

Trabalho de Iniciação Científica selecionado pela Pró-Reitoria de Pesquisa para representar a USP no Prêmio de Iniciação Científica do CNPq na Área de Ciências da Vida.

Prêmio “Prof. Dr. Roberto Vicente Santelli” durante o III Simpósio de Iniciação Científica da XX Semana da Química no Instituto de Química da USP (09/2003).

Prêmio por Melhor trabalho avançado e completo no Concurso de Painéis de Iniciação Científica da XIX Semana da Química no Instituto de Química da USP (10/2002).

## **EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL**

Professora no II Curso de Inverno “Temas Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular” realizado pelo Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP, de 16 a 27 de julho de 2007, com duração de 80 horas.

Professora no I Curso de Inverno “Temas Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular” realizado pelo Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP, de 10 a 21 de julho de 2006, com duração de 82 horas.

Professora assistente da disciplina de Química de biomoléculas para o curso de Nutrição da USP, de fevereiro a junho de 2006.

## **CURSOS**

Free Radical School: realizado durante o Free Radicals in Montevideo 2007, V Meeting of SFRBM – South American Group, V International Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species, em Montevideo, Uruguai, de 2 a 6 de setembro de 2007.

Biomarcadores de processos oxidativos: realizado durante a XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, em Salvador, BA, de 21 a 25 de maio de 2007.

Sunrise Free Radical School: realizado no IV Meeting of the South American Group of the Society for Free Radical Biology and Medicine, em Águas de Lindóia, SP, de 29 de junho a 2 de julho de 2005.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)