

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)**

**PATRICIA POSTILIONE APPOLINÁRIO**

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

**Versão corrigida da Tese defendida**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:  
**26/02/2013**

PATRICIA POSTILIONE APPOLINÁRIO

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

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

*Orientadora: Profa. Dra. Sayuri Miyamoto*

São Paulo  
2013



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

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

## AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

*Charles Darwin*



## RESUMO

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

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

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

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

## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

