

Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Centro de Ciências da Matemática e da Natureza – CCMN

Instituto de Química – IQ

Departamento de Bioquímica

**Formação dos Heterodímeros *Wild Type* e Mutantes: Correlação Entre a
Atividade hSod1 Mutante, Agregação e a Toxicidade Mediada por
Espécies Reativas de Oxigênio**

Mariana Dias Castela de Carvalho

Rio de Janeiro

2019

Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Centro de Ciências da Matemática e da Natureza – CCMN

Instituto de Química – IQ

Departamento de Bioquímica

Formação dos Heterodímeros *Wild Type* e Mutantes: Correlação Entre a Atividade hSod1 Mutante, Agregação e a Toxicidade Mediada por EROs

Mariana Dias Castela de Carvalho

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências – Bioquímica.

Orientador: Marcos Dias Pereira

Coorientadora: Elis Cristina Araújo Eleutherio

Rio de Janeiro

Março/2019

Formação dos Heterodímeros *Wild Type* e Mutantes: Correlação Entre a
Atividade hSod1 Mutante, Agregação e a Toxicidade Mediada por Espécies
Reativas de Oxigênio

Mariana Dias Castela de Carvalho

Orientador: Marcos Dias Pereira
Coorientadora: Elis Cristina Araújo Eleutherio

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências – Bioquímica.

Aprovada por:

Presidente, Dr. Marcos Dias Pereira
Instituto de Química – UFRJ

Prof. Dra. Joelma Freire de Mesquita
Instituto Biomédico - UNIRIO

Prof. Dra. Luciana Ferreira Romão
Instituto de Ciências Biomédicas – UFRJ

Prof. Dr. Claudio Akio Masuda
Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ

Prof. Dr. Anderson de Sá Pinheiro
Instituto de Química – UFRJ

Rio de Janeiro
Março/2019

Aos meus pais, Lucia e Sérgio.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, a Deus, por todas as graças que derrama na minha vida todos os dias.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Marcos Dias Pereira e Prof. Dra. Elis Cristina Araujo Eleutherio, por todas as oportunidades e ensinamentos.

Ao meu orientador na Universidade de Göttingen, na Alemanha, Prof. Dr. Tiago Fleming Outeiro, por ter me recebido em seu laboratório e me dado a oportunidade de vivenciar a experiência do Doutorado Sanduíche.

Às agências de fomento CAPES e FAPERJ, pelo incentivo financeiro.

Aos meus pais, Lucia e Sérgio, por todas as oportunidades que me proporcionaram a vida toda, que permitiram que eu chegasse até aqui, e que eu farei com que me levem ainda mais longe. Meu objetivo é fazer sempre o meu melhor, de forma a orgulhar vocês e meus irmãos, Claudia e Sérgio Jr.

Aos amigos do Laboratório de Investigação de Fatores de Estresse e do Laboratório de Citotoxicidade e Genotoxicidade, por terem vivido de forma igual comigo tanto os melhores quanto os piores momentos de passar por um Doutorado. Agradeço especialmente à Germana, por ter sido a melhor companhia de baia que alguém poderia ter, sendo sempre ombro amigo ou ainda exortação, se necessário fosse.

À pós-doutoranda Aline, por toda a ajuda.

A todos que estiveram ao meu lado em mais essa etapa da minha caminhada, do departamento de Bioquímica do IQ, do Laboratório de Neurodegeneração Experimental, da Igreja Santo Afonso, dentro ou fora do Brasil, ao vivo ou por WhatsApp.

Parafraseando Isaac Newton, “se enxerguei mais longe foi porque me apoiei no ombro de gigantes”.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.”

Carl Jung

Formação dos Heterodímeros *Wild Type* e Mutantes: Correlação Entre a Atividade hSod1 Mutante, Agregação e a Toxicidade Mediada por Espécies Reativas de Oxigênio

Mariana Dias Castela de Carvalho

Orientador: Marcos Dias Pereira

Coorientadora: Elis Cristina Araújo Eleutherio

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências – Bioquímica.

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é um distúrbio associado à idade, causado pela degeneração de neurônios motores. Mais de 100 mutações na isoforma Cu, Zn-superóxido dismutase (Sod1) já foram relatadas na forma familiar (ELAf) e esporádica da ELA (ELAs). Neste estudo, foi utilizada a abordagem de microscopia de células vivas para analisar os efeitos de combinações heterodiméricas de proteínas Sod1 WT e mutantes (A4V, L38V, G93A e G93C) em células humanas. Curiosamente, foi descoberto que, embora tanto a proteína WT quanto o mutante Sod1 possam formar dímeros, a Sod1 WT não forma agregados. Em contraste, a co-expressão dos heterodímeros (mutantes de Sod1 associados a forma WT) em ELAf resultou na formação de um maior número de inclusões por célula do que o observado em homodímeros (células que co-expressam WT ou mutante Sod1). O número de inclusões (acúmulo de substâncias, como no caso, de proteínas, em um aglomerado dentro das células) foi maior em células expressando a mutante A4V, que também foram vistas como as inclusões mais estáveis. Para eliminar a contribuição da Sod1 endógena e avaliar melhor o efeito da expressão da Sod1 mutante associada à ELA, foi realizada uma construção em que a Sod1 WT humana e mutantes são expressas em células de levedura deletadas em *SOD1* (*sod1Δ*). Utilizando o modelo de levedura, submetido ao envelhecimento cronológico, pode ser concluído que apenas os heterodímeros humanos apresentaram diminuição da

atividade antioxidante, aumento do dano oxidativo e longevidade reduzida. Foi observado que o estresse oxidativo induziu a agregação de Sod1 mutante associado à ELA, e que os heterodímeros de Sod1 formaram mais inclusões do que os homodímeros.

Palavras-chave: Sod1, heterodímeros, ELA, envelhecimento

Heterodimer Formation of Wild Type And fALS Mutations: Correlation Between Mutant hSod1 Activity, Aggregation and ROS Mediated Toxicity

Mariana Dias Castela de Carvalho

Marcos Dias Pereira

Elis Cristina Araújo Eleutherio

Abstract da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências – Bioquímica.

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is an age-associated disorder developed by degeneration of motor neurons. More than 100 mutations in the isoforms of Cu, Zn-superoxide dismutase (Sod1) have been reported in the familial (fALS) and sporadic forms of ALS (sALS). In this study, a live cell microscopy approach was used to analyze the effects of heterodimeric combinations of Sod1 WT and mutant proteins (A4V, L38V, G93A and G93C) on human cells. Interestingly, it was discovered that although Sod1 WT protein or mutant Sod1 are able to form dimers, only WT Sod1 does not form aggregates. In contrast, expression of heterodimers (coexpression of WT and Sod1 mutants) in ELAf shows a higher number of inclusions per cell than that observed in homodimers (WT or Sod1 mutant expressing cells). The number of inclusions (accumulation of proteins in a cluster within the cells) was higher in cells expressing A4V mutant, which were also seen as the most stable inclusions. To eliminate the influence of endogenous WT Sod1 protein, the effect of Sod1 expression was evaluated in yeast cells deleted in *SOD1* (*sod1Δ*). Using yeast model under chronological aging, it was observed that only the expression of human heterodimers was responsible for the reduction of antioxidant activity, increase in oxidative damage and reduced longevity. It was also observed that oxidative stress induced aggregation of mutant Sod1 associated with fALS, and that the Sod1 heterodimers formed more inclusions than the homodimers. In addition, it has also been observed that the expression of Sod1 mutants reduced nuclear localization of Sod1 and,

consequently, impaired antioxidant response, suggesting that such a change in location may render the cell more susceptible to oxidative stress, contributing to the pathology of ELAf. Overall, this study provides a new insight into the fundamentals of ELAf and may open new avenues for planning future therapeutic strategies.

Keywords: Sod1, heterodimers, fALS, aging

Lista de Abreviações:

ATP: Trifosfato de Adenosina

BiFC: Complementação Bimolecular de Fluorescência (Bimolecular Fluorescence Complementation)

CAT: Catalase

CCS: Chaperona de Cobre para a Superóxido Dismutase (Copper Chaperone for Superoxide Dismutase)

C-Terminal: Carboxi-terminal

Ctt1: forma citosólica da catalase

Cys: Cisteína

DA: Doença de Alzheimer

DAPI: 4'-6-diamino-2-fenilindol

DP: Doença de Parkinson

DH: Doença de Huntington

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DNP: 2,4-dinitrofenol

DNPH: 2,4-dinitrofenilhidrazina

DTT: Ditioneitol

ELA: Esclerose Lateral Amiotrófica

ELAf: Esclerose Lateral Amiotrófica forma familiar

ELAs: Esclerose Lateral Amiotrófica forma esporádica

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

EUA: Estados Unidos da América

FRAP: Fluoresce Recovery After Photobleaching

FUS: gene que codifica a proteína FUS (Fused in Sarcoma)

GEF: fator de troca de guanina (Guanine Exchange Factor)

GSH: Glutationa

his: Histidina

hSod1: Sod1 Humana

iPSC: célula-tronco pluripotente induzida (induced pluripotent stem cells)

kDa: Kilodalton

LB: Luria-Bertani

leu: leucina

MDA: Malondialdeído

met: Metionina

NBT: Nitroblue Tetrazólio

N-terminal: Amino-terminal

OD₆₀₀: Absorvância a 600 nanômetros (Optical Density)

OPTN: gene que codifica para a optineurina

Orf: Open Reading Frame

PAGE: eletroforese de gel de poliacrilamida (polyacrylamide gel electrophoresis)

pME2794: Vetor Utilizado com fator nutricional leu

pME2795: Vetor Utilizado com fator nutricional ura

PPI: interação proteína-proteína (Protein-Protein Interaction)

PSA: Persulfato de Amônio

Px: Peroxidase

Sod: Superóxido Dismutase

SD: Desvio Padrão (Standard Deviation)

SD 2%: Meio Sintético Mínimo com 2% Glicose (Synthetic Dextrose)

SDS: dodecil sulfato de sódio (sodium dodecyl sulfate)

Sod: Superóxido Dismutase

RNA: Ácido Ribonucleico

TARDBP: gene que codifica para a proteína TDP-43

TBK1: gene que codifica para a quinase 1 de ligação à TANK

TBA: ácido tiobarbitúrico

TBS: tampão de tris-(hidroximetil)-aminometano

TCA: ácido tricloroacético

TEMED: N, N, N', N'-Tetrametiletildiamina

UBQLN2: gene que codifica para a ubiquilina 2

ura: Uracila

VCN: gene que codifica para a proteína valosina

WT: Selvagem (Wild Type)

YPD: Yeast Extract Peptone Dextrose

ySod1: Sod1 de levedura

Índice de Figuras

Figura 1: Fontes de EROs e as respostas celulares. Os oxidantes são gerados como resultado do metabolismo intracelular fisiológico, assim como do sistema enzimático. O sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático é sofisticado, e inclui catalases (CAT), peroxidases (Px), superóxido dismutases (Sods) e glutathiona (GSH), dentre outros. Quando a produção das EROs excede a defesa antioxidante, ocorre o que chamamos de estresse oxidativo, levando à danos ao DNA, à oxidação de proteínas e à peroxidação lipídica. Adaptado de (FRANÇA; PANEK; ELEUTHERIO, 2007). 26

Figura 2: Reação de Inativação do Cluster [4Fe-4S]. Adaptada de (JOMOVA; VALKO, 2011). 27

Figura 3: Reação de Fenton. Adaptada de (JOMOVA; VALKO, 2011). 27

Figura 4: Mecanismo catalítico da Sod1. Adaptada de (VALENTINE; DOUCETTE; ZITTIN POTTER, 2005). 29

Figura 5: Mecanismo catalítico da Sod2. Adaptada de (SHENG et al., 2011). 29

Figura 6: Estrutura da Sod1. A estabilidade estrutural da Sod1 é mediada por resíduos de aminoácidos específicos ligados ao íon Zn^{2+} , marcados em azul (His46, His 48, His63, His120). A estrutura cristalográfica da enzima está representada na figura A, na forma de fita (monômero da direita) e de palito (monômero da esquerda). Destacado dentro do círculo vermelho, a ponte dissulfeto intramolecular entre Cys57 e Cys146. A distribuição dos resíduos que são mais propensos à oxidação está mostrada em rosa na figura inferior, representados em rosa (Lys3, Cys6, Lys9, Thr54, Cys57, His80, Cys111, Arg115, His120, Cys146). Como pode ser visto na figura, os mesmos resíduos propensos à oxidação se alinham à interface do dímero (representada em vermelho, resíduos Glu50 – Asp53, Ile114, Gly148 e Ile150 – Ala153) e à região de ligação com o metal, representado em laranja. Adaptado de (TRIST; HARE; DOUBLE, 2018). 32

Figura 7: Biossíntese da Sod1 wild type. Adaptado de (TRIST; HARE; DOUBLE, 2018). 33

Figura 8: Biossíntese da Sod1 mutante. Adaptado de (TRIST; HARE; DOUBLE, 2018). 34

Figura 9: Estrutura da Sod1 e a localização dos resíduos mutantes associados à ELA. Diferentes mutações relacionadas ao desenvolvimento da ELA. Destacadas dentro de um círculo vermelho as mutações estudadas neste trabalho. Na figura está representada também a estrutura de um homodímero de Sod1 mostrando os barris β em amarelo, o subloop dissulfeto em marrom, os sítios de ligação ao zinco em azul, o loop de chave grega em verde e o loop carregado em vermelho. Os íons cobre e zinco estão demonstrados por uma esfera dourada e uma azul, respectivamente; a ligação dissulfeto entre as subunidades (S-S) entre Cys57 e Cys146 também está indicada. Adaptado de (HAYWARD et al, 2002). 41

Figura 10: Modelo molecular para a combinação da proteína selvagem (WT) e mutante (MT) na agregação proteica da Sod1. Adaptado de (KIM et al., 2014). 42

Figura 11: Biologia celular conservada em levedura. Numerosas vias celulares, como a de apoptose, autofagia, de controle de qualidade de proteínas, o transporte intracelular, assim como a produção de EROs pela mitocôndria, o ciclo celular, a função lisossomal e peroxissomal e a biologia de lipídios são conservadas em humanos e levedura. Adaptada de (KHURANA; LINDQUIST, 2010). 45

Figura 12: Representação esquemática do sistema BiFC. Na célula H4, foram expressos dois plasmídeos: um com a sequência VN-hSod1 WT e outro com a sequência hSod1-VC Mutante, conforme o esquema apresentado, de forma que dentro do modelo celular havia a expressão de monômeros de Sod1 fusionados a um fragmento N-terminal (VN) e C-terminal (VC) da proteína Vênus. Após formação dos dímeros, os fragmentos interagem, reconstituindo a proteína fluorescente (Adaptado de BRASIL et al., 2017). 51

Figura 12: Mapa dos vetores empregados para clonagem de células H4 expressando hSod1WT ou mutante fusionadas ao fragmento VN ou VC da proteína Vênus. Plasmídeo com a sequência de Sod1 humana (hSod1) WT ou mutante e com a sequência do fragmento N (em **A**) ou C-terminal (em **B**) da proteína Vênus (Adaptado de MAGALHÃES, 2018). 53

Figura 13: Esquema representativo dos plasmídeos pME2794 e pME2795 com hSod1 com proteína Vênus. Os plasmídeos foram utilizados na clonagem da cepa *sod1Δ* para que expressassem a hSod1 WT ou mutante fusionadas aos fragmentos VN ou VC da proteína Vênus. Os plasmídeos continham a sequência promotora da Sod1 de levedura (*ySod1*), a Sod1 humana (*hSod1*), ampicilina como marcador de resistência (Amp) e LEU2 (pME2794) ou URA3 (pME2795) como marcador nutricional. 57

Figura 15: Figuras representativas das células expressando os heterodímeros hSod1 mutantes relacionados à ELAf. Células H4 expressando WT (VN-hSod1) e mutante (hSod1-VC) (A4V, L38V, G93A ou G93C) foram analisadas por microscopia de fluorescência. Os agregados de hSod1 estão apontados por setas brancas. Escala: 10 μM. 69

Figura 16: Quantificação do número de agregados por células. Ao menos 50 células transfectadas por condição foram contadas e classificadas em três grupos diferentes. A barra azul representa a porcentagem de células sem inclusões; a barra roxa, a porcentagem de células com 5 inclusões ou menos; a barra amarela, porcentagem de células com mais de cinco inclusões. Os dados foram combinados de pelo menos três experimentos independentes..... 70

Figura 17: Western Blot representativo da expressão da hSod1. Na figura da esquerda, imunoblot representativo confirmando a expressão de ambos os fragmentos VN-hSod1 e hSod1-VC. Na figura da direita, quantificação dos imunoblots. Os dados foram expressos como a média ± SD de pelo menos três replicatas. Para a análise estatística foi utilizada one-way ANOVA com correção de Bonferroni, com nível de significância de $p < 0,05$ representado por (*); (*) representa resultados estatisticamente diferentes entre a mutante hSod1 e WT hSod1..... 71

Figura 18: Ilustração esquemática de FRAP em uma inclusão de interesse.
..... 71

Figura 19: Imagens representativas de uma célula expressando uma inclusão. No painel, da esquerda para a direita, inclusão de heterodímeros antes do bleaching, imediatamente após o bleaching e no final da aquisição de imagens..... 72

Figura 20: Curvas de recuperação de fluorescência para os heterodímeros. Para cada mutação, ao menos seis inclusões em diferentes células foram

analisadas. Cada gráfico representa a média \pm SD para cada time point para todos os experimentos. 73

Figura 21: A expressão dos mutantes homo e heterodímeros afeta a expressão da hSod1 em células de levedura envelhecidas cronologicamente. Immunoblot representativo confirmando a expressão dos fragmentos VN-Sod1 e Sod1-VC em células de levedura, ambos antes e depois da condição de envelhecimento cronológico..... 74

Figura 22: A expressão dos mutantes homo e heterodímeros afeta a atividade da hSod1 em células de levedura envelhecidas cronologicamente. Atividade superóxido dismutásica foi avaliada em células *sod1* Δ expressando hSod1 em fase exponencial de crescimento, antes e depois do envelhecimento cronológico. Os valores representam a média \pm SD de pelo menos três experimentos independentes e representam a razão de atividade hSod1 entre células de levedura envelhecidas e não-envelhecidas. * representa resultados estatisticamente diferentes entre a mutante hSod1 e WT hSod1. As barras coloridas representam os homodímeros mutantes, e as barras hachuradas coloridas representam os heterodímeros mutantes..... 75

Figura 23: A expressão dos heterodímeros mutantes diminui a viabilidade celular após 24h de envelhecimento. Células de levedura sem Sod1 (*sod1* Δ) assim como expressando hSod1 (WT e mutante) foram coletadas em fase exponencial de crescimento e envelhecidas in água (condição não-proliferativa) a 37 °C por 24h. A viabilidade celular foi determinada por contagem de células plaqueadas em meio Dropout 2% e expressa como porcentagem de células viáveis. As barras hachuradas e não-hachuradas representam os heterodímeros e homodímeros mutantes, respectivamente. O resultado representa a média \pm SD de pelo menos três experimentos independentes. * representa resultados estatisticamente diferentes entre *sod1* Δ ou mutante hSod1 comparado à WT hSod1. ** representa resultados estatisticamente diferentes entre as células de levedura recombinante expressando hSod1 em comparação com a respectiva cepa não-recombinante, *sod1* Δ (WT ou mutante hSod1 vs. *Sod1* Δ). 76

Figura 24: A heterodimerização da hSod1 WT e mutante ELAf aumenta de forma significativa a peroxidação lipídica em células envelhecidas cronologicamente. A peroxidação lipídica foi determinada em células *sod1* Δ expressando WT ou os homo- e heterodímeros, antes e depois do envelhecimento. Os mutantes heterodímeros estão representados pelas barras hachuradas no lado direito do gráfico. A peroxidação lipídica está expressa em pMoles de MDA/mg de célula. Como controle, foram determinados os níveis de

MDA em células não-envelhecidas (barras de cor clara) de todas as cepas. O resultado após o envelhecimento está representado pelas barras de cor escura. * representa resultados estatisticamente diferentes entre homo- e heterodímeros não envelhecimentos com relação à cepa WT hSod1 não envelhecida (mutante hSod1 x WT hSod1), ou mutantes com hSod1 WT após o envelhecimento. ... 77

Figura 25: A heterodimerização da hSod1 WT e mutante ELAf aumenta de forma significativa os níveis de proteína carbonilada em células envelhecidas cronologicamente. Os níveis de proteína carbonilada foram determinados em células sod1 Δ expressando WT ou os homo- e heterodímeros, antes e depois do envelhecimento. Os mutantes heterodímeros estão representados pelas barras hachuradas no lado direito do gráfico. O aumento nos níveis de proteína carbonilada foram medidos pela razão entre o conteúdo de carbonilas proteicas detectadas em células envelhecidas com relação aos níveis apresentados nas células não-envelhecidas. O resultado representa a média \pm SD de pelo menos três resultados independentes. * representa resultados estatisticamente diferentes entre os mutantes homo- ou heterodímeros com relação à WT hSod1 (mutante hSod1 vs. WT hSod1)..... 78

Figura 26: O envelhecimento cronológico induz a formação de inclusões citoplasmáticas nos mutantes hSod1. Imagens representativas mostrando a localização dos mutantes hSod1 em células de levedura por microscopia de fluorescência, antes e depois do envelhecimento. As setas brancas indicam as inclusões de hSod1. Escala: 10 μ M. 79

Figura 27: O envelhecimento cronológico induz a formação de inclusões citoplasmáticas nos mutantes hSod1. Quantificação do número de inclusões por célula. Ao menos 50 células por condição foram contadas e organizadas nos três grupos descritos. A barra azul representa a porcentagem de células sem nenhuma inclusão; a barra roxa, com cinco inclusões ou menos; a barra amarela, células com mais de cinco inclusões. *** resultados estatisticamente diferentes com nível de significância $p < 0,001$ (WT vs. Mutantes). ** resultados estatisticamente diferentes entre WT vs. Mutantes com nível de significância de $p < 0,01$. Os dados foram combinados de pelo menos três experimentos independentes..... 80

Figura 28: A localização nuclear da Sod1 é prejudicada pela presença das mutações relacionadas à ELAf após o envelhecimento. Heterodímeros hSod1 WT e mutantes foram analisados por microscopia de fluorescência após o envelhecimento. As inclusões de Sod1 foram visualizadas pela expressão da Sod1 tagueada com BiFC (verde) e o núcleo está corado em azul (DAPI). As

setas indicam a colocalização da hSod1 com o núcleo, processo induzido pelo envelhecimento. Escala: 10 μ M. 82

Figura 29: A localização nuclear da Sod1 é prejudicada pela presença das mutações relacionadas à ELAf após o envelhecimento. Porcentagem de células com Sod1 localizada no núcleo. As barras de erro indicam \pm SD de triplicatas de pelo menos 50 células contadas por replicata. * resultados estatisticamente diferentes entre os heterodímeros mutantes comparados à WT hSod1. 83

Figura 30: Atividade catalase nos heterodímeros. A atividade catalase foi expressa em vezes de aumento com relação a atividade específica (U/mg de proteína) após o envelhecimento cronológico. Uma unidade (U) de atividade é definida como a quantidade de enzima que catalisa a conversão de 1 mmol de H₂O₂ em 1 minuto sob condições reacionais do experimento. Os resultados representam a média \pm SD de pelo menos três experimentos independentes. * representa resultados significativamente diferentes entre WT vs. mutantes com $p < 0,05$ 84

Índice de Tabelas

Tabela 1: Mutações em genes relacionados à ELA. Adaptado de (VAN DAMME; ROBBERECHT; VAN DEN BOSCH, 2017).....	37
Tabela 2: Modelos utilizados para o estudo de ELA. Vantagens e limitações de alguns modelos usados para o estudo de ELA. N/A: não aplicável. Adaptado de (VAN DAMME; ROBBERECHT; VAN DEN BOSCH, 2017).....	42
Tabela 3: Cepas de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas neste estudo.....	57
Tabela 4: Aminoácidos utilizados para a mistura Dropout.....	61

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	24
1.1 Estresse Oxidativo e Espécies Reativas de Oxigênio	24
1.2 Sistemas de Defesa Antioxidante	27
1.2.2 A família das enzimas superóxido dismutase (Sod)	28
1.3 A Isoforma Superóxido Dismutase 1	30
1.4 Envelhecimento e doenças neurodegenerativas.....	34
1.5 Esclerose Lateral Amiotrófica.....	36
1.6 Esclerose Lateral Amiotrófica familiar e a Sod1	39
1.7 Modelos de Estudo de Esclerose Lateral Amiotrófica	43
1.7.1 Linhagem de células de neuroglioma (H4)	43
1.7.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudo	44
2. JUSTIFICATIVA	50
3. OBJETIVOS.....	50
3.1 Geral	50
3.2 Específicos.....	50
4. MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1 Experimentos com Célula Animal	51
4.1.2 O Sistema BiFC	51
4.1.3 Meio de Cultivo e Transfecção	52
4.1.4 Localização e Formação de Aglomerados.....	53
4.1.5 Expressão de hSod1 por Western Blot.....	54
4.1.6 FRAP	56
4.2 EXPERIMENTOS COM <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	56
4.2.1 Cepas e Plasmídeos Utilizados	56
4.2.2 Procedimentos para a transformação de <i>Escherichia coli</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	58
4.2.3 Condições de Cultivo	61
4.2.4 Condição de Envelhecimento	62
4.2.5 Análise da Atividade Enzimática.....	62
4.2.6 Análise da Atividade Superóxido Dismutásica	63
4.2.7 Análise da Atividade Catalásica.....	64
4.2.8 Análise da Viabilidade	64

4.2.9	Peroxidação Lipídica	65
4.2.10	Proteína Carbonilada.....	65
4.2.11	Expressão da hSod1 por Western Blot.....	66
4.2.12	Detecção da formação de aglomerados de hSod1	67
4.3	Análise de Dados e Estatística.....	68
5.	RESULTADOS	68
5.1	Heterodímeros hSod1 relacionados à ELAf afetam o perfil das inclusões em células H4	68
5.2	A mutação a4v relacionada com ELAf afeta a dinâmica Intracelular de Interações hSod1	71
5.3	Heterodímeros Mutantes de hSod1 mostram atividade dismutásica Reduzida quando comparados aos Homodímeros em Células de Levedura Envelhecidas Cronologicamente.....	73
5.4	A expressão dos heterodímeros hSod1 Mutantes diminuem a viabilidade celular em levedura.....	75
5.5	Os Heterodímeros hSod1 mutantes Aumentam os danos induzidos por EROs77	
5.6	O Envelhecimento induz a formação de Inclusões de hSod1 em células de Levedura	79
5.7	Mutações hSod1 prejudicam a localização nuclear da Sod1 Em Resposta Ao Envelhecimento	81
6.	Discussão	84
7.	Conclusões	89
8.	Referências.....	89

1. INTRODUÇÃO

1.1 ESTRESSE OXIDATIVO E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

O oxigênio (O_2) é uma molécula oxidante utilizada por organismos aeróbicos como acceptor final de elétrons durante a última etapa da cadeia transportadora de elétrons. Apesar de ser essencial para a obtenção de energia durante a respiração celular, o O_2 pode ser parcialmente reduzido formando as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). As EROs envolvem uma variedade de espécies químicas, incluindo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), os radicais hidroxila (HO^\cdot) e ânions superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Algumas dessas espécies são extremamente instáveis, enquanto outras são extremamente difusíveis e com vida relativamente longa (FINKEL; HOLBROOK, 2000). As EROs podem ser geradas pelo metabolismo celular ou em resposta a estresses ambientais, como por exemplo exposição à radiação ultravioleta, ozônio e xenobióticos (RIBEIRO et al., 2015). Embora desempenhem papéis importantes em processos biológicos, como resposta imune, sinalização celular e expressão gênica, esses agentes oxidantes também podem ter efeitos prejudiciais aos componentes celulares (RIBEIRO et al., 2015).

A cadeia transportadora de elétrons desempenha um papel central na produção de energia em organismos aeróbicos e consome mais de 90% do oxigênio captado pelos mesmos. Em condições normais, cerca de 1% deste oxigênio é convertido em $O_2^{\cdot-}$, especialmente nos complexos I e III da cadeia respiratória. Esse nível de $O_2^{\cdot-}$ pode aumentar em condições patológicas (FINKEL; HOLBROOK, 2000). A maior parte do $O_2^{\cdot-}$ é reduzida à H_2O_2 pela enzima superóxido dismutase (Sod). A fração remanescente pode ser combinada a outros radicais, como o NO^\cdot , formando peroxinitrito ($ONOO^\cdot$), um potente oxidante biológico; o $O_2^{\cdot-}$ pode ainda inativar enzimas contendo *clusters* de Fe-S (BROWN, 1995).

O estresse oxidativo, caracterizado pelo desequilíbrio na homeostase redox intracelular, pode ocorrer devido à ineficiência do sistema de defesa antioxidante em lidar com a produção de EROs ou ainda pela produção excessiva de EROs (MORANO; GRANT; MOYE-ROWLEY, 2012). O acúmulo

das EROs pode resultar em danos oxidativos significativos para o funcionamento da célula (Figura 1). As EROs são capazes de danificar todas as principais biomoléculas da célula, incluindo o DNA, lipídios e proteínas. Estes danos podem levar à morte celular, acelerando o processo de envelhecimento e induzindo doenças relacionadas à idade (ABBOTT et al., 2009; MOSKOVITZ et al., 2001). Atualmente, muitos eventos patofisiológicos, como isquemia, diabetes, câncer e danos relacionados à reperfusão (como ataque cardíaco, infarto e disfunções em órgãos), assim como desordens neurodegenerativas como as doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington têm sido associados ao aumento das EROs e o consequente estresse oxidativo (COSTA et al., 1997; VALKO et al., 2007).

Os avanços na compreensão dos mecanismos de danos oxidativos em biomoléculas permitiram identificar uma diversidade de biomarcadores, tais como o grupamento carbonila em proteínas; aldeídos reativos como o malondialdeído (MDA), acroleína e trans-4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), provenientes da oxidação de lipídios; e 8-oxo-2'-deoxiguanosina e 8-oxo-guanosina, vindos da oxidação da guanidina do DNA (FRIJHOFF et al., 2015). Ao longo dos anos, estes biomarcadores têm sido utilizados para associar a ocorrência de estresse oxidativo com processos patológicos.

O radical HO[•] é conhecido por reagir com todos os componentes da molécula de DNA (tanto nuclear quanto mitocondrial), danificando principalmente as bases púricas e pirimídicas, mas também a estrutura da desoxirribose. O DNA mitocondrial possui uma taxa de mutagênese maior do que a do DNA nuclear, por conta de diversos fatores, incluindo a proximidade com o sítio onde são geradas as EROs. As modificações permanentes causadas pelos danos oxidativos ao material genético representam o primeiro passo para o desenvolvimento de mutagênese, carcinogênese e doenças relacionadas ao envelhecimento, tal como as doenças neurodegenerativas (CHA; KIM; MOOK-JUNG, 2015; VALKO et al., 2007).

Os ácidos graxos poli-insaturados presentes nos fosfolipídios também são muito sensíveis à oxidação. Uma vez formados, os radicais peroxila (ROO[•]) podem sofrer um rearranjo e formar endoperóxidos, cujo produto final da reação de peroxidação é a formação de malondialdeído (MDA). O MDA é mutagênico em bactérias e células de mamíferos, além de ser carcinogênico em ratos (VALKO et al., 2007). Além disso, a peroxidação lipídica acarreta alterações na

estrutura e na permeabilidade das membranas celulares, causando a perda da seletividade na troca iônica, e consequente liberação do conteúdo de organelas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

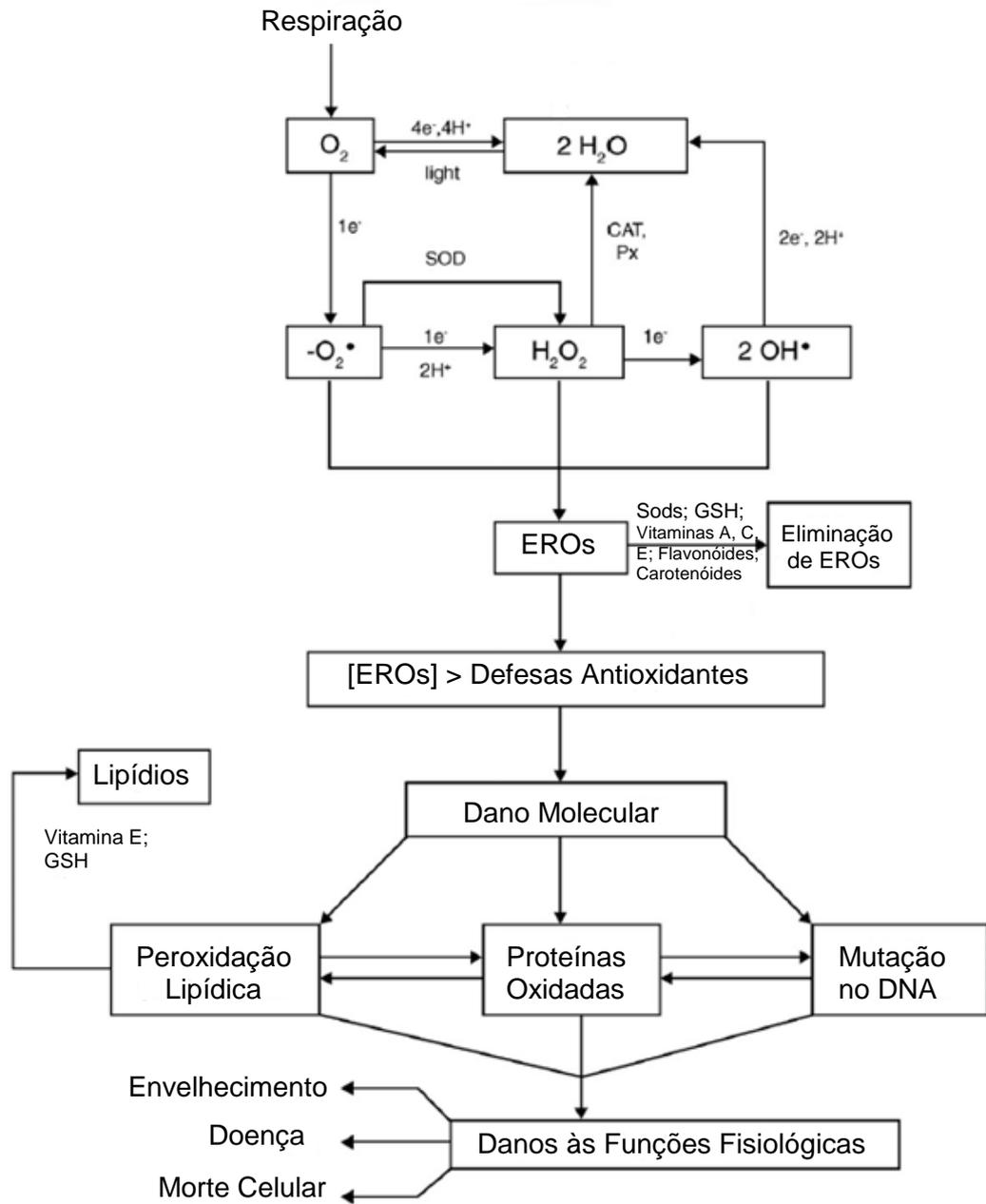


Figura 1: Fontes de EROs e as respostas celulares. Os oxidantes são gerados como resultado do metabolismo intracelular fisiológico, assim como do sistema enzimático. O sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático é sofisticado, e inclui catalases (CAT), peroxidases (Px), superóxido dismutases (Sods) e glutathiona (GSH), dentre outros. Quando a produção das EROs excede a defesa antioxidante, ocorre o que chamamos de estresse oxidativo, levando à danos ao DNA, à oxidação de proteínas e à peroxidação lipídica. Adaptado de (FRANÇA; PANEK; ELEUTHERIO, 2007).

As proteínas podem ser oxidadas por todas as EROs, assim como pelos produtos gerados na oxidação dos lipídios em decorrência do estresse oxidativo. O radical $O_2^{\cdot-}$ pode atacar especificamente os grupamentos $[4Fe-4S]$ de proteínas, tal como encontrado na enzima aconitase. Este ataque promove a liberação de Fe^{2+} e a consequente inativação da proteína. O Fe^{2+} livre pode ainda participar de reações com o H_2O_2 , gerando o radical $\cdot OH$, aumentando ainda mais a condição oxidativa dentro da célula (VALKO et al., 2007). As EROs podem ainda causar outras modificações, tais como a oxidação do enxofre da cisteína e metionina, bem como a formação de proteínas carboniladas, que são proteínas que sofreram danos oxidativos pela indução da formação de uma carbonila na cadeia lateral (prolina, arginina, lisina, treonina, histidina) (THANAN et al., 2014). O NO pode ser rapidamente inativado pela reação com o radical $O_2^{\cdot-}$, levando a produção do $ONOO^-$, um forte oxidante. O radical $O_2^{\cdot-}$ em excesso pode ainda deslocar íons ferro de proteínas, como as que contêm um cluster de $[4Fe-4S]$. O cluster nativo contém dois Fe^{2+} e dois Fe^{3+} , e a oxidação ocorre como na Figura 2. A proteína oxidada liga o Fe^{3+} mais firmemente, e o íon Fe^{2+} é liberado, podendo então participar da reação de Fenton, gerando os radicais $\cdot OH$, altamente reativos (Figura 3).



Figura 2: Reação de Inativação do Cluster $[4Fe-4S]$. Adaptada de (JOMOVA; VALKO, 2011).



Figura 3: Reação de Fenton. Adaptada de (JOMOVA; VALKO, 2011).

1.2 SISTEMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTE

Existem diferentes vias pelas quais as células conseguem eliminar as EROs, que podem incluir os sistemas (i) enzimático, caracterizados pela

presença de enzimas antioxidantes, tais como a superóxido dismutase (SALEM et al., 2015), catalase (SOOCH; KAULDHAR; PURI, 2014), glutathione peroxidase (DRINGEN et al., 2014), dentre outras; e (ii) não enzimático, representados pela glutathione (DRINGEN et al., 2014) e as vitaminas C (HARASYM; OLEDZKI, 2014), A (CHIU; FISCHMAN; HAMMERLING, 2008) e E (SINGH; DEVARAJ; JIALAL, 2005).

1.2.2 A família das enzimas superóxido dismutase (Sod)

Organismos eucarióticos utilizam o oxigênio molecular como acceptor final de elétrons na cadeia respiratória. A produção de $O_2^{\cdot-}$ é contrabalançada por um sistema antioxidante rápido, uma vez que o $O_2^{\cdot-}$ é uma molécula que pode potencializar a formação de outros radicais livres de maior toxicidade. A eliminação do radical $O_2^{\cdot-}$ ocorre pela presença da enzima Sod, que pode ser encontrada em todos os organismos eucarióticos, e também em seres procarióticos (SCOTT; MESHNICK; EATON, 1987).

Sods constituem a defesa primária contra o estresse oxidativo na maioria dos organismos. Em humanos, há três isoformas de Sod: Sod1, contendo um íon cobre e um zinco (Cu, Zn-Sod), distribuída amplamente dentro da célula; Sod2, contendo um íon manganês (Mn-Sod), localizada na mitocôndria; e a Sod3, também contendo um íon cobre e zinco, localizada extracelularmente (O'BRIEN et al., 2004). O radical superóxido tem como característica não ser permeável a membranas biológicas, havendo assim a necessidade da presença de Sods distintas no citosol, mitocôndria e no espaço extracelular das células (FRIDOVICH, 1995).

A Sod1 é uma enzima antioxidante encontrada no citosol, no núcleo, no peroxissoma e no espaço intermembranar mitocondrial das células eucarióticas. Já em bactérias, além de se localizarem no citoplasma das células, as Sods também podem ser encontradas no espaço periplásmico. Esta enzima apresenta-se dimerizada, com cada subunidade contendo um átomo de cobre e um de zinco (SANJAY et al., 2011; TSANG et al., 2014; VALENTINE; DOUCETTE; ZITTIN POTTER, 2005). No centro catalítico está o cobre que participa diretamente da catálise de desproporção de dois radicais $O_2^{\cdot-}$ em O_2 e H_2O_2 (Reação 1, Figura 4). Embora o íon zinco não atue na catálise, ele é

importante para estabilizar a estrutura da enzima (CERQUEIRA, 2007). Essa catálise acontece em um processo de duas etapas nas quais uma molécula do radical $O_2^{\cdot-}$ primeiro reduz o íon cúprico para formar o O_2 (Reação 2, Figura 4), e a segunda molécula do $O_2^{\cdot-}$ reoxida o íon cuproso para formar o H_2O_2 (Reação 3, Figura 4) (VALENTINE; DOUCETTE; ZITTIN POTTER, 2005).

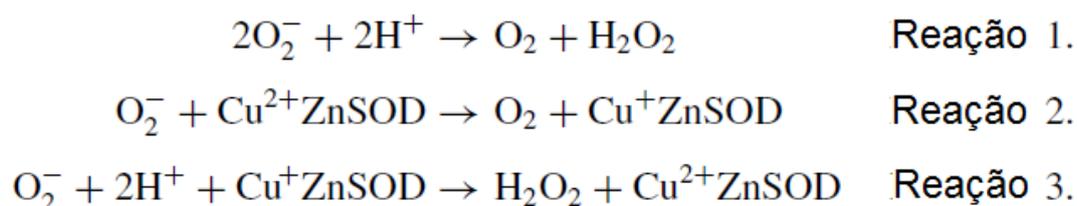


Figura 4: Mecanismo catalítico da Sod1. Adaptada de (VALENTINE; DOUCETTE; ZITTIN POTTER, 2005).

A Sod2, em células de seres eucarióticos, é mitocondrial. A Sod2 humana é diferente das demais isoformas Sods porque é menos efetiva quando a concentração de $O_2^{\cdot-}$ é maior que a concentração enzimática (SHENG et al., 2011). Este fato ocorre por conta de um evento chamado "flash de superóxido" que ocorre na mitocôndria humana. Nestes eventos com duração de 20 a 30 segundos, há a produção muito rápida de radicais superóxido em pequenas áreas dentro da célula. Nestas condições, a Sod2 é inibida de forma significativa para que não haja a superprodução de H_2O_2 , resultando em uma sinalização aberrante dentro da célula. O H_2O_2 é utilizado em diversas cascatas de sinalização, e sua produção precisa ser extremamente regulada na mitocôndria (SHENG et al., 2011).

A dismutação do $O_2^{\cdot-}$ pela Sod2 ocorre através de um mecanismo cíclico entre o manganês oxidado (Mn^{3+}) e reduzido (Mn^{2+}) (Figura 5).

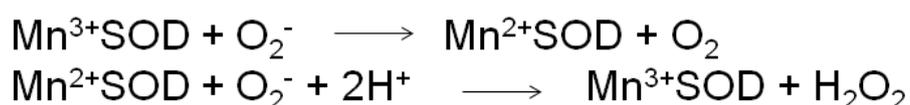


Figura 5: Mecanismo catalítico da Sod2. Adaptada de (SHENG et al., 2011).

A Sod3 é a isoforma mais recentemente descoberta. Diversos estudos têm sido feitos com a intenção de descobrir a regulação biológica e a função desta forma extracelular. O que se sabe, por enquanto, é que esta isoforma é encontrada na matriz extracelular de mamíferos e que polimorfismos foram associados a um aumento no risco de doenças isquêmicas cardíacas e à ocorrência de problemas cognitivos (NOZIK-GRAYCK; SULIMAN; PIANTADOSI, 2005).

Além de possuir papel importante na mitocôndria, as Sods são importantes também no endotélio; em ambos os sítios exercem a função inibindo a inativação oxidativa do NO biodisponível, e assim prevenindo a formação do ONOO⁻ ou do radical HO[•] via inibição da oxidação do cluster Fe-S de algumas enzimas (FUKAI; USHIO-FUKAI, 2011).

A falta da Sod1 contribui para anormalidades vasculares (aumento na vasoconstrição e disfunção endotelial) e na angiogênese (BAUMBACH; DIDION; FARACI, 2006; DIDION et al., 2002; GROLEAU et al., 2010; KONDO et al., 1997), além de evidências sugerirem a relação com a etiologia e o desenvolvimento de algumas doenças, como a Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA). O papel da Sod2 de manter a função mitocondrial é demonstrado pela letalidade neonatal em ratos sem esta enzima, com danos ao coração e outros órgãos; a falta de Sod2 em *Drosophila* também leva a uma elevada mortalidade em adultos jovens (LUK et al., 2003). Ratos deletados na Sod3 demonstraram uma mortalidade de 85% em uma semana, demonstrando o quanto essa isoforma também é importante (GONGORA et al., 2008).

1.3 A ISOFORMA SUPERÓXIDO DISMUTASE 1

A Sod1 é uma proteína formada por um homodímero de 32 kDa. Cada subunidade é composta por 153 aminoácidos, além de um íon cobre (Cu²⁺) e um zinco (Zn²⁺) formando o sítio ativo. O Cu²⁺ é mantido no sítio catalítico por interações com os nitrogênios do grupo imidazol de quatro histidinas (46, 48, 120 e 63). O Zn²⁺ interage com o imidazol das histidinas 63, 71, 80 e com o grupo carboxila do aspartato 83. O imidazol da histidina 63, que faz uma ponte entre os dois íons, fornece os prótons necessários à catálise enzimática promovida

pela Sod1. Embora o Zn^{2+} não atue na catálise, ele é responsável pela geometria do sítio ativo e posicionamento correto do Cu^{2+} , o qual atua na dismutação do radical $O_2^{\cdot-}$, alternando entre Cu^{2+}/Cu^+ , como descrito acima (Figura 4). Localizada em uma alça da região de contato entre as subunidades encontra-se uma ponte dissulfeto intramolecular, existente entre a cisteína 57 e 146, que é importante para estabilizar a estrutura da enzima (BRASIL, 2015; FURUKAWA; O'HALLORAN, 2006; TRIST; HARE; DOUBLE, 2018) (Figura 6).

A maturação da apo-Sod1 inativa na forma monomérica até holo-Sod1 ativa cataliticamente resulta da ligação com o $Zn(II)$, seguida da inserção do cofator catalítico $Cu(II)$ à proteína monomérica pela chaperona de cobre (CCS), com a formação de ponte dissulfeto intramolecular e subsequente dimerização (KAWAMATA; MANFREDI, 2010). Em células humanas, a Sod1 existe como uma combinação desses diferentes estados de metalação, e ainda que não seja conhecida a proporção exata, estima-se que aproximadamente 35% esteja na forma apo (TRIST; HARE; DOUBLE, 2018).

A níveis basais de estresse oxidativo, especialmente nos neurônios, há a transcrição contínua do gene *SOD1*, criando um pool de Sod1 monomérica sem metal (apo-mSod1); a concentração do pool é mantida de forma constante, com a enzima inutilizada sendo metabolizada pelo proteassomo 20S. Quando há o aumento do estresse oxidativo, como resultado do aumento da atividade metabólica, os sensores celulares redox induzem a transcrição proteica estimulando o carregamento de íons Zn^{2+} , por um mecanismo ainda não conhecido e o carregamento de Cu^{2+} juntamente com a dimerização da Sod1 mediada pela CCS. Durante este processo, há a formação de interações hidrofóbicas entre as cisteínas 6 e 111 (Cys6, Cys111) e entre os *loops* IV e IIV. O espaço solvente-inacessível entre os monômeros forma um dímero ativo com alta estabilidade, o que traz à tona a atividade biológica, fazendo com que os níveis de radical superóxido retornem aos basais (TRIST; HARE; DOUBLE, 2018).

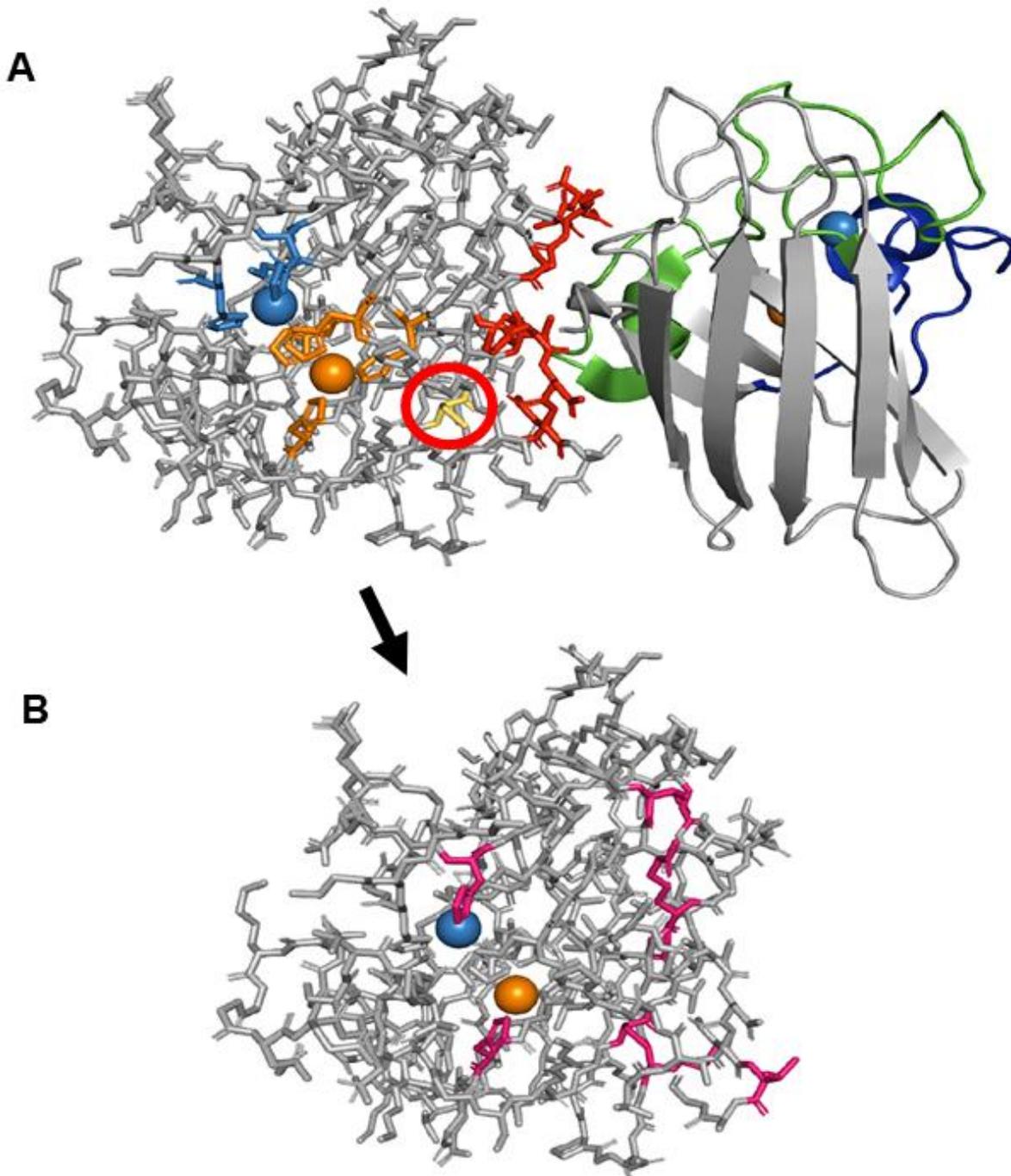


Figura 6: Estrutura da Sod1. A estabilidade estrutural da Sod1 é mediada por resíduos de aminoácidos específicos ligados ao íon Zn^{2+} , marcados em azul (His46, His 48, His63, His120). A estrutura cristalográfica da enzima está representada na figura A, na forma de fita (monômero da direita) e de palito (monômero da esquerda). Destacado dentro do círculo vermelho, a ponte dissulfeto intramolecular entre Cys57 e Cys146. A distribuição dos resíduos que são mais propensos à oxidação está mostrada em rosa na figura inferior, representados em rosa (Lys3, Cys6, Lys9, Thr54, Cys57, His80, Cys111, Arg115, His120, Cys146). Como pode ser visto na figura, os mesmos resíduos propensos à oxidação se alinham à interface do dímero (representada em vermelho, resíduos Glu50 – Asp53, Ile114, Gly148 e Ile150 – Ala153) e à região de ligação com o metal, representado em laranja. Adaptado de (TRIST; HARE; DOUBLE, 2018).

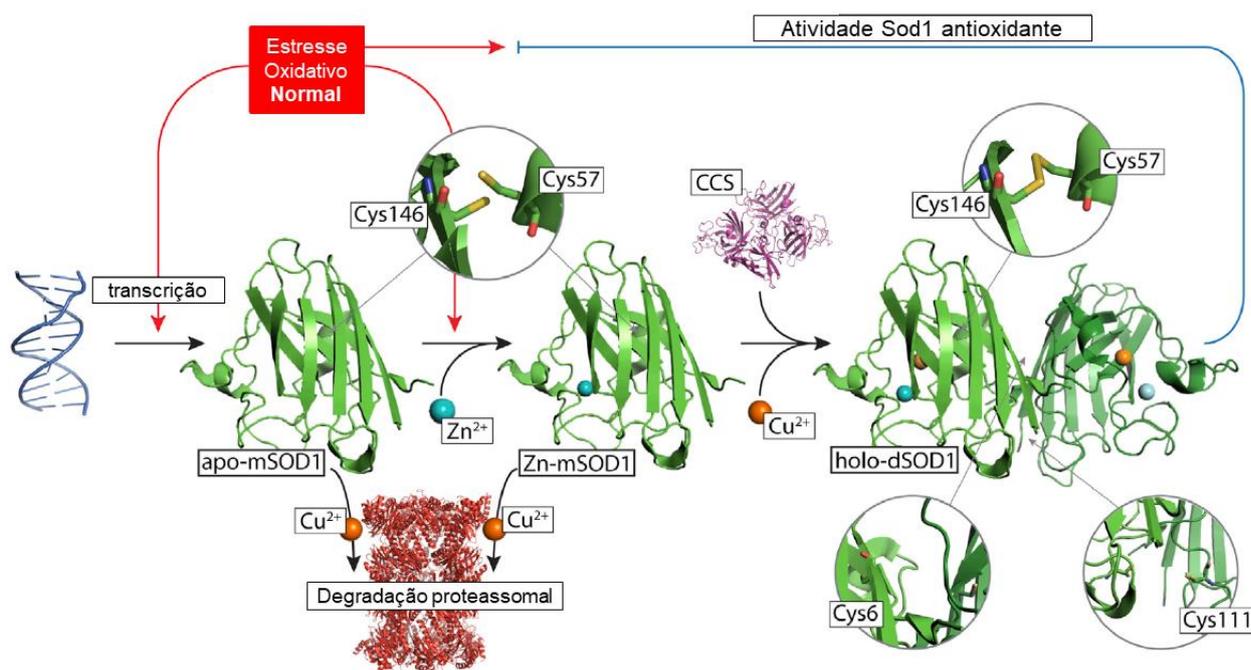


Figura 7: Biossíntese da Sod1 *wild type*. Adaptado de (TRIST; HARE; DOUBLE, 2018).

Entretanto, em condições de elevado estresse oxidativo (e consequente desbalanço de cobre), como é experimentado principalmente pelos neurônios dopaminérgicos em algumas doenças como Parkinson e ELA, a habilidade da Sod1 de formar dímeros e performar o seu papel antioxidante é prejudicada (Figura 8). Uma diminuição sistêmica na biodisponibilidade de cobre limita a maturação da Sod1, resultando em um acúmulo de proteínas deficientes em cobre e contendo zinco, que são notavelmente mais estáveis que a apo-Sod1. A falta de atividade antioxidante desse intermediário leva ao aumento das EROs. Sem o cobre, a estrutura da Sod1 possui ainda grande flexibilidade, expondo regiões da proteína que normalmente estão inacessíveis aos danos oxidativos do ambiente. Nessa conformação, quatro resíduos ficam especialmente expostos à oxidação, sendo as sulfidrilas das Cys6 e 111 particularmente susceptíveis a oxidação que desordena essas duas cisteínas promovendo a formação de oligômeros, que eventualmente se depositam como agregados insolúveis (TRIST; HARE; DOUBLE, 2018).

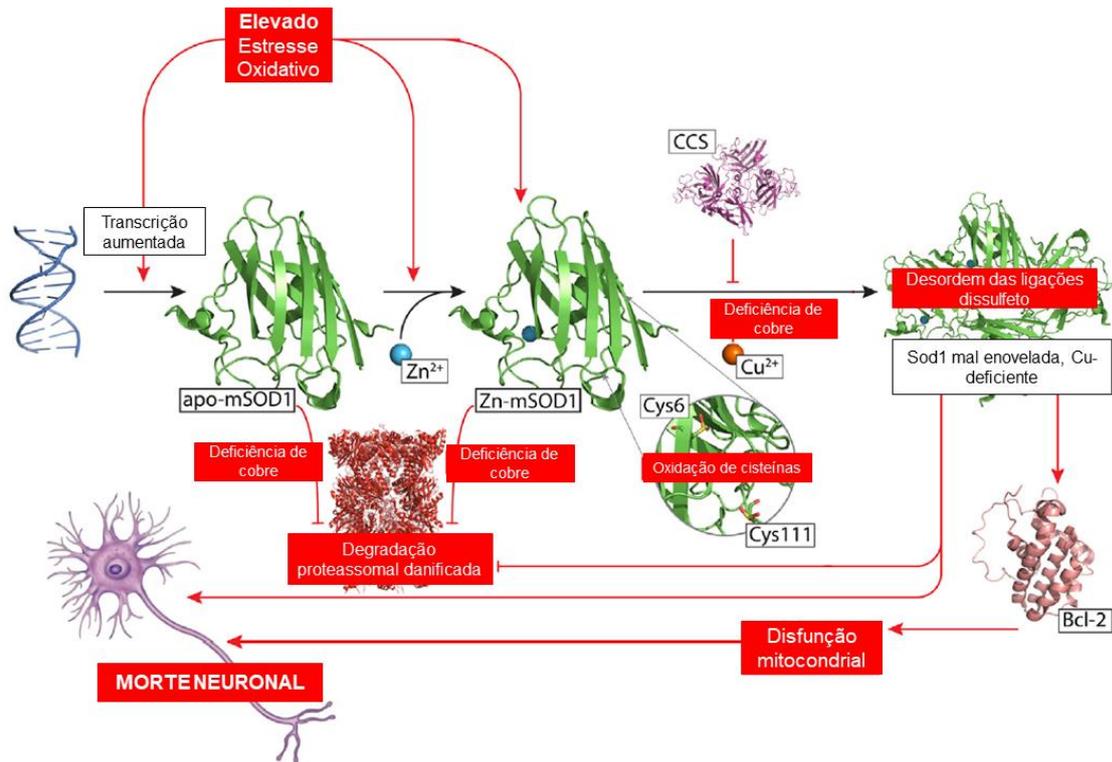


Figura 8: Biossíntese da Sod1 mutante. Adaptado de (TRIST; HARE; DOUBLE, 2018).

O aumento no estresse oxidativo pode estar relacionado à diferentes fatores, incluindo problemas na atividade das enzimas antioxidantes, como a Sod1. Um dos fatores que podem contribuir para a ocorrência disso é a existência de mutações. Atualmente existem mais de 150 mutações descritas para a Sod1, e embora elas ocorram sobre toda a superfície da proteína, e tenham características biofísicas diferentes, todas causam a forma familiar da Esclerose Lateral Amiotrófica (ELAf) (MOREIRA et al., 2013).

1.4 ENVELHECIMENTO E DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

O mundo está à beira de um marco demográfico histórico. Desde quando se tem registros, o número de crianças com menos de 5 anos supera o número de pessoas com 65 anos ou mais. Entretanto, ao longo das últimas décadas tem havido o aumento da expectativa de vida, atingindo uma idade média da população mundial de 70 anos em 2014, seis anos a mais do que na década de 1990. Somente nos países desenvolvidos essa média atingiu os 80 anos

(comparáveis a 50 anos no início do século XX) (JIN et al., 2015). O aumento nessa idade foi atingido especialmente devido a melhorias nas condições sanitárias, avanços na medicina, aumento nos padrões de vida e declínio da mortalidade infantil. Ainda que atualmente as expectativas de vida mais longas se encontrem nos países desenvolvidos, os aumentos mais significativos se encontram nos países em desenvolvimento, tal como o Brasil. Considerando os dados demográficos da população mundial, entre os anos 2000 e 2050 a proporção de pessoas com mais de 60 anos irá dobrar de 11% para 22%, o que, em termos absolutos, significa um aumento de 605 milhões para 2 bilhões de pessoas (JIN et al., 2015; WHO, 2011, 2018).

A transição da alta taxa de mortalidade do século passado para a alta longevidade e fertilidade acompanha os impactos socioeconômicos do desenvolvimento e também significou uma mudança nas principais causas de doença e morte. Demógrafos e epidemiologistas descrevem isso como “transição epidemiológica”, caracterizada pelo declínio de doenças infecciosas e agudas e o crescimento de doenças crônicas e degenerativas. Altas taxas de morte por doenças infecciosas são comumente associadas à pobreza, dietas pobres e infraestrutura limitada, fatores encontrados principalmente nos países em desenvolvimento. Embora esses países ainda experimentem alta mortalidade infantil por doenças infecciosas e parasitárias, uma das principais tendências epidemiológicas do século XXI é o surgimento de doenças crônicas e degenerativas (incluindo as neurodegenerativas) em todos os países do mundo, independente do nível de renda. Dentro dos próximos 10 ou 15 anos, pessoas em todas as regiões do mundo sofrerão mais mortes e incapacidades causadas por doenças não transmissíveis, tais como problemas coronários, câncer, diabetes e doenças neurodegenerativas (WHO, 2011).

O envelhecimento é uma perda progressiva da integridade fisiológica, levando à um prejuízo nas funções celulares e ao aumento da vulnerabilidade à morte. Envolve um processo fisiológico intrincado, até hoje pouco compreendido. Estudos aprofundados nos danos que podem ser observados em decorrência desse processo indicam que este tanto pode estar relacionado à mudanças epigenéticas, como a um aumento no nível de esse oxidativo. Estes processos, em conjunto ou de forma individual, levam a um declínio no maquinário de proteção celular, induzindo um aumento nos danos ao DNA, surgimento de

mutações e ativação de processos relacionados à morte celular (GUILLAUMET-ADKINS et al., 2017).

As doenças neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer (DA), Doença de Parkinson (DP), Doença de Huntington (DH) e Esclerose Lateral Amiotrófica têm se tornado as doenças prevalentes em idosos. A observação de que quase todos os cérebros envelhecidos mostram mudanças características ligadas à neurodegeneração aumenta a necessidade de investigar se essas marcas representam aspectos do envelhecimento cerebral que não afetam consideravelmente a função ou se são precursores de doenças neurodegenerativas (WYSS-CORAY, 2016).

De forma geral, as doenças neurodegenerativas são desordens idade-dependentes que possuem etiologias genéticas e fenótipos únicos. Os neurônios são células que possuem alta demanda energética e de oxigênio; sendo assim, eles são os mais vulneráveis a danos, além de possuírem o potencial de induzir o aparecimento de diversas doenças neurodegenerativas. De forma a suprir o requerimento energético, os neurônios são extremamente dependentes da mitocôndria, e qualquer alteração na estrutura desta organela pode afetar a biogênese de ATP, também induzindo a condição da doença neurodegenerativa (PANCHAL; TIWARI, 2018).

1.5 ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA

A Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) é a terceira doença neurodegenerativa mais comum. É uma doença caracterizada por ser uma desordem neurodegenerativa fatal, onde há a perda de neurônios motores superiores. De 90 a 95% dos casos de ELA não tem causa conhecida, sendo chamados de esporádicos (ELAs); os 10 a 5% restantes estão associados a um histórico na família, sendo chamados de forma familiar (ELAf) (CARRÌ et al., 2015). Afeta principalmente os neurônios motores superiores e inferiores do córtex motor, tronco cerebral e medula espinhal, resultando em fraqueza muscular progressiva. Em geral, a doença se inicia de modo focal, apresentando fraqueza unilateral dos membros ou com disfunção bulbar, com tendência a se propagar dentro do sistema motor, com a sucessiva perda da habilidade de fala e deglutição, até a eventual morte por conta de falha respiratória (BENNETT et

al., 2018; FOURNIER et al., 2018; HAYWARD et al., 2002; VAN DAMME; ROBBERECHT; VAN DEN BOSCH, 2017).

A ELA pode ser diagnosticada clinicamente, com base no reconhecimento de sintomas nos neurônios motores superiores (incluindo hiperreflexia, lentidão dos movimentos rápidos e aumento de tônus muscular) e sinais nos neurônios motores inferiores (como fasciculações e perda muscular), na presença de progressivo agravamento da doença e na ausência de outras patologias que possam explicar os sintomas. A ELA causa fraqueza muscular progressiva na maioria dos pacientes, e seus efeitos sobre os músculos respiratórios limitam a sobrevida para 2 a 5 anos após o início da doença (VAN DAMME; ROBBERECHT; VAN DEN BOSCH, 2017).

O estresse oxidativo, as EROs e a excitotoxicidade provocada pelo glutamato são consideradas atualmente os principais fatores que contribuem para a ELA. Visando o controle desses fatores, dois medicamentos são aprovados para o tratamento da ELA. O riluzol e o edaravone, tendo um efeito limitado mas significativo na sobrevida do paciente (JAISWAL, 2018; VAN DAMME; ROBBERECHT; VAN DEN BOSCH, 2017).

O riluzol pertence à classe dos benzotiazóis, antagonistas do glutamato, e parece bloquear a liberação excessiva do glutamato pelos neurônios motores. A secreção irrestrita do glutamato nas junções sinápticas superestimula os neurônios motores na recepção de sinais, o que leva a um acúmulo anormal de altos níveis de cálcio nos neurônios motores do soma e das células gliais. Grandes níveis de cálcio intracelular (Ca^{2+}) levam à peroxidação dos lipídios de membrana, danos ao RNA, DNA e mitocôndria, levando à morte celular (JAISWAL, 2018).

O mecanismo exato e os alvos moleculares do edaravone não são conhecidos. O que é sabido é que o edaravone atua como um “sequestrador” de EROs, inibindo a peroxidação sistêmica. Um dos achados mais interessantes sugere que o edaravone sequestra principalmente o H_2O_2 e protege as células contra o estresse oxidativo por estímulo da expressão da peroxiredoxina-2, diminuição da expressão da proteína dissulfeto isomerase A3 e inibição da apoptose (JAISWAL, 2018).

No ocidente, a ELA tem uma taxa de incidência de 1-2 indivíduos por 100.000/ano e uma prevalência de 4-8 por 100.000. O risco ao longo da vida de

desenvolver ELA é estimado em 1 em 400 (LOGROSCINO et al., 2010). A idade é um importante fator preditivo para a ocorrência de ELA, uma vez que a prevalência é maior em pacientes com idade entre 55 e 75 anos (MOREIRA et al., 2013). Em aproximadamente 10% dos pacientes com ELA, a doença ocorre na família (forma familiar – ELAf); nos 90% de casos restantes os pacientes são classificados como portadores de ELA esporádica (ELAs). O tempo de sobrevivência médio após o aparecimento dos sintomas é de aproximadamente 3 anos, e apenas 10% dos pacientes sobrevivem dez anos ou mais. Os escassos tratamentos existentes têm um efeito modesto na taxa de sobrevivência e progressão da doença (ABE et al., 2017; FOURNIER et al., 2018).

Tanto nos casos de ELAf quanto de ELAs já foram identificadas mutações causais, em mais de 20 genes diferentes (Tabela 1). As mutações mais comuns ocorrem nos genes: *C9orf72* (que codifica a *orf - open reading frame*) 72 do cromossomo 9; SOD1 (Sod1); TARDBP (TDP-43); FUS (FUS). Alguns outros genes são um pouco menos frequentes, como o UBQLN2 (ubiquilina 2); OPTN (optineurina) e VCP (proteína contendo valosina) (VAN DAMME; ROBBERECHT; VAN DEN BOSCH, 2017).

Tabela 1: Mutações em genes relacionados à ELA. Adaptado de (VAN DAMME; ROBBERECHT; VAN DEN BOSCH, 2017).

Mutação no gene associado à ELA	Frequência (% em ELA total)	Função principal do gene
<i>C9orf72</i>	10	Prevista para funcionar como fator de troca de guanina (GEF, em inglês) para pequenas vesículas GTPases, vesículas de transporte, autofagia e regulador da dinâmica de actina
SOD1	2	Eliminação de radicais superóxido
TARDBP	0,9	Metabolismo de RNA
FUS	0,7	Metabolismo de RNA
DCTN1	<0,5	Transporte axonal
NEFH	<0,5	Componente neurofilamentar
VAPB	<0,5	Transporte de vesículas
ALS2	<0,5	Transporte de vesículas
CHMP2B	<0,5	Transporte de vesículas
ANG	<0,5	Metabolismo de RNA
VCP	<0,5	Degradação de proteínas

OPTN	<0,5	Manutenção do complexo de Golgi, transporte de vesículas, autofagia
SETX	<0,5	Helicase de DNA/RNA, metabolismo de RNA
ATXN2	<0,5	Manutenção do complexo de Golgi, endocitose, metabolismo de RNA
UBQLN2	<0,5	Endereçamento de proteínas envelhecidas incorretamente para o proteassomo
SQSTM1	<0,5	Autofagia, ativação de NFκB
PFN1	<0,5	Polimerização de actina
hnRNPA1/A2	<0,5	Metabolismo de RNA e transporte
TUBA4A	<0,5	Componente microtubular
TBK1	<0,5	Ativação de NFκB, transporte de vesículas, autofagia
<i>C21orf2</i>	<0,5	Formação ciliar, reparo de DNA
NEK1	<0,5	Formação ciliar, reparo de DNA

1.6 ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA FAMILIAR E A SOD1

Como citado anteriormente, aproximadamente 10% dos casos de ELA são herdados; destes, de 20 a 25% estão relacionados a mutações no gene SOD1 (VALENTINE; DOUCETTE; ZITTIN POTTER, 2005). A natureza autossômica dominante da ELAf associada a Sod1 sugere um ganho tóxico de função para a mutante Sod1. Tal ganho de função está associado à formação de agregados (inclusões) por conta da instabilidade da proteína mutada (INGRE et al., 2015). As inclusões de hSod1, estruturas complexas com densidades heterogêneas, podem bloquear funções celulares essenciais ou causar toxicidade através do sequestro de outras proteínas (BERGEMALM et al., 2010).

A possibilidade da doença estar relacionada à falta de atividade Sod1 foi descartada pela observação de camundongos deletados em Sod1, que não desenvolveram a doença motora (REAUME et al., 1996).

Dentre todas as mutações já descritas, podemos destacar as mutações A4V, G93A, G93C e L38V, estudadas neste trabalho (Figura 9). Enquanto a mutação A4V está localizada na interface do dímero na primeira fita β, as mutações L38V, G93A e G93C estão localizadas em um dos polos do barril β, especificamente no *loop V* curto que conecta duas fitas β antiparalelas

(GALALELDEEN et al., 2009; SAEED et al., 2009). Além disso, a mutação A4V traz uma pequena sobrevida ao paciente ($1,4 \pm 0,9$ anos), e é a mais frequente nos Estados Unidos (EUA) (ROSEN et al., 1994). A G93A, além de ser a mutação mais estudada em camundongos como modelo de ELAF, também confere uma pequena sobrevida ao paciente ($2,3 \pm 1,5$ anos), enquanto a G93C é de longa sobrevida (TU et al., 1996). Assim como a A4V, a L38V é descrita como uma das mutações mais severas, onde os resíduos acabam formando um “plugue” hidrofóbico em um dos finais do barril β de cada um dos monômeros Sod1 (ANTONYUK; STRANGE; HASNAIN, 2010).

A ELA é uma desordem que ocorre de forma primariamente heterozigótica, sendo herdada majoritariamente de forma autossômica dominante (AL-CHALABI; VAN DEN BERG; VELDINK, 2017). Ainda que na literatura existam muitos relatos sobre ELA-Sod1 e homodímeros, a investigação da heterodimerização da Sod1 mutante se mantém pouco explorada (BENKLER et al., 2018). Mesmo com toda a pesquisa que vêm sendo feita com relação a ELA e Sod1, uma vez que essa foi uma das primeiras proteínas identificadas como causadoras da doença, as causas da doença e as vias que levam à neurodegeneração ainda não foram descobertas. Algumas das principais hipóteses incluem a excitotoxicidade causada pelo glutamato, estresse oxidativo dependente e independente de glutamato, déficits em fatores neurotróficos, disfunções mitocondriais e neuroinflamação, além do envelhecimento incorreto de proteínas e a agregação (BENKLER et al., 2018).

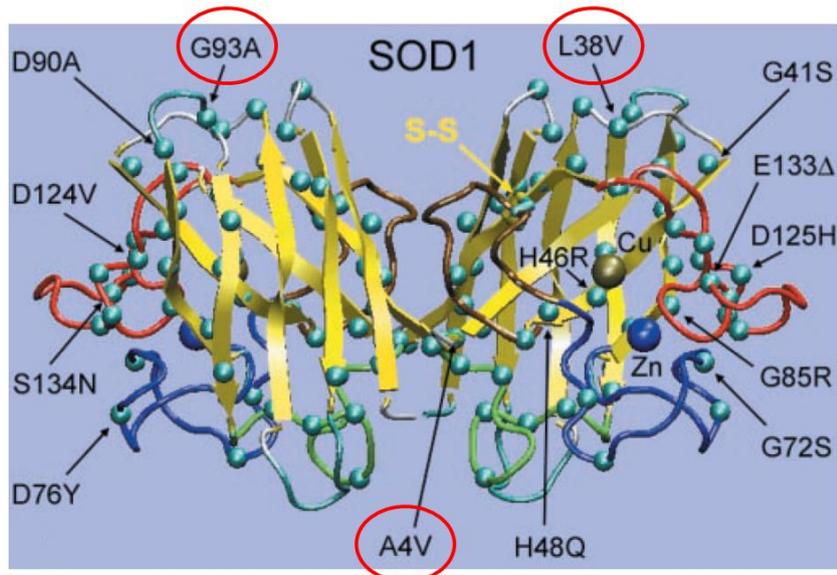


Figura 9: Estrutura da Sod1 e a localização dos resíduos mutantes associados à ELA. Diferentes mutações relacionadas ao desenvolvimento da ELA. Destacadas dentro de um círculo vermelho as mutações estudadas neste trabalho. Na figura está representada também a estrutura de um homodímero de Sod1 mostrando os barris β em amarelo, o *subloop* dissulfeto em marrom, os sítios de ligação ao zinco em azul, o *loop* de chave grega em verde e o *loop* carregado em vermelho. Os íons cobre e zinco estão demonstrados por uma esfera dourada e uma azul, respectivamente; a ligação dissulfeto entre as subunidades (S-S) entre Cys57 e Cys146 também está indicada. Adaptado de (HAYWARD et al, 2002).

Além dos estudos feitos com animais que fizeram com que a teoria do ganho de função tóxica da Sod1 mutante se tornasse mais forte, outras evidências, tais como a instabilidade estrutural da Sod1 mutante e a presença de agregados de Sod1 em neurônios de animais doentes, sugerem fortemente que os agregados são compostos por Sod1 enovelada incorretamente, podendo ter um papel no desenvolvimento da patogênese (KIM et al., 2014). Estudos *in vitro* já mostraram que pacientes contendo Sod1 com mutações associadas a ELA tiveram a estrutura proteica terciária alterada, impactando na formação do dímero de Sod1 (LINDBERG et al., 2005).

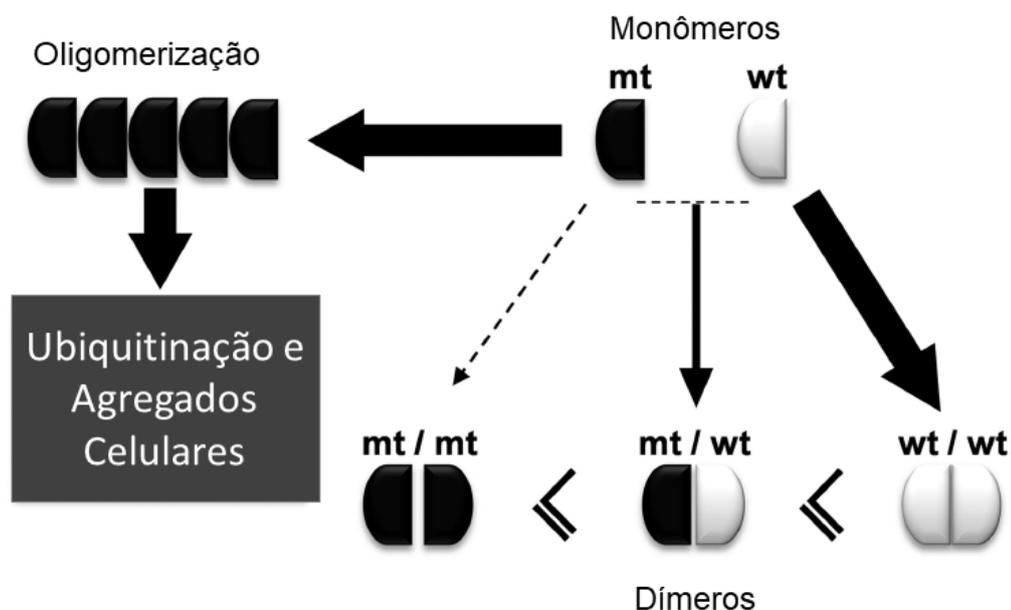


Figura 10: Modelo molecular para a combinação da proteína selvagem (WT) e mutante (MT) na agregação proteica da Sod1. Adaptado de (KIM et al., 2014).

Um dos modelos de formação de agregados proposto demonstra que a proteína Sod1 selvagem (WT) existe primariamente como um dímero, enquanto que a Sod1 mutante é majoritariamente monomérica (Figura 10) (KIM et al., 2014). Entretanto, a taxa dímero/monômero é variável e depende do sítio da mutação. A formação do oligômero envolve as ligações covalente dissulfeto (Cys6-Cys111) entre os monômeros de Sod1 que são mais estáveis (e esta ligação parece ser irreversível nesse contexto) do que a interação da dimerização. Nesse modelo, somente as Sod1 mutantes levam à formação dos agregados, e esse processo parece ser iniciado por monômeros de Sod1 mutantes. A ubiquitinação e a maquinaria de degradação pela via do proteassomo, a partir de determinado momento, se tornam insuficientes para prevenir e debelar a formação de agregados no modelo celular proposto (KIM et al., 2014). Ainda segundo esse modelo, a interação entre um monômero mutante e o selvagem é mais estável do que o mutante-mutante; essa característica também é reforçada por ser sabido que a mutação ocorre de forma heterozigótica, como mostrado anteriormente.

1.7 MODELOS DE ESTUDO DE ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA

O entendimento de quais mecanismos celulares são afetados e, assim, como ocorre o processo de patogênese é de suma importância para o desenvolvimento de tratamentos que possam prevenir, retardar ou curar uma doença. Com este objetivo, diferentes modelos celulares podem ser empregados, de forma a mimetizar, ou simular, algumas condições genéticas e moleculares relacionadas com a doença, lançando luz sobre o complexo processo de degeneração dos neurônios motores. Tais modelos podem ser observados na Tabela 2 (VAN DAMME; ROBBERECHT; VAN DEN BOSCH, 2017).

Tabela 2: Modelos utilizados para o estudo de ELA. Vantagens e limitações de alguns modelos usados para o estudo de ELA. N/A: não aplicável. Adaptado de (VAN DAMME; ROBBERECHT; VAN DEN BOSCH, 2017).

	Levedura	<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>Drosophila</i>	Peixe-zebra	Roedores	Derivados de iPSC, neurônios
Tempo de Vida	Curto	Curto	Curto	Longo	Longo	N/A
% homologia com genes humanos	30%	35%	75%	> 90%	100%	100%
Conservação de proteínas	26%	35%	40%	75%	85%	100%
Screening genético	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Futuro próximo
Screening de compostos	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
Custo	Baixo	Baixo	Baixo	Intermediário	Alto	Alto

1.7.1 Linhagem de células de neuroglioma (H4)

Muitas das mutações genéticas associadas à ELA levam à produção de proteínas aberrantes. Como discutido anteriormente, uma característica comum dessas proteínas é sua propensão a se dobrar e se agregar. Embora os ensaios *in vitro* de oligomerização e agregação nos ajudem a entender os princípios biofísicos da agregação proteica, existem certas características (como a

presença de domínios semelhantes à príons) que exigem o estudo em linhagens celulares para melhor observação de fenômenos (BOEYNAEMS et al., 2016).

A linhagem de células H4 tem sido bastante utilizada nos estudos de variados tipos de doença, incluindo as neurodegenerativas. Fazem parte do grupo das linhagens consideradas “linhagens celulares imortalizadas” (diferente das células primárias). Possuem vantagens como rápida proliferação, fácil manutenção em laboratório e possibilidade de estudo em larga escala, facilitando o estudo de *screening* da ação de compostos que possam ser usados no tratamento de doenças (LÁZARO; PAVLOU; OUTEIRO, 2017). Estudos com esta linhagem já foram feitos para verificar o efeito de mutações características da DP (LÁZARO et al., 2016), assim como em estudos envolvendo danos neuronais, apoptose, e consequências do aumento da concentração intracelular de EROs (CHENG et al., 2018).

Apesar de ser uma linhagem de células humanas, e os resultados obtidos próximos do que é observado em pacientes, como qualquer outro modelo o uso de células H4 apresenta algumas desvantagens.

Para a utilização aqui em questão, a limitação é principalmente a presença da Sod1 endógena. As células animais não são de fácil manipulação genética; desta forma, todos os resultados obtidos com as células H4 possuem a presença da Sod1 endógena, o que pode mimetizar falsos resultados. Outra desvantagem é a inexistência de um meio seletivo, então em todos os resultados coexistem células transfectadas com os plasmídeos de interesse e células não transfectadas.

1.7.2 *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudo

Para que um sistema seja utilizado como modelo de estudo, duas características gerais são necessárias: o modelo deve ser relevante e deve ser também passível de análise, assim como ocorre com a levedura *S. cerevisiae*. A relevância da *S. cerevisiae* para o estudo de doenças humanas é bem estabelecida pelo genoma e biologia celular conservados desse organismo. Pelo menos 60% dos genes de levedura possuem homólogos humanos, e em adição a isso, mais de 25% de genes relacionados à doença em humanos possuem homólogos próximos em levedura. As células de levedura, assim como as células de mamíferos, são eucarióticas, com a presença de organelas revestidas

por membranas, incluindo um núcleo. As células de levedura possuem aspectos fundamentais da biologia eucariótica, incluindo os processos de divisão celular e transmissão gênica e regulação transcricional, além da secreção e endereçamento de proteínas, e do metabolismo celular (KHURANA; LINDQUIST, 2010).

As proteínas *heat shock* e os osmólitos interagem com proteínas mal enoveladas; a maquinaria proteolítica, como o sistema ubiquitina-proteassomo, a autofagia mediada por chaperonas e o sistema de autofagia lisossomal degradam seletivamente proteínas instáveis ou mal enoveladas (KHURANA; LINDQUIST, 2010).

As vias secretórias, através das quais as proteínas são deslocadas do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi e então transferidas para as vesículas são conservadas em levedura e humanos, tendo uma importância particular nas doenças neurodegenerativas, onde há o transporte de vesículas dos neurônios para os terminais nervosos (KHURANA; LINDQUIST, 2010).

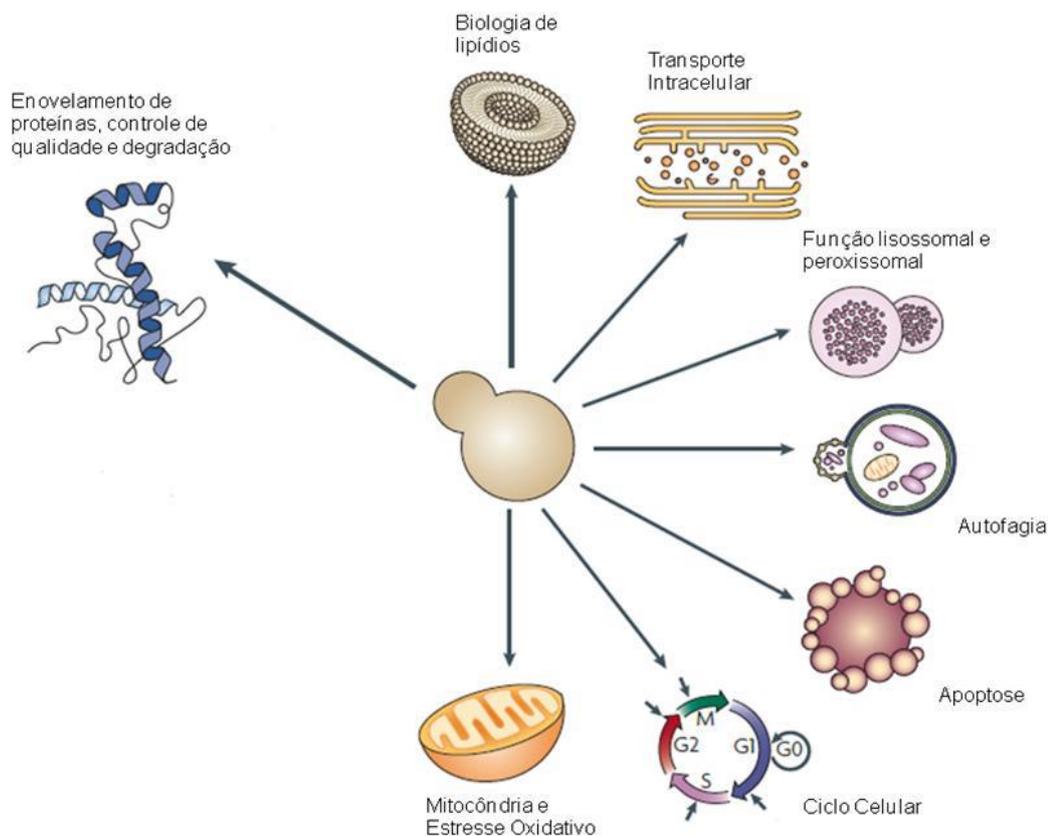


Figura 11: Biologia celular conservada em levedura. Numerosas vias celulares, como a de apoptose, autofagia, de controle de qualidade de proteínas, o transporte intracelular, assim como

a produção de EROs pela mitocôndria, o ciclo celular, a função lisossomal e peroxissomal e a biologia de lipídios são conservadas em humanos e levedura. Adaptada de (KHURANA; LINDQUIST, 2010).

O metabolismo de lipídios tem um papel central em um grande número de doenças humanas, como a obesidade, diabetes do tipo II e hipertensão. Uma vez que o estudo *in vitro* deste metabolismo é difícil, devido ao grande número de reações e enzimas que as catalisam, o estudo *in vivo* se faz necessário. O alto grau de conservação entre levedura e mamíferos torna a levedura um excelente modelo para o estudo deste metabolismo (NIELSEN, 2009).

O controle do ciclo celular envolve a produção e a destruição de diversas proteínas, e é conservado de levedura a humanos. A regulação desses eventos é importante principalmente para células como o câncer, onde as células se dividem sem restrição, ignorando os pontos de verificação (*checkpoints*). A regulação deste ciclo também é crítica para o processo de diferenciação celular. A semelhança do processo entre leveduras e humanos torna este organismo um bom modelo de estudo principalmente para novas terapias anticâncer (CROSS; BUCHLER; SKOTHEIM, 2011).

Como modelo de estudo, a levedura oferece vantagem frente outros sistemas por conta do baixo tempo de geração (1,5-3h), além de crescer de forma facilmente reproduzível e geneticamente estável. Mais importante que isto é a fácil manipulação genética: o seu DNA é facilmente modificado, e a recombinação homóloga é eficiente. A reduzida redundância genética favorece a visualização do efeito do gene deletado ou mutado (KHURANA; LINDQUIST, 2010).

Duas abordagens podem ser utilizadas no estudo de doenças humanas em levedura. Quando há um homólogo do gene associado à doença humana no genoma de levedura, a interrupção ou a superexpressão se tornam possíveis. De outra forma, quando o gene de interesse não tem um homólogo evidente em levedura, esse pode ser heterogeneamente expresso em levedura, e a cepa resultante submetida a análises funcionais. Além disso, ainda que o gene e sua função já sejam conhecidos, o uso da levedura como modelo permite que importantes descobertas acerca das bases moleculares da patogênese sejam feitas (TENREIRO et al., 2013).

Os mecanismos básicos e as vias relacionadas ao desenvolvimento de doenças, como a disfunção mitocondrial, problemas na transcrição, defeitos no tráfego de vesículas e o prejuízo na função proteossomal são muito conservados entre humanos e leveduras (TENREIRO; OUTEIRO, 2010). Doenças como Parkinson, Alzheimer e Huntington, estão relacionadas a desordens no envelhecimento de proteínas. Problemas na conformação tridimensional tornam as proteínas mais propensas à agregação. A formação de agregados resulta na perda da função normal, no ganho de uma função citotóxica ou ainda em ambos, dependendo da desordem (TENREIRO; OUTEIRO, 2010). Uma característica comum das desordens neurodegenerativas é também o acúmulo de proteínas poliubiquitinadas. O proteassomo é responsável por degradar substratos poliubiquitinados; o acúmulo destes indica a capacidade catabólica reduzida do proteassomo (LINDERSSON et al., 2004).

Em levedura, assim como em células de mamíferos, a organela central de produção de EROs é a mitocôndria. A capacidade da levedura de crescer em metabolismo fermentativo, onde a produção de EROs é quase inexistente, permite a análise de defeitos mitocondriais que seriam letais em células de mamíferos, como a falta da enzima Sod2, assim como verificar os danos causados pelo estresse causado exclusivamente pela fonte desejada (como uma droga) (KHURANA; LINDQUIST, 2010).

A levedura *S. cerevisiae* possui três estágios de crescimento, começando com uma fase de crescimento exponencial fermentativo quando a fonte de carbono disponível é a glicose. Nesta fase, conhecida como primeira fase exponencial do crescimento, as células apresentam metabolismo fermentativo devido a repressão catabólica exercida pela glicose sobre alguns genes necessários a respiração. Quando a glicose é consumida, as células entram em fase adaptativa, chamada de diauxia, onde não há crescimento. Após a adaptação, as células voltam a se multiplicar utilizando metabolismo respiratório, onde a fonte de carbono utilizada é o etanol produzido na fermentação (TOLEDANO, 2003). Quando esta fonte de carbono acaba, as células entram em fase estacionária. A tolerância celular à toxidez das EROs é diferente entre os diferentes estágios de crescimento. Células em fase estacionária possuem uma maior resistência ao estresse oxidativo e térmico do que células em primeira fase de crescimento exponencial (TOLEDANO, 2003). A respiração confere

proteção contra o estresse oxidativo, e duas hipóteses são postuladas quanto a isso. A primeira hipótese é a de que a produção de EROs pela mitocôndria induz uma resposta adaptativa ao estresse oxidativo. A segunda pressupõe que os genes que respondem ao estresse oxidativo, como *SOD1*, *SOD2* e *GSH*, também são reprimidos pela via de repressão catabólica (TOLEDANO, 2003). De fato, quando há o aumento na produção de EROs, há a ativação da maquinaria de defesa antioxidante celular.

Estudos que avaliam marcadores de estresse oxidativo, como proteínas carboniladas e peroxidação lipídica (BRASIL et al., 2013; TREVISOL et al., 2011), mostram que o nível basal desses marcadores em células em metabolismo respiratório é naturalmente maior por conta da produção de EROs inerente à esse processo. Por conta disso, a adição de fatores causadores de estresse oxidativo exógenos, como H_2O_2 e menadiona, tem efeitos mais drásticos em células sob metabolismo fermentativo (TOLEDANO, 2003).

1.5.2.3 Envelhecimento Replicativo x Envelhecimento Cronológico

Existem duas maneiras principais de avaliar a vida útil da *S. cerevisiae*. Se a pergunta for quantas vezes uma célula pode se dividir, a resposta é sua vida útil replicativa; se, por outro lado, a pergunta for quanto tempo uma célula pode ficar viva sem se dividir, a resposta será sua vida cronológica (POLYMENIS; KENNEDY, 2012).

O tempo de vida cronológico da levedura, que é medido como o tempo de sobrevivência das populações de células não-divisórias, tem sido usado com sucesso para a identificação de vias-chave responsáveis pela regulação do envelhecimento. Esses caminhos têm semelhanças notáveis com aqueles que regulam o tempo de vida em eucariotos superiores, sugerindo que a longevidade depende da atividade de genes e vias de sinalização que compartilham uma origem evolutiva comum. Assim, a *S. cerevisiae* unicelular é um sistema modelo simples que pode fornecer insights significativos na genética humana e na biologia molecular do envelhecimento (FABRIZIO; LONGO, 2007).

1.5.2.4 Defesa Antioxidante em *Saccharomyces cerevisiae*

Assim como outros organismos eucarióticos, a levedura *S. cerevisiae* possui mecanismos de defesa antioxidantes enzimáticos, como a catalase e a superóxido dismutase (ABBOTT et al., 2009), e não enzimáticos, como o GSH (FRANÇA; PANEK; ELEUTHERIO, 2007). Diferente das células de humanos, as células de *S. cerevisiae* possuem somente duas isoformas para a Sod: a Sod1 e a Sod2, cujas localizações são as mesmas das células de mamíferos (O'BRIEN et al., 2004; PEREIRA; ELEUTHERIO; PANEK, 2001). Tanto a Sod1 quanto a Sod2 têm um papel importante na sobrevivência celular (LONGO; GRALLA; VALENTINE, 1996).

Em *S. cerevisiae*, a Sod1 e a Sod2 são codificadas pelos genes nucleares *SOD1* e *SOD2*, respectivamente. Assim como em outros eucariotos, a Sod2 de levedura está localizada na matriz mitocondrial, e a Sod1 está localizada no citosol e no espaço intermembranar mitocondrial (O'BRIEN et al., 2004). A atividade Sod1 é responsável por 90-95% da atividade superóxido dismutásica total em *S. cerevisiae*. Como resultado disso, a deleção em *SOD1* são mais comprometedoras do que a deleção em *SOD2* (O'BRIEN et al., 2004). A Sod1 de levedura e de humanos apresentam 70% de homologia e 90% de identidade, enquanto a Sod2 apresenta 73,3% de homologia e 43,8% de identidade (FLÜCKIGER et al., 2002; MARTINS; ENGLISH, 2014). A atividade Sod2 é quase inexistente em células fermentativas e pode ser induzida pela carência nutricional ou pela respiração; já a Sod1 conta com 1% das proteínas solúveis na célula já durante a fermentação (LUSHCHAK et al., 2005). Muitos trabalhos já foram feitos comparando a importância de cada uma das isoformas; as atividades de Sod1 e Sod2 são complementares, e, como mencionado, a falta da Sod1 é pior para a célula. Células deficientes em Sod1 crescem pouco sob pressão atmosférica normal, enquanto células deficientes em Sod2 são mais sensíveis à agentes geradores de superóxido, como o paraquat. A Sod1 é a principal defesa contra o estresse oxidativo em *S. cerevisiae*, mas quando a cadeia respiratória se torna ativa, a importância da Sod2 é aumentada (DZIADKOWIEC et al., 2007). Ambas as Sods são requeridas para uma sobrevivência celular a longo prazo (FABRIZIO; LONGO, 2007).

2. JUSTIFICATIVA

Em decorrência do aumento da expectativa de vida da população mundial, as doenças relacionadas à idade se tornaram as principais causas de morte em vários países do mundo, inclusive no Brasil. A estimativa é que o número de mortes por conta dessas doenças dobre em 20 anos (WHO, 2012). Sendo assim, o envelhecimento da população mundial significa que o ônus social e econômico causado pelo aumento da prevalência das doenças neurodegenerativas aumentará nos próximos anos. Apesar da urgência necessária, doenças como Alzheimer, Parkinson e a ELA não possuem cura. Dessa forma, têm se dado cada vez mais destaque e importância ao estudo dos eventos moleculares e bioquímicos associados a essas doenças vem ganhando destaque.

Deve ser reforçado que embora existam estudos *in vitro*, avaliando a concentração proteica e o ambiente celular, tais parâmetros diferem muito do que ocorre *in vivo*. Neste estudo foi escolhido avaliar os efeitos das mutações patológicas na Sod1 relacionadas à ELAf na atividade enzimática, agregação e toxicidade em um contexto celular, utilizando inclusive métodos não-invasivos, como o método BiFC.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Investigar os mecanismos envolvidos na formação dos heterodímeros *wild type* e mutantes, especificamente A4V, G93A, G93C e L38V da Sod1 humana, relacionadas à ELAf, utilizando modelos celulares para fALS.

3.2 ESPECÍFICOS

- Analisar e quantificar a formação de aglomerados em células de neuroglioma expressando o heterodímero hSod1 *wild type*-mutante fusionados à proteína fluorescente Vênus (sistema BiFC), através de microscopia de fluorescência;

- Determinar a atividade enzimática do heterodímero de Sod1 *wild type*-mutante humana em células de *Saccharomyces cerevisiae* que não expressam a Sod1 de levedura;
- Verificar a tolerância ao estresse oxidativo de células de *S. cerevisiae* expressando o heterodímero;
- Analisar a formação e localização dos heterodímeros em células de *S. cerevisiae* expressando o heterodímero humano após o envelhecimento cronológico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 EXPERIMENTOS COM CÉLULA ANIMAL

4.1.2 O Sistema BiFC

A fim de avaliar o efeito dos heterodímeros de hSod1 no processo de oligomerização, foi utilizado o ensaio de BiFC (BRASIL et al., 2017; GONÇALVES; MATOS; OUTEIRO, 2010) (Figura 12).

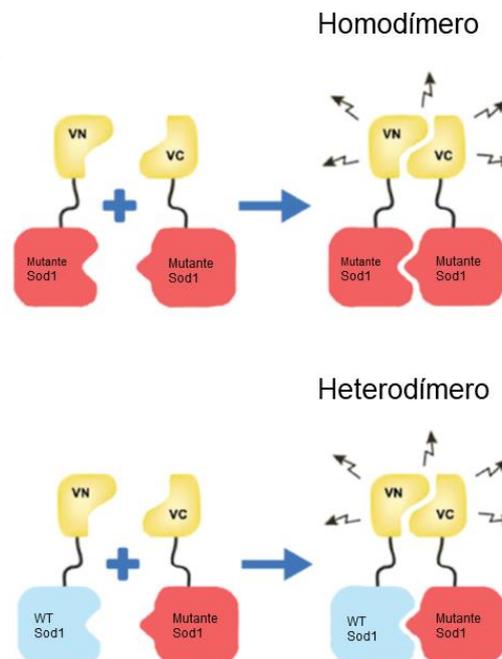


Figura 12: Representação esquemática do sistema BiFC. Na célula H4, foram expressos dois plasmídeos: um com a sequência VN-hSod1 WT e outro com a sequência hSod1-VC Mutante,

conforme o esquema apresentado, de forma que dentro do modelo celular havia a expressão de monômeros de Sod1 fusionados a um fragmento N-terminal (VN) e C-terminal (VC) da proteína Vênus. Após formação dos dímeros, os fragmentos interagem, reconstituindo a proteína fluorescente (Adaptado de BRASIL et al., 2017).

4.1.3 Meio de Cultivo e Transfecção

Células H4 (neuroglioma) (ATCC® HTB-148) cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com soro fetal bovino (10% v/v) e antibiótico penicilina-estreptomicina (1% v/v) foram mantidas em incubadora a 37°C, 5% CO₂. As células foram cultivadas em placas de diferentes tamanhos, sempre em concentração de 7,5 x 10⁴ células/mL.

As células foram transfectadas pelo método de fosfato de cálcio (JORDAN; SCHALLHORN; WURM, 1996). Após aproximadamente 12h de plaqueamento celular, a confluência das células foi verificada. Se a confluência estivesse em aproximadamente 80%, o meio de cultivo celular era substituído por meio fresco e as células colocadas em incubadora novamente. Após 6h da troca do meio de cultivo celular, a mistura reacional foi preparada, seguindo o protocolo de transfecção a seguir (para cada poço a ser transfectado): 36 µL de tampão HBS (HEPES *Buffer Saline* – para 100 mL de tampão: 0,5 g de HEPES; 0,8 g NaCl; 0,1 g glicose; 0,37 g KCl; 1 g de Na₂HPO₄), 2,1 µL de CaCl₂ 2,5 M e 8 µg de DNA plasmidial total (4 µg de DNA plasmidial VN, 4 µg de DNA plasmidial VC). Após 15 minutos de preparação do meio reacional, a mistura foi cuidadosamente gotejada de forma espaçada no poço, e as placas armazenadas na estufa novamente. Após aproximadamente 18h, o meio de cultivo celular foi novamente trocado por meio fresco. Após 48h, as células foram verificadas em microscópio de fluorescência para verificação da eficácia da transfecção.

Os plasmídeos usados para transfecção foram construídos no laboratório de Neurodegeneração Experimental, sob orientação do Prof. Tiago Fleming Outeiro, na Alemanha (Figura 13) (BRASIL et al., 2018; MAGALHÃES, 2018).

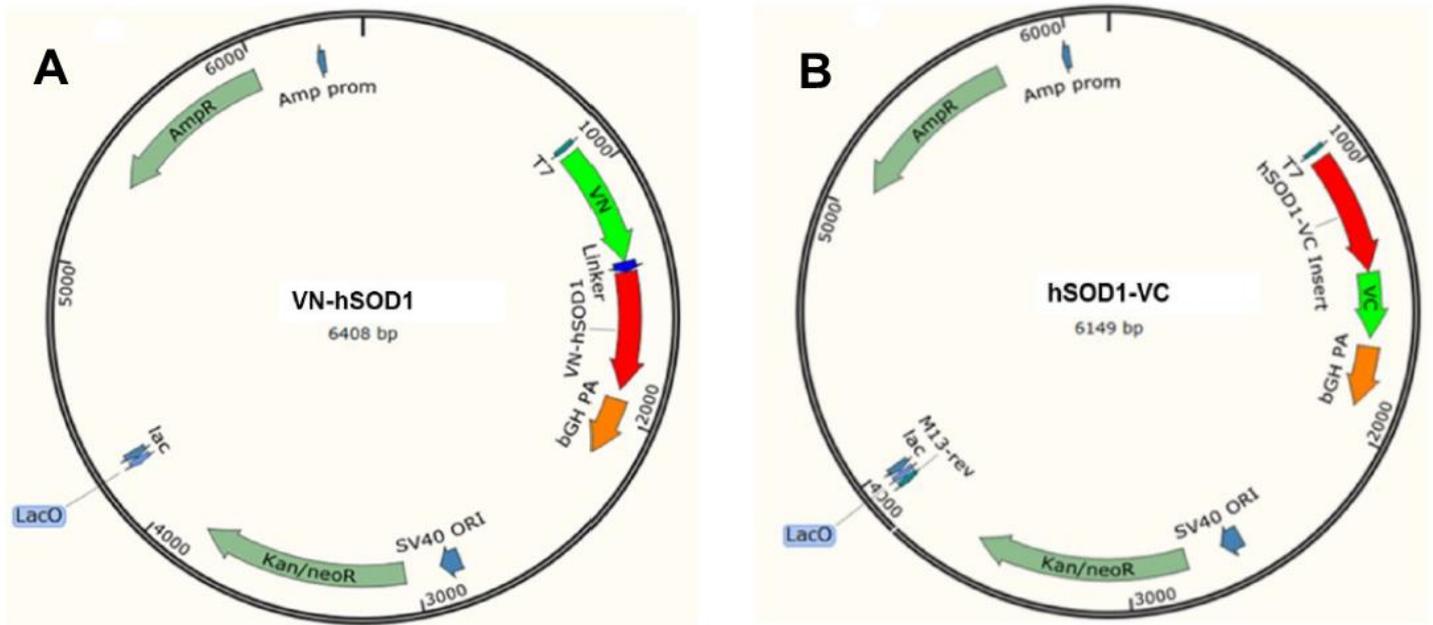


Figura 13: Mapa dos vetores empregados para clonagem de células H4 expressando hSod1WT ou mutante fusionadas ao fragmento VN ou VC da proteína Vênus. Plasmídeo com a sequência de Sod1 humana (hSod1) WT ou mutante e com a sequência do fragmento N (em **A**) ou C-terminal (em **B**) da proteína Vênus (Adaptado de MAGALHÃES, 2018).

4.1.4 Localização e Formação de Aglomerados

Após 48h de transfecção, as células foram lavadas com tampão DPBS (*Dulbecco's* tampão fosfato salino) e fixadas com 400 μ L de solução 4% de paraformaldeído (PFA), por 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com DPBS e incubadas com DAPI (4'-6'-diamino-2-fenilindol) 0,1 μ g/mL por 10 minutos. Após incubação, as células foram lavadas novamente com DPBS e deixadas em água para visualização em microscópio. As imagens foram obtidas com microscópio Leica DMI 6000B, com objetiva de 40x.

Para determinação do perfil de formação de aglomerados, em cada experimento foram analisadas por contagem 50 células diferentes; as células foram então divididas em três grupos: células sem aglomerados, células com menos de cinco aglomerados, e células com mais de 5 aglomerados (BRASIL et al., 2018; LÁZARO et al., 2014; MAGALHÃES, 2018).

4.1.5 Expressão de hSod1 por Western Blot

4.1.5.1 Obtenção do Extrato Protéico

Após 48h de transfecção, as células foram lavadas com DPBS e tratadas com tampão de lise RIPA (*radioimmunoprecipitation assay* – 50 mM Tris pH 8.0, 0,15 M NaCl, 0,1 % SDS (m/v), 1 % NP40 (v/v), 0,5 % (m/v) Na-deoxicolato), acrescido com 2 mM EDTA e coquetel de inibidor de protease (um tablete/10 mL – Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha) por 10 minutos/4 °C. O lisado era então “raspado” da placa e transferido para microtubo. O sobrenadante era então recolhido por centrifugação a 13 000 rpm, 4 °C, por 10 minutos, e armazenado a – 20 °C. A concentração de proteína por extrato era determinada pelo método de Bradford (BioRad Laboratories, Hercules, EUA).

4.1.5.2 Géis de Resolução e Empilhamento

A mistura para o gel de resolução (*running gel*) 15% desnaturante foi preparada misturando-se em um recipiente 4,5 mL de solução estoque de acrilamida-bisacrilamida 30%, 1,68 mL de tampão Tris-HCl 2M pH 8,8, 1,2 mL de H₂O, 1,5 mL de 10% SDS, 9 µL de TEMED e 90 µL de solução estoque de persulfato de amônio (PSA) 10%. A mistura foi suavemente agitada e então aproximadamente 8 mL adicionados entre as placas de vidro do sistema de eletroforese vertical Mini-PROTEAN Tetra Cell, da BioRad. O gel de empilhamento (*stacking gel*) foi preparado com 0,496 mL de solução estoque de acrilamida-bisacrilamida 30%, 0,370 mL de tampão Tris-HCl 1M pH 6,8, 1,3 mL de H₂O, 0,375 mL de 10% SDS, 3 µL de TEMED e 30 µL de solução estoque de PSA 10%. Quando o *running gel* se encontrava polimerizado, foi adicionado a mistura do *stacking gel* e imediatamente após o pente para a criação dos poços. Ao final da polimerização, o gel foi imediatamente usado, ou, se necessário, armazenado a 4°C, envolto em plástico filme com uma pequena camada de água para evitar o ressecamento.

4.1.5.3 Condições de Eletroforese

30 µg de proteína foram tratadas com tampão de proteína (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 0,5% azul de bromofenol, 4 mM EDTA, 20% glicerol, 10% β-mercaptoetanol) por 5 minutos à 95 °C, sob agitação constante. A amostra foi então aplicada no gel de SDS-poliacrilamida 15% (SDS-PAGE), por aproximadamente 80 minutos, sob voltagem constante de 120 V, imerso em tampão de corrida SDS Tris-Glicina 0,5% (250 mM Tris, 200 mM Glicina, 1% SDS, pH 8.3) (BRASIL et al., 2018; MAGALHÃES, 2018).

4.1.5.4 Transferência de proteínas para membrana de PVDF, bloqueio dos sítios livres da membrana, incubação com anticorpos, revelação da membrana e análise da imagem

Após a corrida de eletroforese, foi feita a transferência das proteínas do gel para a membrana de PVDF, utilizando o sistema TransBlot Turbo Transfer System (BioRad, Hercules, EUA), com corrente constante de 0,3 A, por 30 minutos. Em seguida, a membrana foi incubada em solução bloqueadora (4% BSA (*bovine serum albumine*) (m/v) em TBS-Tween (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween, pH 7.5) por 2 h. A solução bloqueadora foi então substituída por uma nova solução bloqueadora contendo anticorpo anti-hSod1 1:2000 (sc-8637 Santa Cruz Biotechnology, produzido em cabra) e anti-γ-tubulina 1:5000 (T5326 Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA, produzido em camundongo) em BSA/TBS-Tween 4 % (v/v). A membrana foi mantida a 4 °C, sob agitação leve, *overnight*. Após incubação com anticorpo primário, a membrana foi lavada por três vezes com solução TBS-Tween para completa remoção do anticorpo, sendo então incubada por mais 1h com solução BSA/TBS-Tween 4% contendo ambos os anticorpos secundários anti-camundongo e anti-cabra conjugados com peroxidase, numa proporção de 1:6000.

Para revelação da membrana, após incubação com anticorpo secundário, ela foi lavada três vezes com solução TBS-Tween. Para detecção das bandas, uma mistura composta com reagente luminol e solução de peróxido (Kit Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Merck Millipore, EUA), em proporções como descritas no manual do kit (WBKLS0500), foi adicionada à

membrana um minuto antes desta ser analisada pelo software Fusion FX (Vilber Lourmat, França). A intensidade de cada banda foi determinada usando software ImageJ (NIH, Bethesda, EUA), sendo normalizada com o padrão γ -tubulina.

4.1.6 FRAP

A técnica de FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) foi aplicada após 48h de transfecção, plaqueadas em μ -Dish 35 mM (Ibidi, Alemanha). O experimento foi feito em microscópio Leica 6000B equipado com incubadora, que foi mantida à 37 °C, 5% CO₂. As imagens foram obtidas utilizando uma objetiva de 40x, com intervalos de 10 s entre cada uma das imagens, em software Metamorph (Omicron Lasers, Suíça). Em cada uma das células, uma inclusão era demarcada por uma região circular e “apagada” utilizando laser de 488 nm à 100% de potência. Imagens antes do *bleaching* (“apagamento”) foram capturadas para estimar a intensidade inicial da fluorescência, e a recuperação após o *bleaching* foi analisada em relação à intensidade de fluorescência pré-*bleaching*. O processamento das imagens e a medida da intensidade da fluorescência foi feita com o software ImageJ (TENREIRO et al., 2014, 2016).

4.2 EXPERIMENTOS COM *Saccharomyces cerevisiae*

4.2.1 Cepas e Plasmídeos Utilizados

As cepas expressando a Sod1 humana selvagem (WT) e mutantes A4V, G93A, G93C ou L38V foram construídas através da transformação da BY4741 com os plasmídeos pME2794 (contendo o fragmento N-terminal da proteína Vênus) e pME2795 (contendo o fragmento C-terminal da proteína Vênus), construídos para este trabalho na Alemanha, também em colaboração com o grupo do prof. Tiago Outeiro. Ambos os vetores utilizados para a expressão de hSod1 apresentavam as seguintes características: (i) o gene da hSod1 sob controle do promotor da Sod1 de levedura; (ii) *leu2* (pME2794) e *ura3* (pME2795) como marcador nutricional em levedura, e; (iii) gene que confere resistência à ampicilina para seleção bacteriana (Figura 14). Para a subclonagem da

sequência referente à hSod1 WT ou mutantes foram utilizadas as enzimas de restrição SacI e HindIII. As cepas construídas foram denominadas segundo a tabela abaixo (Tabela 3).

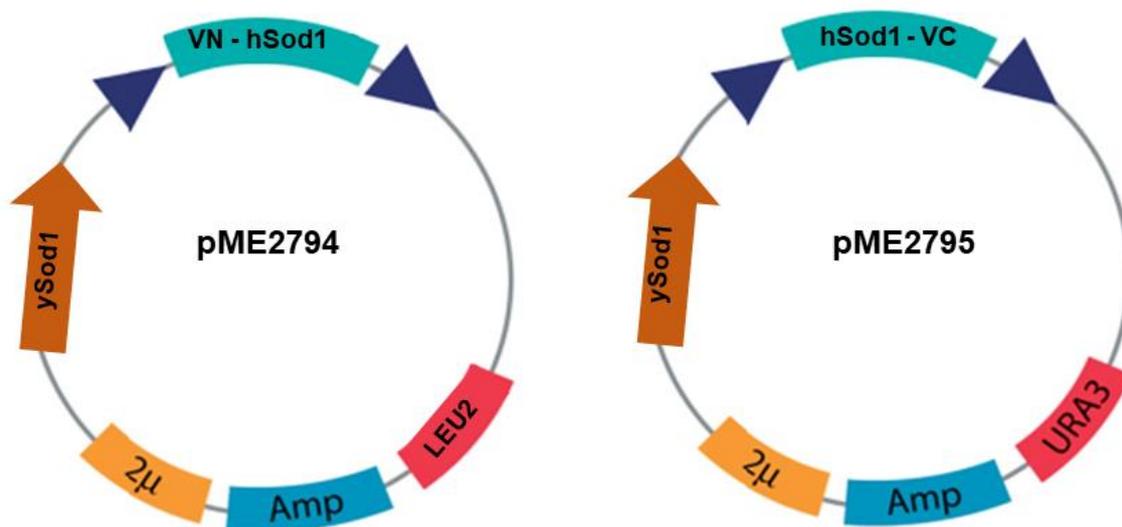


Figura 14: Esquema representativo dos plasmídeos pME2794 e pME2795 com hSod1 com proteína Vênus. Os plasmídeos foram utilizados na clonagem da cepa *sod1Δ* para que expressassem a hSod1 WT ou mutante fusionadas aos fragmentos VN ou VC da proteína Vênus. Os plasmídeos continham a sequência promotora da Sod1 de levedura (*ySod1*), a Sod1 humana (*hSod1*), ampicilina como marcador de resistência (*Amp*) e *LEU2* (*pME2794*) ou *URA3* (*pME2795*) como marcador nutricional.

Tabela 3: Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas neste estudo.

Cepa	Genótipo	Fenótipo	Fonte
BY4741	<i>MATa; his3; leu2; met15; ura3</i>	Cepa controle	Euroscarf, Alemanha
<i>sod1Δ</i>	Isogênica a BY4741 exceto <i>sod1::KanMX4</i>	Sem a expressão da Sod1	Euroscarf, Alemanha
WT	Isogênica a <i>sod1Δ</i> expressando os plasmídeos pME2794 e pME2795 contendo a hSod1 WT	Sem expressão da Sod1 de levedura, expressando hSod1 WT (homodímero)	Este trabalho
A4V – A4V	Isogênica a <i>sod1Δ</i> expressando os plasmídeos pME2794 e pME2795 contendo a hSod1, contendo a mutação A4V	Sem expressão da Sod1 de levedura, expressando hSod1 A4V (homodímero)	Este trabalho

G93A – G93A	Isogênica a <i>sod1Δ</i> expressando os plasmídeos pME2794 e pME2795 contendo a hSod1, contendo a mutação G93A	Sem expressão da Sod1 de levedura, expressando hSod1 G93A (homodímero)	Este trabalho
G93C – G93C	Isogênica a <i>sod1Δ</i> expressando os plasmídeos pME2794 e pME2795 contendo a hSod1, contendo a mutação G93C	Sem expressão da Sod1 de levedura, expressando hSod1 G93C (homodímero)	Este trabalho
L38V – L38V	Isogênica a <i>sod1Δ</i> expressando os plasmídeos pME2794 e pME2795 contendo a hSod1, contendo a mutação L38V	Sem expressão da Sod1 de levedura, expressando hSod1 L38V (homodímero)	Este trabalho
WT – A4V	Isogênica a <i>sod1Δ</i> expressando os plasmídeos pME2794 contendo a hSod1 WT e pME2795 contendo hSod1, contendo a mutação A4V	Sem expressão da Sod1 de levedura, expressando hSod1 WT e hSod1 A4V (heterodímero)	Este trabalho
WT – G93A	Isogênica a <i>sod1Δ</i> expressando os plasmídeos pME2794 contendo a hSod1 WT e pME2795 contendo hSod1, contendo a mutação G93A	Sem expressão da Sod1 de levedura, expressando hSod1 WT e hSod1 G93A (heterodímero)	Este trabalho
WT – G93C	Isogênica a <i>sod1Δ</i> expressando os plasmídeos pME2794 contendo a hSod1 WT e pME2795 contendo hSod1, contendo a mutação G93C	Sem expressão da Sod1 de levedura, expressando hSod1 WT e hSod1 G93C (heterodímero)	Este trabalho
WT – L38V	Isogênica a <i>sod1Δ</i> expressando os plasmídeos pME2794 contendo a hSod1 WT e pME2795 contendo hSod1, contendo a mutação L38V	Sem expressão da Sod1 de levedura, expressando hSod1 WT e hSod1 L38V (heterodímero)	Este trabalho

4.2.2 Procedimentos para a transformação de *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae*

4.2.2.1 Meios de cultura e condições de crescimento de bactérias

O meio LB (1% (p/v) triptona; 0,5% (p/v) extrato de lêvedo; 1% (p/v) NaCl; pH 7,5) de cultura líquido foi utilizado para o crescimento das bactérias. Com a finalidade de selecionar as cepas com resistência à ampicilina, foi adicionada ampicilina na concentração final de 100 µg/mL. Para crescimento em meio sólido foi adicionado 2% (p/v) de ágar. As células foram mantidas em estufa à 37°C

para crescimento em meio sólido; para crescimento em meio líquido, foi mantida a mesma temperatura, com agitação constante de 300 rpm.

4.2.2.2 Preparo de células bacterianas competentes

Uma colônia da cepa DH5 α da bactéria *Escherichia coli* foi incubada por cerca de 16h em um tubo com capacidade para 50 mL contendo 5 mL de meio de cultivo LB líquido, sob agitação constante de 300 rpm e 37°C. Em seguida, uma alíquota de 0,25 mL da suspensão bacteriana foi retirada e transferida para um frasco erlenmeyer de 250 mL contendo 25 mL de meio LB, mantendo-se as mesmas condições de crescimento. O crescimento bacteriano foi acompanhado até o início da fase logarítmica de crescimento, OD₆₀₀ entre as faixas de 0,2 e 0,4. As células foram coletadas por centrifugação a 4.000 rpm/ 5 minutos a 4°C e mantidas no gelo para a realização das etapas posteriores. As células foram ressuspensas em 12,5 mL de CaCl₂ 0,1M estéril, previamente gelado, e a suspensão celular mantida no gelo por 1 hora. Após este tempo, as células foram coletadas por centrifugação (como descrito anteriormente) e ressuspensas em 2,5 mL de CaCl₂ 0,1M estéril. Finalmente, as células foram aliquotadas em microtubos, deixadas no gelo por 30 minutos e estocadas a -80°C por tempo indeterminado.

4.2.2.3 Transformação bacteriana por choque térmico

As células bacterianas competentes foram descongeladas em banho de gelo. Em microtubo estéril, foram aliquotados 20 μ L de células competentes e 1 μ L da suspensão plasmidial ou 1 μ L de H₂O estéril (controle negativo). A mistura foi suavemente agitada e deixada no gelo por 30 minutos. Após este tempo, as células foram submetidas a um choque térmico por incubação à 42 °C durante 3 minutos. Foi adicionado 1 mL de meio LB e feita incubação a 37 °C por 1 hora. Posteriormente, o conteúdo foi centrifugado a 13.000 rpm por 5 minutos, ressuspensão em 100 μ L de água destilada estéril, e plaqueado em placas de meio LB sólido contendo ampicilina e estas foram incubadas a 37°C em estufa por aproximadamente 18 h.

4.2.2.4 Isolamento de DNA plasmidial de *Escherichia coli*

Para o isolamento rápido e em pequena escala de DNA plasmidial de *E. coli* foi utilizado o kit QIAprep Spin Miniprep, (Qiagen, Alemanha). A extração foi efetuada de acordo com as recomendações do fabricante (Catalog Number/ID: 27104). A solução de DNA plasmidial foi armazenada em água ultrapura estéril a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e utilizado em etapas posteriores para a transformação de *S. cerevisiae* utilizadas para análise do efeito da expressão dos homo ou heterodímeros de hSod1.

4.2.2.5 Transformação de levedura por eletroporação

Para a obtenção das cepas de *S. cerevisiae sod1Δ* expressando hSod1 homo ou heterodímero foi utilizada a metodologia de transformação por eletroporação. Células *sod1Δ* foram cultivadas em 3 mL de meio YPD 2 % (2% glicose, 2% peptona, 1% extrato de lêvedo), a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$, 160 rpm, *overnight*. Deste cultivo, foi adicionado a 100 mL de meio YPD 2% fresco o volume necessário à obtenção de OD_{600} inicial de 0,1/mL. O novo cultivo era mantido a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$, 160 rpm até que a OD_{600} entre 0,7 e 1,5. Ao atingir esta faixa, o volume total de meio de cultivo foi centrifugado a 5000 rpm, por 5 minutos, e o pellet ressuspensão em 25 mL de tampão LiAc/DTT/TE (0,1 M acetato de lítio, 10 mM ditioneitol, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA), por 1 h, a temperatura ambiente. O volume total foi centrifugado a 3000 rpm/ 5 minutos, e o pellet lavado duas vezes com 25 mL de água milli-Q gelada. A terceira lavagem foi feita com 10 mL de solução 1 M Sorbitol. O pellet então foi ressuspensão em 100 μL de 1 M sorbitol.

Para cada transformação, foi usado 40 μL da suspensão de células em sorbitol e 4 μL de cada plasmídeo desejado. A mistura foi então deixada em gelo, por 5 minutos. O volume total (células + plasmídeo) foi transferido para cubeta de eletroporação de 0,2 mm, e com o uso do eletroporador (Gene Pulser Xcell – BioRad), um pulso de 1,5 kV foi aplicado. Imediatamente após o término do pulso magnético, foi adicionado à cubeta 1 mL de meio YPD 2 % gelado, e a mistura incubada à $28\text{ }^{\circ}\text{C}$, 160 rpm, por 2h. Após, o pellet foi coletado por centrifugação a 13000 rpm/5 minutos, e ressuspensão em 100 μL de água destilada estéril, e o volume total plaqueado em meio SD 2% sólido sem adição de leucina ou uracila

(2 % glicose, 2 % ágar, 0,67 % base nitrogenada sem aminoácidos, 0,01% histidina e metionina). As placas foram incubadas à 28 °C, até o surgimento de colônias (aproximadamente 72 h).

4.2.3 Condições de Cultivo

Os estoques das cepas BY4741 e *sod1Δ* foram mantidos em meio sólido YPD 2% (1% extrato de lêvedo, 2% glicose, 2% peptona e 2% ágar) em condições apropriadas para evitar a seleção de *petites* ou supressores. No caso da cepa deletada, este meio de cultivo também continha 0,002% de geneticina.

Os estoques das cepas transformadas (WT, A4V – A4V, G93A – G93A, G93C – G93C, L38V – L38V, WT – A4V, WT – G93A, WT – G93C, WT – L38V) foram mantidos em meio SD 2% sólido (2% glicose, 0,67% base nitrogenada sem aminoácidos, 0,01% requerimentos nutricionais apropriados e 2% ágar).

Para os experimentos, as células foram cultivadas em meio Dropout 2% líquido (2% glicose, 0,67% base nitrogenada sem aminoácidos, 0,2% mistura dropout - Tabela 4), a 28°C, 160 rpm, em frascos preenchidos com meio na proporção 5:1 (frasco/volume).

Tabela 4: Aminoácidos utilizados para a mistura Dropout.

Ácido Aspártico (2,0 g)
Ácido Glutâmico (2,0 g)
Ácido Para-Aminobenzóico (2,0 g)
Adenina (0,5 g)
Alanina (2,0 g)
Arginina (2,0 g)
Asparagina (2,0 g)
Cisteína (2,0 g)
Fenilalanina (2,0 g)
Glutamina (2,0 g)
Glicina (2,0 g)
Histidina (2,0 g)

Inositol (2,0 g)
Isoleucina (2,0 g)
Leucina (10,0 g)
Lisina (2,0 g)
Metionina (2,0 g)
Prolina (2,0 g)
Serina (2,0 g)
Treonina (2,0 g)
Triptofano (2,0 g)
Tirosina (2,0 g)
Uracila (2,0 g)
Valina (2,0 g)

4.2.4 Condição de Envelhecimento

Ao atingirem a metade da primeira fase exponencial, as células foram centrifugadas e então reinoculadas em água destilada estéril durante 24h, a 37°C, 160 rpm, para o envelhecimento cronológico das células.

4.2.5 Análise da Atividade Enzimática

4.2.5.1 Obtenção do Extrato Protéico

Para a medida da atividade Sod, cerca de 50 mg de células foram centrifugadas a 5000 rpm e lavadas duas vezes com água destilada. Após as lavagens as células foram ressuspensas em 500 µL de tampão fosfato de potássio pH 7.8 0,1 mM EDTA, adicionando-se a seguir 1,5 g de pérolas de vidro. Os extratos celulares foram obtidos por 3 ciclos de agitação violenta em vórtex por 1 minuto, intercalados com 1 minuto no gelo. A análise das atividades foi realizada a partir do sobrenadante obtido após a centrifugação a 13000 rpm por 5 minutos (BRASIL et al., 2013; DE SÁ et al., 2013)

4.2.5.2 Dosagem da Concentração Proteica

A determinação da concentração de proteína no extrato de células foi feita utilizando-se o método de Stickland (STICKLAND, 1951). O volume de 100 μ L da amostra foi adicionado a 4,9 mL de H₂O, 0,9 mL de NaOH 20% e 150 μ L de CuSO₄ 25%. A mistura foi homogeneizada, centrifugada e a absorvância do sobrenadante medida a 550 nm. Como padrão, foi utilizada a albumina bovina 10 mg/mL.

4.2.6 Análise da Atividade Superóxido Dismutásica

A análise da atividade superóxido dismutásica foi feita segundo o protocolo de descrito por (FLOHÉ; OTTING, 1984). Neste ensaio a riboflavina foto-oxida o TEMED, gerando radicais O₂^{•-}, que então reduzem o NBT a formazan (PACKER, 2002). Este fato é bastante conveniente para a determinação da atividade Sod, pois descarta a necessidade do uso de outras enzimas para gerarem este radical, além de permitir a localização da Sod em géis de poliacrilamida, quando o ensaio é acoplado à eletroforese.

4.2.6.1 Gel de Resolução e de Empilhamento

A mistura para o gel de resolução 10% nativo foi preparada misturando-se em um recipiente 4 mL de solução estoque de acrilamida-bisacrilamida 30%, 2,25 mL de tampão Tris-HCl 2M pH 8,9, 5,6 mL de H₂O, 12 μ L de TEMED e 120 μ L de solução estoque de persulfato de amônio (PSA) 10%. A mistura foi suavemente agitada e então aproximadamente 8 mL adicionados entre as placas de vidro do sistema de eletroforese vertical Mini-PROTEAN Tetra Cell, da BioRad. Após, o *stacking gel* foi preparado, com 0,534 mL de solução estoque de acrilamida-bisacrilamida 30%, 0,5 mL de tampão Tris-HCl 1M pH 6,8, 2,92 mL de H₂O, 4 μ L de TEMED e 40 μ L de solução estoque de PSA 10%. Quando o gel de resolução se encontrava sólido, foi adicionado a mistura do *stacking gel* e imediatamente após o pente para a criação dos poços. Ao final da polimerização, o gel foi imediatamente usado, ou, se necessário, armazenado a 4°C, envolto

em plástico filme com uma pequena camada de água para evitar o ressecamento.

4.2.6.2 Condições de Eletroforese, Revelação e Quantificação da Atividade

Para a realização da eletroforese, o gel foi submerso em tampão de corrida (25 mM Tris/HCl, 192 mM Glicina, pH 8,3). A 5 μ L de tampão de amostra (125 mM Tris/HCl 1M pH 6,8, 80% glicerol, 0,02% azul de bromofenol) foram adicionados 80 μ g de proteína e, se necessário, o suficiente de H₂O para que atingisse o volume final de 20 μ L (para aplicação no gel). A eletroforese foi feita a temperatura ambiente, 30 mA por gel, durante 1h. Após a eletroforese, o gel foi imerso em uma solução 2,5 mM NBT em 36 mM de tampão KP_i (pH 7,8) por 20 minutos; após, o gel foi imerso em uma solução contendo 86 μ M de riboflavina por 15 minutos, e exposto à luz (BRASIL et al., 2013; DE SÁ et al., 2013; FLOHÉ; OTTING, 1984). Após a reação com a riboflavina, o gel de poliacrilamida foi digitalizado no fotodocumentador EC3 Imaging System da UVP Biomaging Systems, e as bandas de Sod foram analisadas levando-se em consideração a densidade por área com o uso do software UVP Vision Works LS 6.2. A atividade visualizada foi expressa em vezes de aumento com relação à cepa controle.

4.2.7 Análise da Atividade Catalásica

A atividade específica da enzima catalase foi determinada nos extratos celulares conforme determinado no item 4.2.3.1, antes e após o processo de envelhecimento.

A reação foi disparada pela adição de 330 μ L de H₂O₂ 30 mM em uma cubeta contendo 250 μ g de proteína e tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7.0 para completar o volume de 1,0 mL. A curva de progresso foi acompanhada em espectrofotômetro a 240 nm (AEBI, 1984). Uma unidade de atividade catalásica corresponde a degradação de 1 μ mol de H₂O₂ por minuto. Os resultados foram expressos como atividade específica relativa (depois/antes do envelhecimento).

4.2.8 Análise da Viabilidade

A viabilidade das células foi analisada por plaqueamento em meio sólido Dropout 2% antes e após o envelhecimento cronológico. O plaqueamento foi feito após diluições seriadas (diluição final: 1000x) para a contagem das colônias em triplicata. As placas foram incubadas a 28°C por 72h e o número de colônias contado. A porcentagem de células viáveis foi calculada a partir da relação entre o número de colônias obtidas após e antes o processo respiratório (CASTRO et al., 2008).

4.2.9 Peroxidação Lipídica

Para a medida da peroxidação lipídica, 50 mg de células foram centrifugadas a 5000 rpm e lavadas duas vezes com água destilada. Após as lavagens as células foram ressuspensas em 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10%, adicionando-se a seguir 1,5 g de pérolas de vidro. Os extratos celulares foram obtidos por 6 ciclos de agitação violenta em vórtex por 20 segundos, intercalados com 20 segundos no gelo. O sobrenadante foi transferido para microtubo e as pérolas lavadas com 500 µL de TCA 10%, e o sobrenadante transferido para o mesmo microtubo. O extrato final foi obtido após centrifugação a 13000 rpm/5 minutos, recolhendo o sobrenadante em novo microtubo.

O nível de peroxidação lipídica foi determinado pelo método TBARS (STEELS; LEARMONTH; WATSON, 1994). Em um microtubo foram adicionados, seguindo a ordem, 300 µL de extrato proteico, 100 µL de EDTA 0,1 M e 600 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 1,0% em NaOH 0,05 M. Imediatamente após a adição de TBA, a mistura reacional foi incubada a 100 °C por 15 minutos, e interrompida resfriando os microtubos em banho de gelo. A absorvância foi determinada por leitura em espectrofotômetro em 532 nm. Os resultados são expressos em picomoles de malondialdeído (MDA) por miligrama de célula (pmoles MDA/mg cél). A concentração de MDA formado foi determinada pela fórmula a seguir:

$$\text{Concentração de MDA formado} = \frac{(\text{Abs}_{532\text{nm}} \times 11,5 \text{ nmoles MDA} \times 1000)}{[(\text{Abs}_{570\text{nm}} \times 0,4 \times 100) \times 4,9 \times 0,3]}$$

4.2.10 Proteína Carbonilada

Para a medida da proteína carbonilada foi utilizado o mesmo protocolo de extrato de proteínas descrito acima (Item 4.2.3.1 e 4.2.3.2, página 62). Após quantificação de proteínas, os extratos foram diluídos para a concentração de 0,1 mg de proteína/mL.

A membrana de nitrocelulose úmida com tampão fosfato de potássio pH 7.8 0,1 mM EDTA foi colocada sobre o suporte para filtragem a vácuo, e 200 µL de solução 0,1 mg de proteína/mL adicionada ao poço. Após aplicação do vácuo, a membrana foi incubada com 0,1 mg DNPH/mL (2N HCl) por 5 minutos. Em seguida, a membrana foi lavada (3 x 5 minutos) com HCl para remoção do DNPH não reagido. A membrana foi então lavada com tampão fosfato de potássio e incubada em solução bloqueadora (5% de leite em pó desnatado, 0,02% Tween 20, 0,02% azida sódica) por 24h.

No dia seguinte, a membrana foi incubada com 30 mL de solução bloqueadora fresca com 15 µL de anti-DNP por 2h a temperatura ambiente com agitação suave. A membrana foi lavada com tampão fosfato de potássio (3 x 5 minutos) e incubada em solução bloqueadora fresca contendo 15 µL de anticorpo secundário por 1h, a temperatura ambiente, com agitação suave.

Após, a membrana foi lavada com tampão Tris-Cl 10 mM pH 7.5. Para a revelação, a membrana foi incubada em solução com 6 mg de diaminobenzidina tetrahidrocloreto em 9 mL de Tris-Cl (10 mM pH 7.5). A essa solução foi adicionado 1 mL de CoCl_2 . Então, adicionado também 10 µL de H_2O_2 30% no escuro, até o aparecimento das bandas, quando a solução foi removida, a membrana lavada com água destilada e armazenada em tampão fosfato de potássio.

4.2.11 Expressão da hSod1 por Western Blot

4.2.11.1 Gel de Resolução e Empilhamento

Os géis foram preparados seguindo o mesmo protocolo descrito no item 4.1.5.2.

4.2.11.2 Condições de Eletroforese

As condições de eletroforese utilizadas foram as mesmas descritas no item 4.1.

4.2.11.3 Transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose, bloqueio dos sítios livres da membrana, incubação com anticorpo primário e secundário, revelação da membrana e análise da imagem

Após o término da eletroforese, o gel e a membrana de nitrocelulose (Molecular Probes) foram incubados por aproximadamente 5 minutos em tampão de transferência gelado (0,25 M Tris, 0,192 M Glicina, 20% Metanol, pH 8.3). As proteínas foram transferidas do gel para a membrana com o auxílio do tampão de transferência e do sistema de suporte contendo adaptador para blotting, onde o gel e a membrana eram inseridos entre dois papéis de filtro e duas esponjas. Ao fim da montagem do sistema, este foi inserido em cuba de eletroforese preenchida com tampão de transferência, por 2h, a 200 mA e 2V. Após o término da transferência, a membrana foi então mantida em solução bloqueadora de BSA 3% em TBS-Tween *overnight*.

As etapas de incubação com anticorpo primário, secundário, revelação da membrana e análise da imagem foram feitos conforme o item 4.1.6.

4.2.12 Detecção da formação de aglomerados de hSod1

4.2.10.1 Microscopia de Fluorescência

Aproximadamente 2 mL da cultura celular foram coletados, centrifugados a 5000 rpm/5 minutos e o pellet recolhido ressuspenso em 200 μ L de água destilada. Para o preparo da lâmina foram adicionados na lâmina 1 μ L da solução de n-propilgalato, 1 μ L da suspensão celular e 1 μ de 4'-6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (1:10000) (v/v), que foi então coberta por uma lamínula. As imagens foram obtidas em microscópio Olympus IX73 (câmera DP73), com objetiva de 100x com óleo de imersão.

Para cada resultado, ao menos 50 células por cepa e condição foram contadas, e ranqueadas conforme três grupos: células sem inclusão, cinco

inclusões ou menos (≤ 5 inclusões) e mais de cinco inclusões (> 5 inclusões) (BRASIL et al., 2017; LÁZARO et al., 2014).

4.3 ANÁLISE DE DADOS E ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados utilizando-se o software Graph Pad Prism 7 (San Diego, California, EUA) e foram expressos em valores médios \pm desvio padrão (SD) de ao menos três experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram calculadas utilizando-se *one way* ou *two-way* ANOVA com correção de Bonferroni. A significância foi avaliada e um asterisco (*) corresponde a $p < 0,05$, dois asteriscos (**) correspondem a $p < 0,01$ e três asteriscos (***) correspondem a $p < 0,001$.

5. RESULTADOS

5.1 HETERODÍMEROS HSOD1 RELACIONADOS À ELAF AFETAM O PERFIL DAS INCLUSÕES EM CÉLULAS H4

Verificamos que os heterodímeros formados por WT hSod1 e mutante hSod1 em todos os mutantes testados formaram dímeros e oligômeros, além de inclusões em células H4 (Figura 15 e Figura 16).

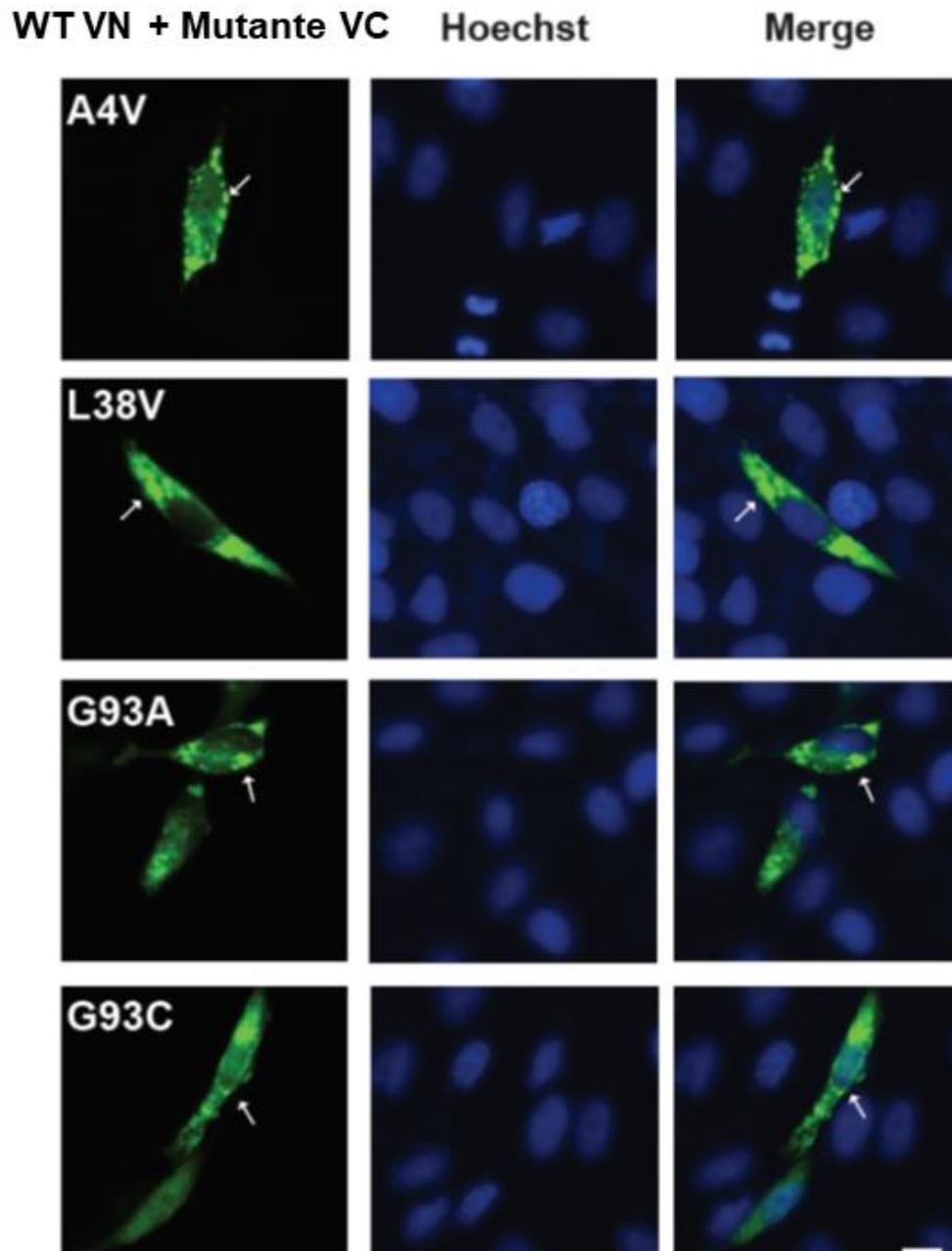


Figura 15: Figuras representativas das células expressando os heterodímeros hSod1 mutantes relacionados à ELAf. Células H4 expressando WT (VN-hSod1) e mutante (hSod1-VC) (A4V, L38V, G93A ou G93C) foram analisadas por microscopia de fluorescência. Os agregados de hSod1 estão apontados por setas brancas. Escala: 10 μ M.

Nas células que expressam o homodímero da hSod1 WT as inclusões não foram detectadas (Figura 16).

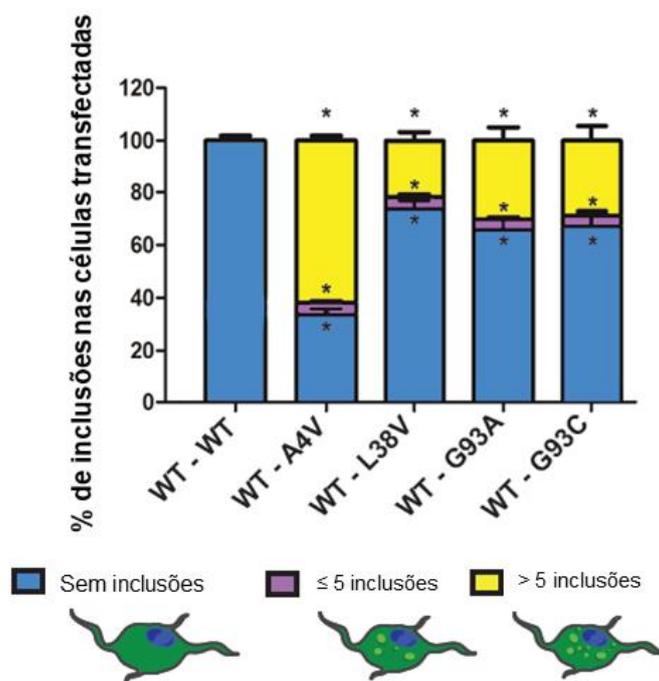


Figura 16: Quantificação do número de agregados por células. Ao menos 50 células transfectadas por condição foram contadas e classificadas em três grupos diferentes. A barra azul representa a porcentagem de células sem inclusões; a barra roxa, a porcentagem de células com 5 inclusões ou menos; a barra amarela, porcentagem de células com mais de cinco inclusões. Os dados foram combinados de pelo menos três experimentos independentes.

Embora as inclusões formadas pelos diferentes mutantes tenham apresentado tamanhos e formas semelhantes, o número de inclusões por célula foi variável. Para a forma heterodimérica hSod1WT–A4V, aproximadamente 60% das células apresentaram inclusões. Para os outros mutantes, esse percentual foi de aproximadamente 20%. Além disso, o padrão também é diferente, com a mutação A4V formando mais inclusões (> 5 inclusões, barra amarela) do que os outros mutantes. Os níveis de mutantes A4V e L38V (aproximadamente 1 U.A.) foram idênticos, exceto os de G93A e de G93C (aproximadamente 0,4 U.A.), sugerindo que esses mutantes podem ser ainda mais instáveis (Figura 17).

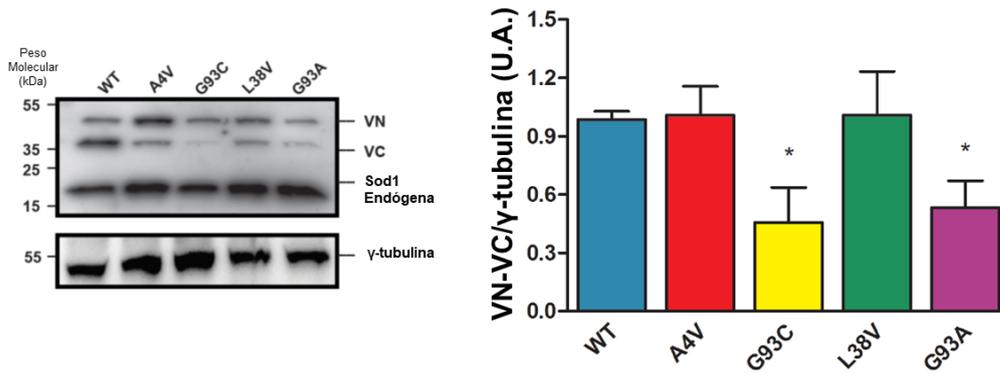


Figura 17: Western Blot representativo da expressão da hSod1. Na figura da esquerda, imunoblot representativo confirmando a expressão de ambos os fragmentos VN-hSod1 e hSod1-VC. Na figura da direita, quantificação dos imunoblots. Os dados foram expressos como a média \pm SD de pelo menos três replicatas. Para a análise estatística foi utilizada *one-way* ANOVA com correção de Bonferroni, com nível de significância de $p < 0,05$ representado por (*); (*) representa resultados estatisticamente diferentes entre a mutante hSod1 e WT hSod1.

5.2 A MUTAÇÃO A4V RELACIONADA COM ELAF AFETA A DINÂMICA INTRACELULAR DE INTERAÇÕES HSOD1

A estabilidade de inclusões de heterodímeros de Sod1 relacionadas à ELAf foi avaliada por FRAP, um experimento que avalia a dinâmica de formação de inclusões de hSod1 pela religação de proteínas intactas no local adjacente (Figura 18).

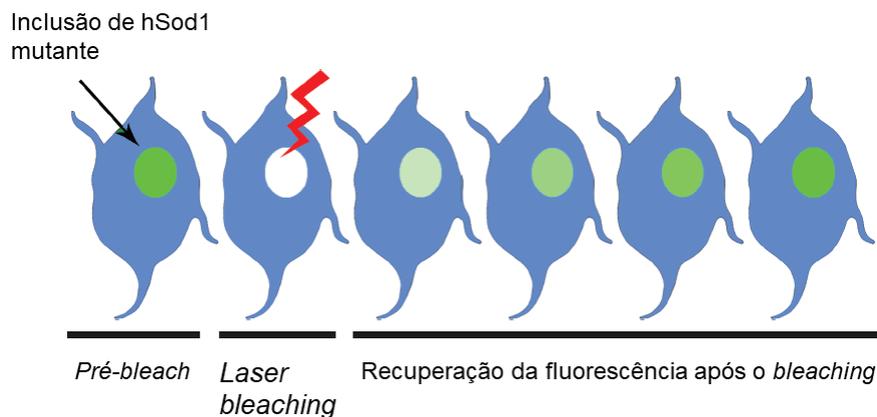


Figura 18: Ilustração esquemática de FRAP em uma inclusão de interesse.

Foi descoberto que a mutação A4V exibiu o maior tempo de meia vida ($t_{1/2}$) de recuperação de fluorescência ($24,91 \pm 4,90$), enquanto os outros

mutantes exibiram valores semelhantes (L38V: $4,71 \pm 1,00$; G93A: $4,07 \pm 1,08$; G93C: $5,26 \pm 1,80$) (Figura 19 e Figura 20). Isso indica que as inclusões de A4V são menos lábeis do que aquelas formadas pelas variantes L48V, G93A e G93C, que mostraram uma recuperação mais rápida após a fotodegradação.

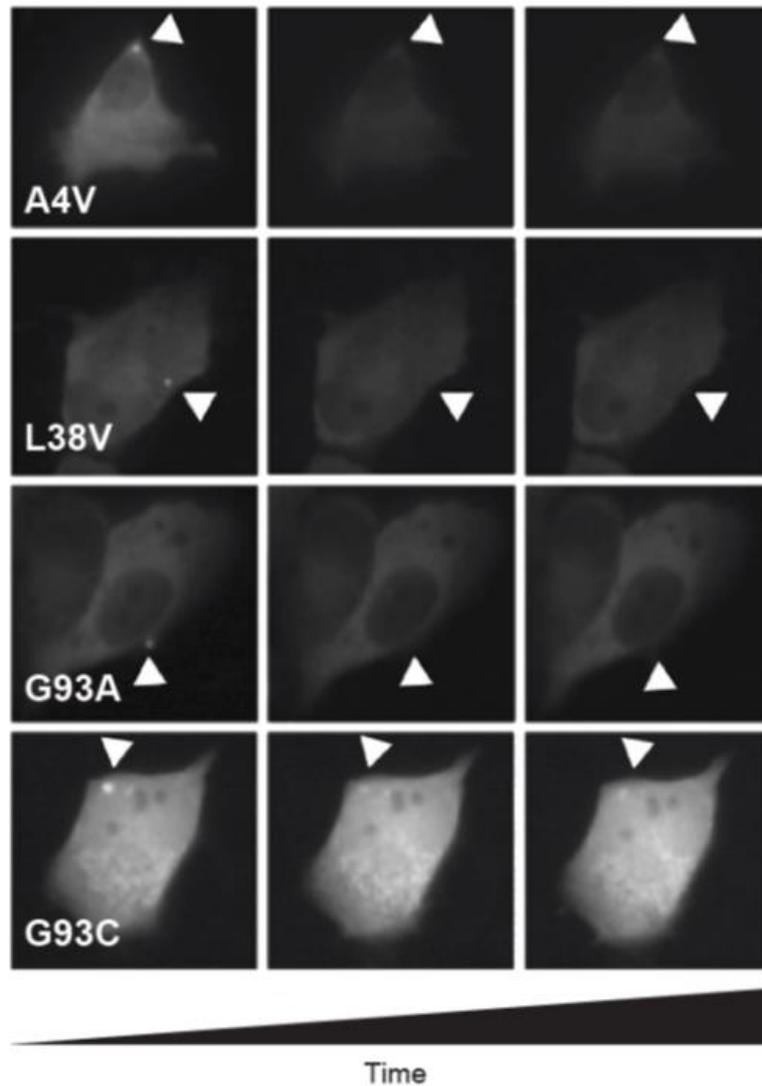


Figura 19: Imagens representativas de uma célula expressando uma inclusão. No painel, da esquerda para a direita, inclusão de heterodímeros antes do *bleaching*, imediatamente após o *bleaching* e no final da aquisição de imagens.

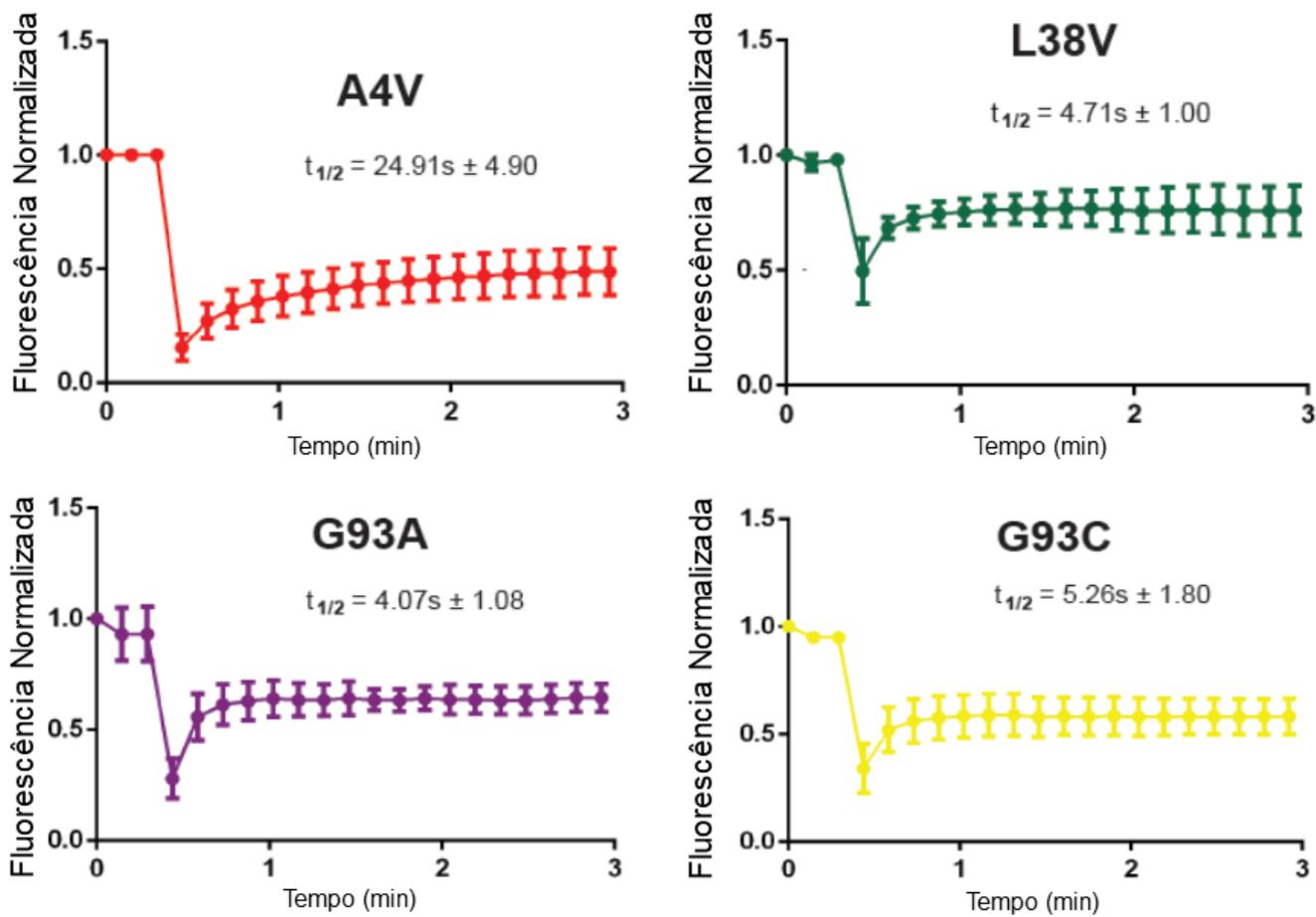


Figura 20: Curvas de recuperação de fluorescência para os heterodímeros. Para cada mutação, ao menos seis inclusões em diferentes células foram analisadas. Cada gráfico representa a média \pm SD para cada *time point* para todos os experimentos.

5.3 HETERODÍMEROS MUTANTES DE HSOD1 MOSTRAM ATIVIDADE DISMUTÁSICA REDUZIDA QUANDO COMPARADOS AOS HOMODÍMEROS EM CÉLULAS DE LEVEDURA ENVELHECIDAS CRONOLOGICAMENTE

As células de levedura são muito utilizadas como modelo para elucidar os mecanismos moleculares subjacentes às doenças neurodegenerativas (ELEUTHERIO et al., 2018; KHURANA; LINDQUIST, 2010), sendo bastante valiosas também para o estudo da resposta ao estresse oxidativo (OLIVEIRA et al., 2017). As células de levedura que crescem exponencialmente só obtêm energia por fermentação e, conseqüentemente, produzem baixos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs). Os níveis de EROs são aumentados em

células envelhecidas cronologicamente (BRASIL et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2017).

Para abordar a funcionalidade dos heterodímeros de hSod1 mutantes relacionados à ELAf, como já explicitado, foi feita a expressão de uma cópia de hSod1 WT ou mutante-VN juntamente com outra cópia do mutante hSod1-VC, para avaliar o efeito da hSod1 na ausência da Sod1 endógena de levedura (*ySod1*). Em primeiro lugar, foi confirmada a expressão da Sod1 humana fusionada aos fragmentos VN ou VC da proteína Vênus, utilizando-se um anticorpo contra hSod1 (Figura 21), tanto antes como depois do envelhecimento cronológico. Em seguida, foi investigado o efeito do envelhecimento cronológico na atividade do mutante hSod1 após a formação de homo ou heterodímeros. O envelhecimento, por si só, não aumentou a atividade da hSod1 WT. No entanto, células *sod1Δ* expressando os homodímeros mutantes A4V, G93A e G93C mostraram um aumento significativo na atividade dismutásica após o envelhecimento (Figura 22). Curiosamente, a atividade de hSod1 A4V, G93A e G93C mostrou-se menor após o envelhecimento, quando comparada com os homodímeros e com a atividade relativa da hSod1 WT. O envelhecimento cronológico não alterou a atividade L38V.

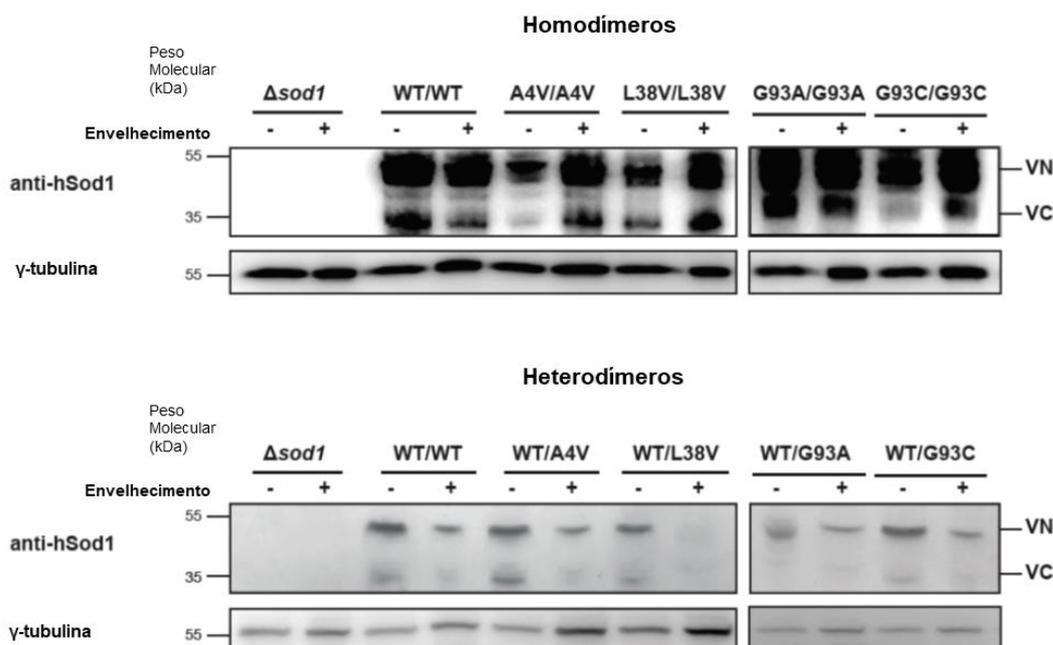


Figura 21: A expressão dos mutantes homo e heterodímeros afeta a expressão da hSod1 em células de levedura envelhecidas cronologicamente. Imunoblot representativo

confirmando a expressão dos fragmentos VN-Sod1 e Sod1-VC em células de levedura, ambos antes e depois da condição de envelhecimento cronológico.

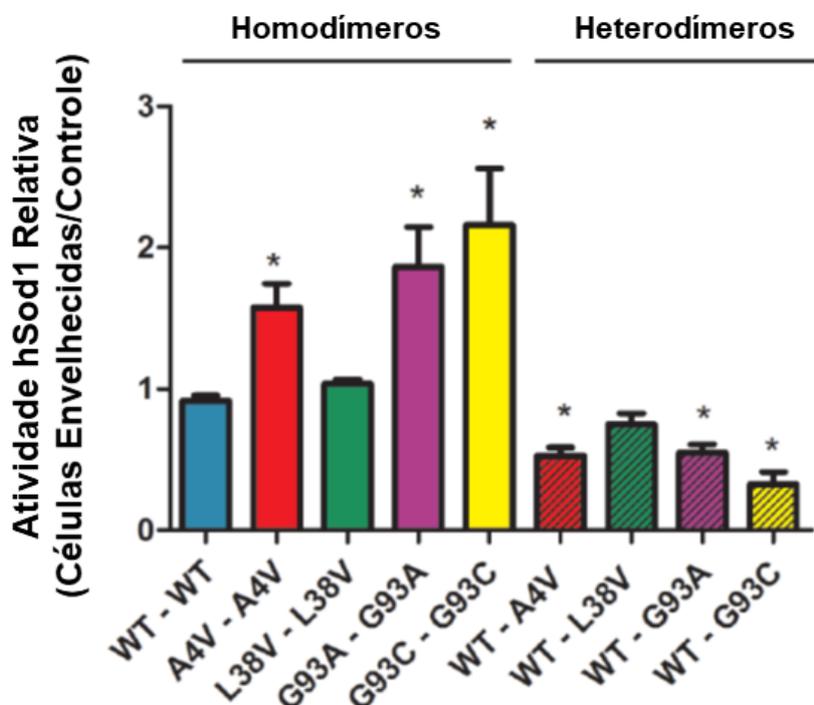


Figura 22: A expressão dos mutantes homo e heterodímeros afeta a atividade da hSod1 em células de levedura envelhecidas cronologicamente. Atividade superóxido dismutásica foi avaliada em células *sod1Δ* expressando hSod1 em fase exponencial de crescimento, antes e depois do envelhecimento cronológico. Os valores representam a média \pm SD de pelo menos três experimentos independentes e representam a razão de atividade hSod1 entre células de levedura envelhecidas e não-envelhecidas. * representa resultados estatisticamente diferentes entre a mutante hSod1 e WT hSod1. As barras coloridas representam os homodímeros mutantes, e as barras hachuradas coloridas representam os heterodímeros mutantes.

5.4 A EXPRESSÃO DOS HETERODÍMEROS HSOD1 MUTANTES DIMINUEM A VIABILIDADE CELULAR EM LEVEDURA

A fim de serem avaliadas como as diferenças na atividade Sod1 entre homo e heterodímeros poderiam afetar a viabilidade de células de levedura que expressam hSod1 após o envelhecimento, foram determinadas as viabilidades das células após o envelhecimento cronológico.

Foi visto que 44,9% das células *sod1Δ* permaneceram viáveis após o envelhecimento (Figura 23). A superexpressão de hSod1 WT no *background sod1Δ* fez com que a viabilidade celular aumentasse consideravelmente, para 90%, confirmando a sobreposição funcional entre as proteínas de levedura e humana. Surpreendentemente, a expressão dos heterodímeros mutantes reduziu fortemente a porcentagem de células viáveis após o envelhecimento. A viabilidade das células que expressam os heterodímeros mutantes foi idêntica à das células *sod1Δ*, sugerindo que estes heterodímeros, de algum modo, ficam prejudicados funcionalmente.

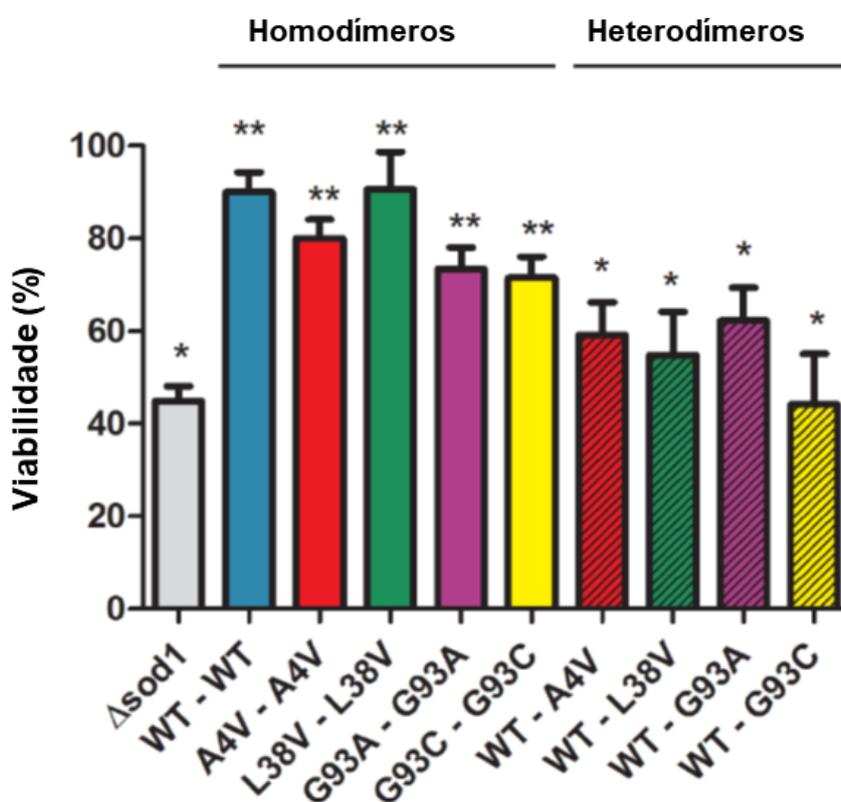


Figura 23: A expressão dos heterodímeros mutantes diminui a viabilidade celular após 24h de envelhecimento. Células de levedura sem Sod1 (*sod1Δ*) assim como expressando hSod1 (WT e mutante) foram coletadas em fase exponencial de crescimento e envelhecidas in água (condição não-proliferativa) a 37 °C por 24h. A viabilidade celular foi determinada por contagem de células plaqueadas em meio Dropout 2% e expressa como porcentagem de células viáveis. As barras hachuradas e não-hachuradas representam os heterodímeros e homodímeros mutantes, respectivamente. O resultado representa a média \pm SD de pelo menos três experimentos independentes. * representa resultados estatisticamente diferentes entre *sod1Δ* ou mutante hSod1 comparado à WT hSod1. ** representa resultados estatisticamente diferentes

entre as células de levedura recombinante expressando hSod1 em comparação com a respectiva cepa não-recombinante, *sod1Δ* (WT ou mutante hSod1 vs. *Sod1Δ*).

5.5 OS HETERODÍMEROS HSOD1 MUTANTES AUMENTAM OS DANOS INDUZIDOS POR EROS

Para determinar se a viabilidade e a atividade hSod1 reduzida em células expressando os heterodímeros mutantes estavam relacionadas a uma resposta ineficiente ao estresse oxidativo, foram medidos os níveis de MDA (marcador de peroxidação lipídica) e de proteínas carboniladas (marcador de oxidação proteica).

Foi visto então que a expressão de todos os heterodímeros de hSod1 mutantes aumentou de forma significativa a peroxidação lipídica (Figura 24) e a carbonilação de proteínas (Figura 25).

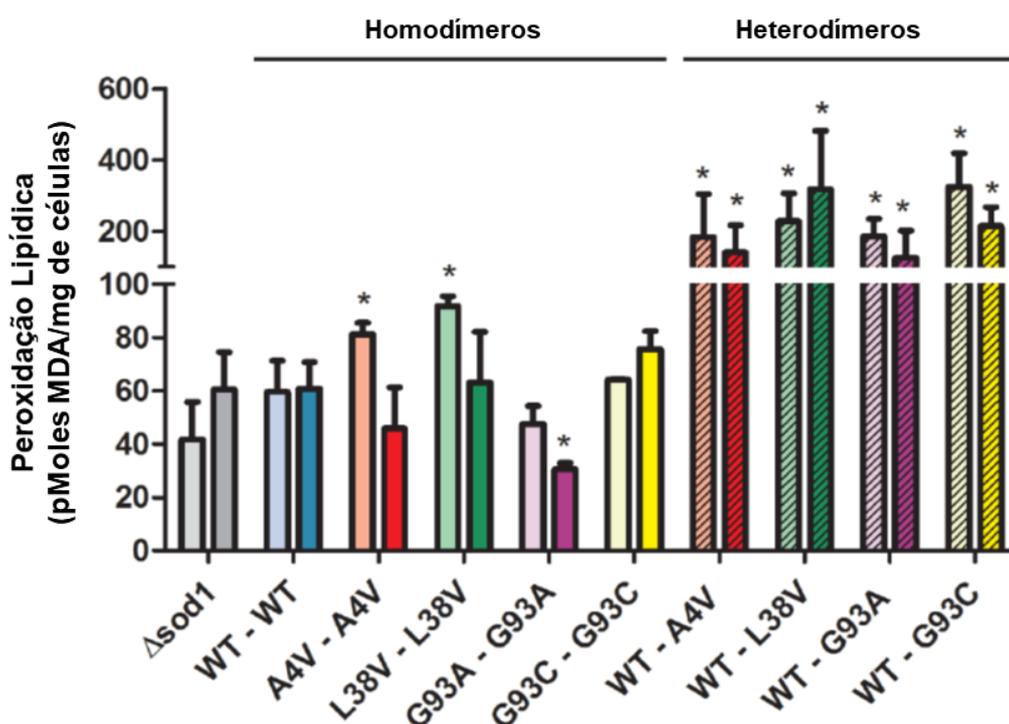


Figura 24: A heterodimerização da hSod1 WT e mutante ELAf aumenta de forma significativa a peroxidação lipídica em células envelhecidas cronologicamente. A peroxidação lipídica foi determinada em células *sod1Δ* expressando WT ou os homo- e heterodímeros, antes e depois do envelhecimento. Os mutantes heterodímeros estão representados pelas barras hachuradas no lado direito do gráfico. A peroxidação lipídica está expressa em pMoles de MDA/mg de célula. Como controle, foram determinados os níveis de

MDA em células não-envelhecidas (barras de cor clara) de todas as cepas. O resultado após o envelhecimento está representado pelas barras de cor escura. * representa resultados estatisticamente diferentes entre homo- e heterodímeros não envelhecimentos com relação à cepa WT hSod1 não envelhecida (mutante hSod1 x WT hSod1), ou mutantes com hSod1 WT após o envelhecimento.

Surpreendentemente, a expressão dos homodímeros de hSod1 mutantes (A4V, L38V e G93A) reduziu os níveis de peroxidação lipídica após o envelhecimento. A4V e G93C também reduziram a carbonilação de proteínas. Isto sugere que os diferentes mutantes hSod1 podem influenciar a resposta ao estresse oxidativo de diferentes maneiras, e que a toxicidade associada com a formação de heterodímeros hSod1 pode ser induzida por modificações oxidativas que ocorrem em células de levedura envelhecidas.

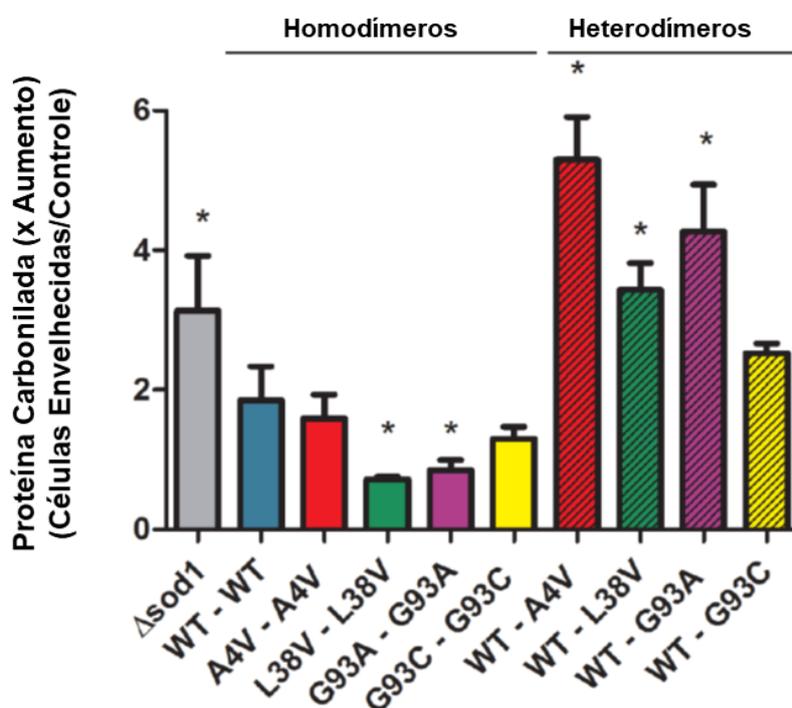


Figura 25: A heterodimerização da hSod1 WT e mutante ELAf aumenta de forma significativa os níveis de proteína carbonilada em células envelhecidas cronologicamente. Os níveis de proteína carbonilada foram determinados em células *sod1* Δ expressando WT ou os homo- e heterodímeros, antes e depois do envelhecimento. Os mutantes heterodímeros estão representados pelas barras hachuradas no lado direito do gráfico. O aumento nos níveis de proteína carbonilada foram medidos pela razão entre o conteúdo de carbonilas proteicas detectadas em células envelhecidas com relação aos níveis apresentados nas células não-envelhecidas. O resultado representa a média \pm SD de pelo menos três resultados independentes. * representa resultados estatisticamente diferentes entre os mutantes homo- ou heterodímeros com relação à WT hSod1 (mutante hSod1 vs. WT hSod1).

5.6 O ENVELHECIMENTO INDUZ A FORMAÇÃO DE INCLUSÕES DE HSOD1 EM CÉLULAS DE LEVEDURA

Em seguida, foi investigado se os danos oxidativos causados pelo envelhecimento cronológico poderiam desencadear a formação de inclusões de hSod1 em células de levedura que expressam os homo e heterodímeros mutantes. A cepa *sod1Δ* expressando os homo e heterodímeros, em fase de crescimento exponencial, não demonstrou inclusões visíveis (Figura 26). Em contraste, as células de levedura cronologicamente envelhecidas expressando ambos os dímeros exibiram inclusões visíveis.

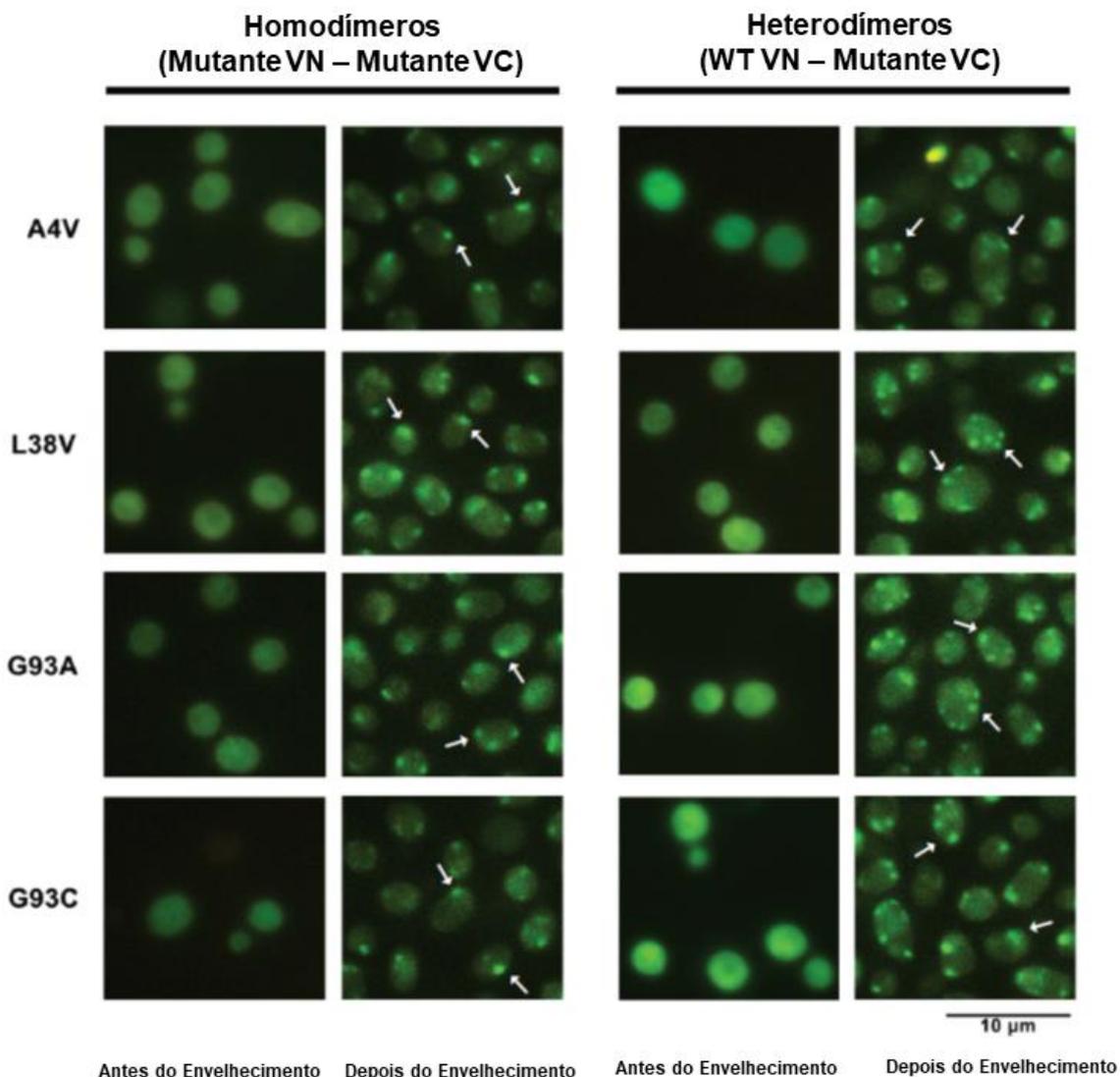


Figura 26: O envelhecimento cronológico induz a formação de inclusões citoplasmáticas nos mutantes hSod1. Imagens representativas mostrando a localização dos mutantes hSod1

em células de levedura por microscopia de fluorescência, antes e depois do envelhecimento. As setas brancas indicam as inclusões de hSod1. Escala: 10 μ M.

A fim de dissecar o efeito de cada um dos mutantes testados na formação da inclusão, foi quantificada a porcentagem de inclusões dentro das células (Figura 27). Neste contexto, cerca de 50% das células de levedura envelhecidas que expressam os homodímeros de hSod1 A4V apresentaram múltiplas inclusões, enquanto os outros mutantes apresentaram menos de 40%. Curiosamente, foi descoberto ainda que a heterodimerização de WT com A4V, L38V, G93A ou G93C induziu a formação de um maior número de inclusões por célula após o envelhecimento. Além disso, o número de agregados de hSod1 aumentou significativamente em heterodímeros de A4V, que exibiram 80% de células envelhecidas com inclusões. Para as outras mutações, aproximadamente 30% e 40% das células expressando homo e heterodímeros, respectivamente, apresentaram inclusões. Em conjunto, os resultados destacam que o estresse oxidativo (como o ocorrido no envelhecimento cronológico) aumenta a susceptibilidade dos heterodímeros de hSod1 a agregação.

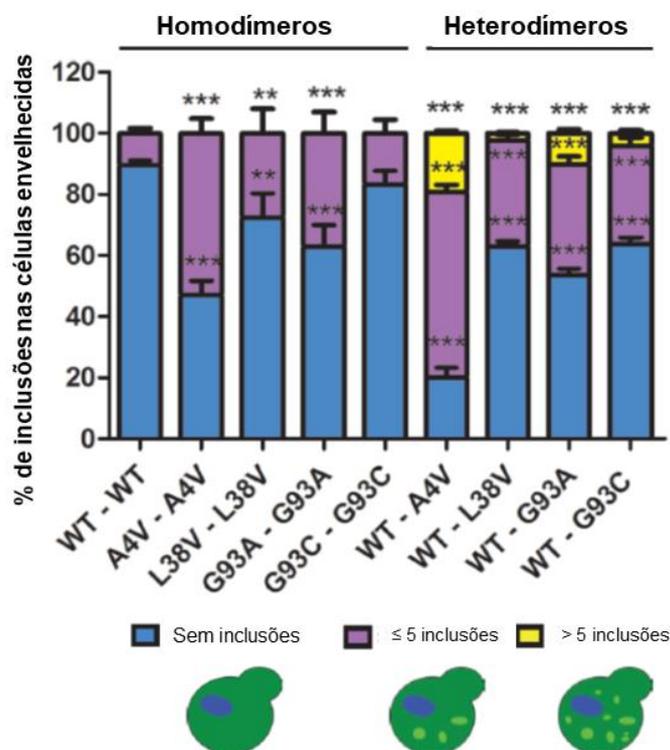
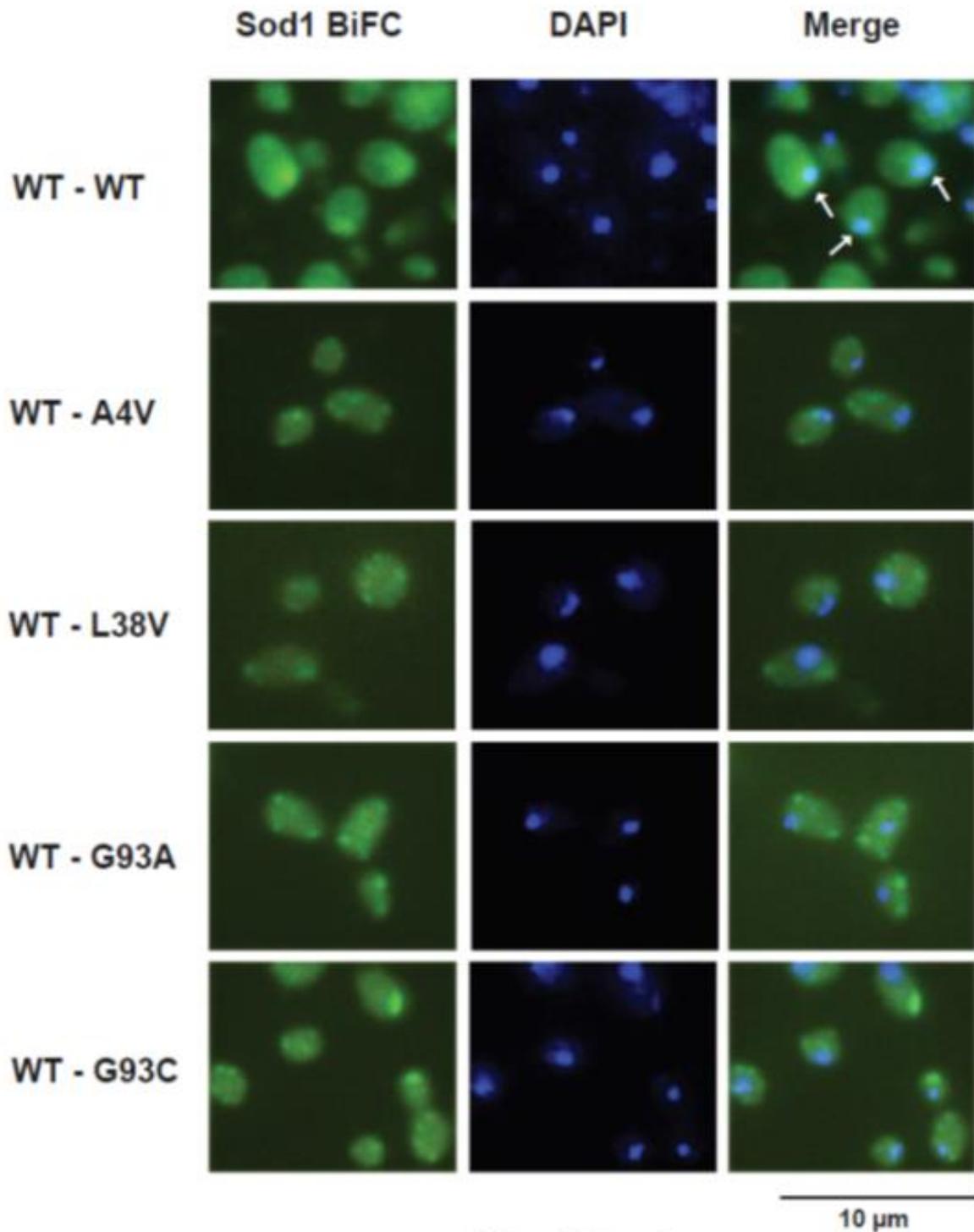


Figura 27: O envelhecimento cronológico induz a formação de inclusões citoplasmáticas nos mutantes hSod1. Quantificação do número de inclusões por célula. Ao menos 50 células

por condição foram contadas e organizadas nos três grupos descritos. A barra azul representa a porcentagem de células sem nenhuma inclusão; a barra roxa, com cinco inclusões ou menos; a barra amarela, células com mais de cinco inclusões. *** resultados estatisticamente diferentes com nível de significância $p < 0,001$ (WT vs. Mutantes). ** resultados estatisticamente diferentes entre WT vs. Mutantes com nível de significância de $p < 0,01$. Os dados foram combinados de pelo menos três experimentos independentes.

5.7 MUTAÇÕES HSOD1 PREJUDICAM A LOCALIZAÇÃO NUCLEAR DA SOD1 EM RESPOSTA AO ENVELHECIMENTO

Assim, em seguida, foi investigada a sublocalização celular de hSod1 WT e heterodímeros mutantes no envelhecimento cronológico. De fato, foi descoberto que a hSod1 WT se localiza no núcleo após o envelhecimento cronológico. Em contraste, os heterodímeros mutantes permanecem no citoplasma como inclusões pequenas e redondas (Figura 28).



Após 24h de envelhecimento

Figura 28: A localização nuclear da Sod1 é prejudicada pela presença das mutações relacionadas à ELAf após o envelhecimento. Heterodímeros hSod1 WT e mutantes foram analisados por microscopia de fluorescência após o envelhecimento. As inclusões de Sod1 foram visualizadas pela expressão da Sod1 tagueada com BiFC (verde) e o núcleo está corado em azul (DAPI). As setas indicam a colocalização da hSod1 com o núcleo, processo induzido pelo envelhecimento. Escala: 10 μ m.

A porcentagem de células hSod1 WT com localização proeminente no núcleo foi de 81,3%, contrastando com uma média de apenas 2,5% em células expressando hSod1 mutante (Figura 29).

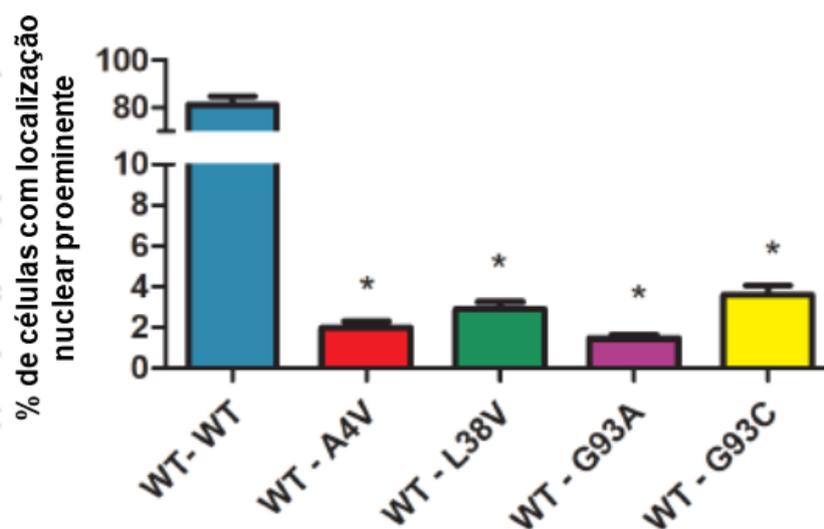


Figura 29: A localização nuclear da Sod1 é prejudicada pela presença das mutações relacionadas à ELAf após o envelhecimento. Porcentagem de células com Sod1 localizada no núcleo. As barras de erro indicam \pm SD de triplicatas de pelo menos 50 células contadas por replicata. * resultados estatisticamente diferentes entre os heterodímeros mutantes comparados à WT hSod1.

Para avaliar se a ausência de heterodímeros hSod1 no núcleo poderia ser prejudicial para a atividade antioxidante, foi medida a atividade da catalase (Ctt1) em células de levedura envelhecidas e não-envelhecidas expressando o heterodímero hSod1 mutante. A cepa controle BY4741, que expressa a Sod1 de levedura, mostrou um aumento de três vezes na atividade de Ctt1 após o processo de envelhecimento (Figura 30). A expressão de hSod1 WT duplicou a atividade de Ctt1 em células envelhecidas, sugerindo que a localização nuclear de Sod1 realmente promoveu a indução da resposta antioxidante, supondo-se que à nível genético, induzindo a expressão de genes envolvidos na resistência a EROs, como o CTT1, como já descrito na literatura (TSANG et al., 2015).

Em contraste, as células que expressam heterodímeros de hSod1 mutantes mostraram reduzida atividade de Ctt1, o que sugere que a presença de inclusões formadas pelo mutante hSod1 no citoplasma dificulta a

translocação da proteína para o núcleo, levando a uma resistência ineficiente a EROs geradas pelo envelhecimento cronológico.

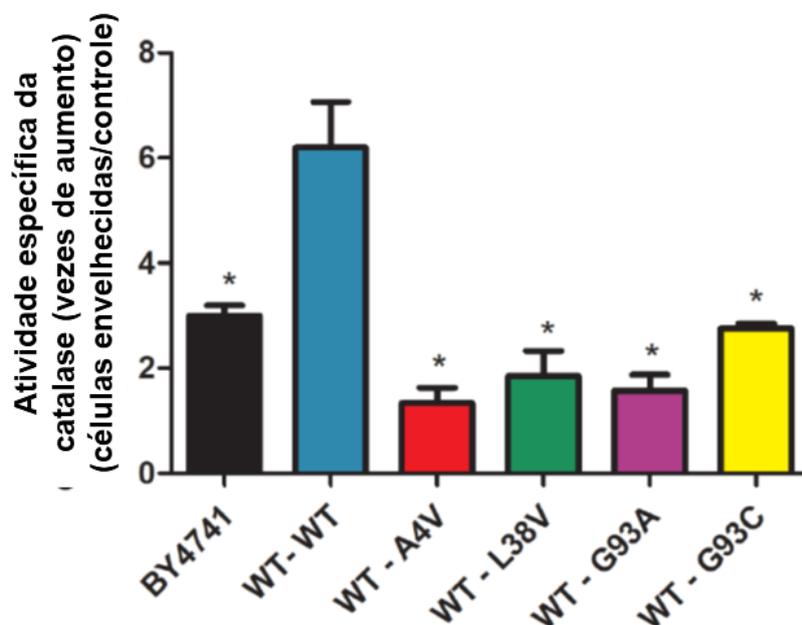


Figura 30: Atividade catalase nos heterodímeros. A atividade catalase foi expressa em vezes de aumento com relação a atividade específica (U/mg de proteína) após o envelhecimento cronológico. Uma unidade (U) de atividade é definida como a quantidade de enzima que catalisa a conversão de 1 mmol de H_2O_2 em 1 minuto sob condições reacionais do experimento. Os resultados representam a média \pm SD de pelo menos três experimentos independentes. * representa resultados significativamente diferentes entre WT vs. mutantes com $p < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

Redes complexas de proteínas estão envolvidas em quase todos os processos celulares. Para descobrir essas vastas redes de interação entre proteínas várias tecnologias de triagem de alto rendimento já foram desenvolvidas. Na última década, o ensaio de *bimolecular fluorescence complementation* (BiFC), em português complementação bimolecular de fluorescência, vem sendo amplamente utilizada para detectar interações proteína-proteína (PPIs, do inglês *protein-protein interactions*) em células vivas. Esta técnica baseia-se na reconstituição de uma proteína fluorescente *in vivo* (MILLER et al., 2015). O ensaio de BiFC é baseado na associação entre dois

fragmentos não-fluorescentes de uma proteína fluorescente quando estes são aproximados um do outro por uma interação entre proteínas fundidas aos fragmentos. Inúmeras interações de proteínas já foram visualizadas usando o ensaio BiFC em diversos tipos de células e organismos, uma vez que é um ensaio tecnicamente simples, que pode ser realizado utilizando biologia molecular e reagentes de cultura de células e um microscópio de fluorescência regular ou citômetro de fluxo (KERPPOLA, 2008). Usando o BiFC, foi investigada a formação de heterodímeros entre as formas WT e mutantes da proteína Sod1, sendo estas mutações relacionadas à ELAf. De forma curiosa, a quantificação das inclusões formadas pelos heterodímeros demonstrou que estes têm uma maior propensão a formar agregados do que os homodímeros mutantes de Sod1, como já mostrado na literatura (BRASIL et al., 2017). A porcentagem aumentada de células com inclusões heterodiméricas WT-A4V é consistente com os dados de FRAP apresentados, demonstrando que a mutante A4V formou inclusões mais estáveis quando comparado com as outras variantes Sod1 ELAf. Assim, é formulada a hipótese que as inclusões formadas pelos heterodímeros mutantes podem estar relacionadas à toxicidade das mutações de Sod1 relacionadas à ELAf. Em um estudo anterior também usando FRAP para investigar as inclusões formadas por mutantes de Fus, TDP-43 e Sod1-GFP, foi visto que as propriedades de difusão de Fus e TDP-43 foram diferentes de forma significativa daquelas formadas por Sod1 A4V, que apresentou um componente de difusão rápida (FARRAWELL et al., 2015). Em contraste, as medidas de FRAP dos heterodímeros hSod1 A4V revelaram que estas espécies possuem uma difusão muito mais lenta do que as outras espécies, o que é consistente com o dado de inclusões mais estáveis.

Diversos estudos utilizando modelos de envelhecimento replicativo e cronológico sugerem que na patogênese da ELAf há prejuízo da resposta ao estresse oxidativo (BRASIL et al., 2013, 2017; KIM et al., 2015; PELED-KAMAR et al., 1997). Com relação especificamente ao envelhecimento cronológico, leveduras e células humanas, como os neurônios, compartilham várias semelhanças (ARLIA-CIOMMO et al., 2014; KAEBERLEIN, 2010; LONGO et al., 2012; LONGO; FABRIZIO, 2012). Dadas as notáveis vantagens de se utilizar levedura como modelo para investigar a resposta ao estresse oxidativo do mutante hSod1, o sistema BiFC foi utilizado para estudar a atividade e a

funcionalidade de heterodímeros de hSod1 mutantes de WT em células de levedura cronologicamente envelhecidas sem ySod1 (*sod1Δ*). Foi descoberta que a atividade dos homodímeros mutantes hSod1 aumentou com o envelhecimento. Por outro lado, a formação de heterodímeros mutantes dismutasicamente ativos foi reduzida em células de levedura envelhecidas. Embora seja considerado que as mutações de Sod1 associadas à ELAf aqui estudadas se comportem como *wild type like* (HAYWARD et al., 2002; RODRIGUEZ et al., 2002), o estresse oxidativo induzido pelo envelhecimento cronológico modula a atividade de hSod1, revelando um efeito diferente. Anteriormente já foi sugerido que os dímeros de WT hSod1 enzimaticamente ativos poderiam contribuir para a toxicidade causada pela presença da mutação ligada à ELAf (WEICHERT et al., 2014). De fato, a atividade reduzida de Sod1 dos heterodímeros mutantes se correlacionou com as taxas de viabilidade celular, que mostraram uma porcentagem estatisticamente menor de células viáveis após o envelhecimento cronológico, quando em comparação com hSod1 WT. De forma contrária, os homodímeros hSod1 WT e mutantes altamente ativos aumentaram de forma considerável a vida útil quando em comparação com *sod1Δ*, sugerindo que a homodimerização mutante fornece benefícios mesmo após 24h de envelhecimento cronológico. Além disso, os heterodímeros mutantes, mas não os homodímeros, mostraram taxas de viabilidade semelhantes às células de controle *sod1Δ*. Curiosamente, nem a proteína WT nem nenhuma das mutações ELAf atualmente modeladas em levedura demonstram qualquer defeito severo de crescimento (BASTOW et al., 2016; BASTOW; GOURLAY; TUIE, 2011; CORSON et al., 1998; HOUGH et al., 2004; NISHIDA; GRALLA; VALENTINE, 1994; RABIZADEH et al., 1995). Assim, estudos em *S. cerevisiae* cronologicamente envelhecida têm descoberto com sucesso diversos aspectos subjacentes à atividade da hSod1, bem como da longevidade celular sob a expressão de mutante hSod1 (homo e heterodímeros) ligados à ELAf. Neste estudo, a presença de todos os heterodímeros mutantes aumentou fortemente a peroxidação lipídica antes e após o envelhecimento cronológico. Além disso, os níveis relativos de proteínas carboniladas foram dramaticamente aumentados nos heterodímeros mutantes com relação aos níveis de WT, especialmente para as mutações A4V, G93A e L38V. Desse jeito, os resultados endossam as evidências acumuladas em modelos de animais e

leveduras que mostraram um aumento na peroxidação lipídica, bem como nas carbonilações proteicas com a idade (DA CUNHA; DEMASI; KOWALTOWSKI, 2011; SOHAL; SOHAL; ORR, 1995; YOUNGMAN; PARK; AMES, 1992). No entanto, no que diz respeito à patogênese de ELAf, o presente estudo estabelece que a heterodimerização mutante contribui ativamente para aumentar a toxicidade da hSod1 mutante, resultando em notáveis danos oxidativos celulares. Usando espectrometria de massa em alta resolução, espécies de Sod1 de alto peso molecular foram oxidadas em resíduos críticos para a atividade e estabilidade de Sod1 (Cys146, His71 e His120). Além disso, a agregação desses resíduos de alto peso molecular aumentou de forma acentuada nas células de levedura envelhecidas em fase estacionária, sugerindo que o dano oxidativo pode desencadear a inclusão da Sod1 (MARTINS; ENGLISH, 2014).

A fim de obtermos informações mais detalhadas sobre a agregação de hSod1 impulsionada pelo estresse oxidativo em células de levedura envelhecidas, foi realizada a microscopia de fluorescência, de forma a quantificar, bem como localizar as inclusões WT-mutante hSod1. Nesse estudo então demonstramos que as células jovens de levedura coletadas na metade da primeira fase exponencial expressando hSod1 WT e mutantes não foram capazes de formar inclusões. Ao contrário, homo e heterodímeros mutantes cronologicamente envelhecidos formam inclusões visíveis e múltiplas, especialmente os heterodímeros com a mutação A4V. Isso reforça que a formação de agregados mutantes de hSod1 está diretamente relacionada aos danos oxidativos celulares causados pelo processo de envelhecimento, afetando a atividade enzimática da hSod1 e a viabilidade celular. Além disso, a formação de heterodímeros por si só não foi capaz de induzir a formação de inclusões tóxicas, sugerindo que o estresse oxidativo causado pelo envelhecimento é o principal responsável pelo aumento da toxicidade do mutante hSod1.

É sabido que em resposta a níveis elevados de EROs a Sod1 WT se realoca rapidamente no núcleo promovendo a regulação da resistência ao estresse oxidativo (TSANG et al., 2014). Este fato pode ser confirmado neste estudo, onde o envelhecimento cronológico também foi capaz de direcionar a hSod1 WT para o núcleo, estimulando de forma eficiente os mecanismos de defesa celular contra o estresse oxidativo pela indução de genes envolvidos na

resistência a EROs. Isto endossa a atividade alta atividade hSod1 WT, assim como a viabilidade e a diminuição dos danos oxidativos exibidos pela variante WT após o envelhecimento. No entanto, os mutantes hSod1 permanecem predominantemente citoplásmicos na forma de inclusões tóxicas, sugerindo que a há alteração na dinâmica de proteínas regulada por EROs na presença de mutações relacionadas à ELAf.

Já foi relatado que a presença de H_2O_2 é suficiente para promover a localização nuclear de Sod1, respondendo a EROs de uma forma geral ao invés do substrato Sod1 (TSANG et al., 2015). Uma vez que a catalase é uma das principais proteínas antioxidantes envolvidas na degradação de H_2O_2 e resistência a EROs, ao verificarmos a atividade Ctt1 foi visto que esta era substancialmente maior em células que expressam a hSod1 WT após o envelhecimento, comparado às diferentes mutantes heterodiméricas. Assim, uma atividade reduzida de catalase pode provavelmente causar danos oxidativos a níveis celular e genômico de forma extensa, sendo então um fator que contribui para a citotoxicidade dos heterodímeros mutantes durante o envelhecimento. Além disso, a diminuição da atividade Ctt1 pode também estar relacionada à inativação da catalase, causada pela degradação do heme mediada pelos níveis de H_2O_2 presentes dentro da célula, produto da dismutação dos radicais superóxido pela Sod1 (NAGABABU; CHREST; RIFKIND, 2003).

Em contraste, a localização nuclear e citoplasmática dos homodímeros WT e Sod1 mutante já foi observada em células não-estressadas (BRASIL et al., 2017). Isso pode sugerir que a produção basal de EROs pelas células respiratórias é suficiente para induzir a localização nuclear de Sod1, e não foi suficiente para as células de levedura em fase exponencial (estágio fermentativo). Como descrito anteriormente, EROs estimulam a fosforilação de Sod1 nos resíduos S60, 99 pela Dun1 pela promoção da localização nuclear da Sod1 (TSANG et al., 2014). Em outro estudo, os autores sugerem que a fosforilação de T2 estabiliza a Sod1, protegendo contra a formação de oligômeros tóxicos de Sod1 (FAY et al., 2016). Assim, a fosforilação da hSod1 pode ser um mecanismo para compensar as células contra o impacto do estresse oxidativo durante a progressão da ELAf.

De fato, nossos resultados mostraram que a formação de inclusões de hSod1 ELAf no citoplasma prejudicaram sua translocação para o núcleo,

resultando em uma resposta ineficiente contra os efeitos nocivos do envelhecimento cronológico, impactando negativamente na sobrevivência das células de levedura. Além disso, propomos que não apenas o estresse oxidativo, mas também a heterodimerização da enzima hSod1 são determinantes para a toxicidade da Sod1 mutante, presumivelmente pela formação de inclusões citoplasmáticas que diminuem a localização nuclear.

Mais estudos são necessários para investigar se e/ou quais mutações relacionadas à ELAf na Sod1 prejudicam a fosforilação da hSod1 e, conseqüentemente, sua localização nuclear. Ao observar um aumento na resistência à degradação proteolítica, WEICHERT et al. (2014) demonstraram que o WT Sod1 estabiliza o dobramento de heterodímeros em comparação com os homodímeros mutantes. Assim, considerando que o WT Sod1 estabiliza as variantes mutantes por heterodimerização, bem como a resposta heterodimérica se torna ineficiente em condições oxidativas, podemos inferir que os heterodímeros mutantes contribuem totalmente para a toxicidade de Sod1 mutante ligada à ELAf sob condições de envelhecimento.

7. CONCLUSÕES

Em conclusão, os heterodímeros formados por Sod1 WT e mutante apresentaram aumento de toxicidade pela aquisição de propriedades tóxicas derivadas da produção de EROs durante o envelhecimento cronológico, abrindo novos caminhos para o entendimento dos mecanismos moleculares associados à toxicidade de Sod1 contendo mutações relacionadas à ELAf.

8. REFERÊNCIAS

ABBOTT, D. A. et al. Catalase overexpression reduces lactic acid-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 8, p. 2320–5, abr. 2009.

ABE, K. et al. Safety and efficacy of edaravone in well defined patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled

trial. **The Lancet Neurology**, v. 16, n. 7, p. 505–512, jul. 2017.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984.

AL-CHALABI, A.; VAN DEN BERG, L. H.; VELDINK, J. Gene discovery in amyotrophic lateral sclerosis: implications for clinical management. **Nature Reviews Neurology**, v. 13, n. 2, p. 96–104, 16 fev. 2017.

ANTONYUK, S.; STRANGE, R. W.; HASNAIN, S. S. Structural discovery of small molecule binding sites in Cu-Zn human superoxide dismutase familial amyotrophic lateral sclerosis mutants provides insights for lead optimization. **Journal of medicinal chemistry**, v. 53, n. 3, p. 1402–6, 11 fev. 2010.

ARLIA-CIOMMO, A. et al. Quasi-programmed aging of budding yeast: a trade-off between programmed processes of cell proliferation, differentiation, stress response, survival and death defines yeast lifespan. **Cell Cycle**, v. 13, n. 21, p. 3336–3349, 2014.

BASTOW, E. L. et al. New links between SOD1 and metabolic dysfunction from a yeast model of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). **Journal of Cell Science**, p. jcs.190298, set. 2016.

BASTOW, E. L.; GOURLAY, C. W.; TUIE, M. F. Using yeast models to probe the molecular basis of amyotrophic lateral sclerosis. **Biochemical Society Transactions**, v. 39, n. 5, p. 1482–1487, out. 2011.

BAUMBACH, G. L.; DIDION, S. P.; FARACI, F. M. Hypertrophy of cerebral arterioles in mice deficient in expression of the gene for CuZn superoxide dismutase. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 37, n. 7, p. 1850–5, jul. 2006.

BENKLER, C. et al. Aggregated SOD1 causes selective death of cultured human motor neurons. **Scientific Reports**, v. 8, n. 16393, p. 1–14, 2018.

BENNETT, S. A. et al. Epigenetics in amyotrophic lateral sclerosis: a role for histone post-translational modifications in neurodegenerative disease. **Translational Research**, 12 out. 2018.

BERGEMALM, D. et al. Superoxide dismutase-1 and other proteins in inclusions

from transgenic amyotrophic lateral sclerosis model mice. **Journal of Neurochemistry**, v. 114, n. 2, p. 408–418, 1 jul. 2010.

BERMAN, H. M. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 1 jan. 2000.

BOEYNAEMS, S. et al. Inside out: the role of nucleocytoplasmic transport in ALS and FTL. **Acta Neuropathologica**, v. 132, n. 2, p. 159–173, 6 ago. 2016.

BRASIL, A. A. et al. The involvement of GSH in the activation of human Sod1 linked to FALS in chronologically aged yeast cells. **FEMS Yeast Research**, v. 13, n. 5, p. 433–440, 2013.

BRASIL, A. A. et al. Implications of fALS Mutations on Sod1 Function and Oligomerization in Cell Models. **Molecular Neurobiology**, 2017.

BRASIL, A. A. et al. Implications of fALS Mutations on Sod1 Function and Oligomerization in Cell Models. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 6, p. 5269–5281, 2018.

BRASIL, A. DE A. **Caracterização da Ausência da Enzima UBC4 e seu Envolvimento na Toxicidade de Sod1 Humanas Mutantes (G93A e A4V) Associadas à Esclerose Lateral Amiotrófica Familiar**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2015.

BROWN, G. Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase. **FEBS letters**, v. 369, p. 136–139, 1995.

CARLSON, M. Glucose repression in yeast. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, p. 202–207, 1999.

CASTRO, F. A V et al. Cytotoxicity mechanism of two naphthoquinones (menadione and plumbagin) in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS ONE**, v. 3, n. 12, 2008.

CERQUEIRA, F. M. **Conseqüências da expressão da enzima Cu,Zn-superóxido dismutase (SOD1) e sua mutante G93A em neuroblastomas. Implicações para a esclerose lateral amiotrófica**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2007.

CHA, M.-Y.; KIM, D. K.; MOOK-JUNG, I. The role of mitochondrial DNA mutation on neurodegenerative diseases. **Experimental & molecular medicine**, v. 47, p. e150, jan. 2015.

CHENG, Y. et al. Mesenchymal stromal cells attenuate sevoflurane-induced apoptosis in human neuroglioma H4 cells. **BMC Anesthesiology**, v. 18, n. 1, p. 84, 18 dez. 2018.

CHIU, H.-J.; FISCHMAN, D. A; HAMMERLING, U. Vitamin A depletion causes oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and PARP-1-dependent energy deprivation. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 22, p. 3878–3887, 2008.

CORSON, L. B. et al. Chaperone-facilitated copper binding is a property common to several classes of familial amyotrophic lateral sclerosis-linked superoxide dismutase mutants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 11, p. 6361–6366, maio 1998.

COSTA, V. et al. Mitochondrial superoxide dismutase is essential for ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in the post-diauxic phase. **Microbiology**, v. 143, n. 1 997, p. 1649–1656, 1997.

CROSS, F. R.; BUCHLER, N. E.; SKOTHEIM, J. M. Evolution of networks and sequences in eukaryotic cell cycle control. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 366, n. 1584, p. 3532–44, 27 dez. 2011.

DA CUNHA, F. M.; DEMASI, M.; KOWALTOWSKI, A. J. Aging and calorie restriction modulate yeast redox state, oxidized protein removal, and the ubiquitin-proteasome system. **Free radical biology & medicine**, v. 51, n. 3, p. 664–70, 2011.

DE SÁ, R. A et al. Brazilian propolis protects *Saccharomyces cerevisiae* cells against oxidative stress. **Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 44, n. 3, p. 993–1000, 2013.

DERISI, J. L.; IYER, V. R.; BROWN, P. O. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. **Science (New York, N.Y.)**, v.

278, n. 5338, p. 680–6, 24 out. 1997.

DIDION, S. P. et al. Increased superoxide and vascular dysfunction in CuZnSOD-deficient mice. **Circulation research**, v. 91, n. 10, p. 938–44, 15 nov. 2002.

DRINGEN, R. et al. Glutathione-Dependent Detoxification Processes in Astrocytes. **Neurochemical Research**, 2014.

DZIADKOWIEC, D. et al. Protective role of mitochondrial superoxide dismutase against high osmolarity, heat and metalloid stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Folia Microbiologica**, v. 52, n. 2, p. 120–126, 2007.

ELEUTHERIO, E. et al. Oxidative stress and aging: Learning from yeast lessons. **Fungal Biology**, v. 122, n. 6, p. 514–525, 2018.

FABRIZIO, P.; LONGO, V. D. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 371, p. 89–95, 2007.

FARRAWELL, N. E. et al. Distinct partitioning of ALS associated TDP-43, FUS and SOD1 mutants into cellular inclusions. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 13416, 21 out. 2015.

FAY, J. M. et al. A Phosphomimetic Mutation Stabilizes SOD1 and Rescues Cell Viability in the Context of an ALS-Associated Mutation. **Structure**, v. 24, n. 11, p. 1898–1906, 2016.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**, v. 43, n. 1, p. 61–68, 1997.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature Insight Review Articles**, v. 408, n. November, p. 239–247, 2000.

FLOHÉ, L.; OTTING, F. Superoxide dismutase assays. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 93–104, jan. 1984.

FLORES, C.-L. et al. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 507–529, 2000.

FLÜCKIGER, S. et al. Immunological and structural analysis of IgE-mediated cross-reactivity between manganese superoxide dismutases. **International archives of allergy and immunology**, v. 128, n. 4, p. 292–303, ago. 2002.

FOURNIER, C. N. et al. The gut microbiome and neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis? Emerging clinical evidence. **Neurobiology of Disease**, 12 out. 2018.

FRANÇA, M. B.; PANEK, A D.; ELEUTHERIO, E. C. A. Oxidative stress and its effects during dehydration. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 146, p. 621–631, 2007.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual review of biochemistry**, v. 64, p. 97–112, jan. 1995.

FRIJHOFF, J. et al. Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. **Antioxidants & redox signaling**, v. 23, n. 14, p. 1144–70, 10 nov. 2015.

FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. **Antioxidants & redox signaling**, v. 15, n. 6, p. 1583–1606, 2011.

FURUKAWA, Y.; O'HALLORAN, T. V. Posttranslational modifications in Cu,Zn-superoxide dismutase and mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis. **Antioxidants & redox signaling**, v. 8, n. 5–6, p. 847–67, 2006.

GALALELDEEN, A. et al. Structural and biophysical properties of metal-free pathogenic SOD1 mutants A4V and G93A. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 492, n. 1–2, p. 40–47, dez. 2009.

GONÇALVES, S. A.; MATOS, J. E.; OUTEIRO, T. F. Zooming into protein oligomerization in neurodegeneration using BiFC. **Trends in biochemical sciences**, v. 35, n. 11, p. 643–51, nov. 2010.

GONGORA, M. C. et al. Loss of extracellular superoxide dismutase leads to acute lung damage in the presence of ambient air: a potential mechanism underlying adult respiratory distress syndrome. **The American journal of pathology**, v. 173, n. 4, p. 915–26, out. 2008.

GROLEAU, J. et al. Essential role of copper-zinc superoxide dismutase for ischemia-induced neovascularization via modulation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 30, n. 11, p. 2173–81, nov. 2010.

GUILLAUMET-ADKINS, A. et al. Epigenetics and Oxidative Stress in Aging. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1–8, 20 jul. 2017.

HAGMAN, A.; SÄLL, T.; PIŠKUR, J. Analysis on yeast short-term Crabtree effect and its origin. **FEBS Journal**, v. 281, p. n/a-n/a, 2014.

HARASYM, J.; OLEDZKI, R. Effect of fruit and vegetable antioxidants on total antioxidant capacity of blood plasma. **Nutrition**, v. 30, p. 511–517, 2014.

HAYWARD, L. J. et al. Decreased metallation and activity in subsets of mutant superoxide dismutases associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 18, p. 15923–31, 3 maio 2002.

HOUGH, M. A et al. Dimer destabilization in superoxide dismutase may result in disease-causing properties: structures of motor neuron disease mutants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 16, p. 5976–5981, 2004.

INGRE, C. et al. Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. **Clinical epidemiology**, v. 7, p. 181–93, jan. 2015.

JAISSWAL, M. K. Riluzole and edaravone: A tale of two amyotrophic lateral sclerosis drugs. **Medicinal Research Reviews**, 12 ago. 2018.

JIN, K. et al. The Critical Need to Promote Research of Aging and Aging-related Diseases to Improve Health and Longevity of the Elderly Population. **Aging and Disease**, v. 6, n. 1, p. 1–5, 2015.

JOMOVA, K.; VALKO, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. **Toxicology**, v. 283, n. 2–3, p. 65–87, 10 maio 2011.

JORDAN, M.; SCHALLHORN, A.; WURM, F. M. Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. **Nucleic acids research**, v. 24, n. 4, p. 596–601, 15 fev. 1996.

KAEBERLEIN, M. Lessons on longevity from budding yeast. **Nature**, v. 464, n. 7288, p. 513–9, 2010.

KAWAMATA, H.; MANFREDI, G. Import, maturation, and function of SOD1 and its copper chaperone CCS in the mitochondrial intermembrane space. **Antioxidants & redox signaling**, v. 13, n. 9, p. 1375–84, 1 nov. 2010.

KERPPOLA, T. K. Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) Analysis as a Probe of Protein Interactions in Living Cells. **Annual Review of Biophysics**, v. 37, n. 1, p. 465–487, jun. 2008.

KHURANA, V.; LINDQUIST, S. Modelling neurodegeneration in *Saccharomyces cerevisiae*: why cook with baker's yeast? **Nature reviews. Neuroscience**, v. 11, n. April, p. 436–449, 2010.

KIM, G. H. et al. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. **Experimental neurobiology**, v. 24, n. 4, p. 325–40, dez. 2015.

KIM, J.-H. et al. The glucose signaling network in yeast. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1830, n. 11, p. 5204–5210, 2013.

KIM, J. et al. Dimerization, Oligomerization, and Aggregation of Human Amyotrophic Lateral Sclerosis Copper/Zinc Superoxide Dismutase 1 Protein Mutant Forms in Live Cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 289, n. 21, p. 15094–15103, 2014.

KONDO, T. et al. Reduction of CuZn-superoxide dismutase activity exacerbates neuronal cell injury and edema formation after transient focal cerebral ischemia. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 17, n. 11, p. 4180–9, 1 jun. 1997.

LÁZARO, D. F. et al. Systematic Comparison of the Effects of Alpha-synuclein Mutations on Its Oligomerization and Aggregation. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 11, p. e1004741, 13 nov. 2014.

LÁZARO, D. F. et al. The effects of the novel A53E alpha-synuclein mutation on its oligomerization and aggregation. **Acta Neuropathologica Communications**, v. 4, n. 1, p. 128, 9 dez. 2016.

LÁZARO, D. F.; PAVLOU, M. A. S.; OUTEIRO, T. F. Cellular models as tools for the study of the role of alpha-synuclein in Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, v. 298, n. Pt B, p. 162–171, dez. 2017.

LINDBERG, M. J. et al. Systematically perturbed folding patterns of amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-associated SOD1 mutants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 28, p. 9754–9759, 12 jul. 2005.

LINDERSSON, E. et al. Proteasomal inhibition by alpha-synuclein filaments and oligomers. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 13, p. 12924–34, 26 mar. 2004.

LOGROSCINO, G. et al. Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, v. 81, n. 4, p. 385–90, 1 abr. 2010.

LONGO, V. D. et al. Replicative and chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*. **Cell Metabolism**, v. 16, n. 1, p. 18–31, 2012.

LONGO, V. D.; FABRIZIO, P. Chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae*. **Sub-cellular biochemistry**, v. 57, p. 101–21, 2012.

LONGO, V. D.; GRALLA, E. B.; VALENTINE, J. S. Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*: Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 12275–12280, 1996.

LUK, E. et al. Manganese activation of superoxide dismutase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* requires MTM1, a member of the mitochondrial carrier family. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 18, p. 10353–10357, 2003.

LUSHCHAK, V. et al. Possible role of superoxide dismutases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under respiratory conditions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 441, p. 35–40, 2005.

MAGALHÃES, R. S. S. **ESTUDO DA PROTEÍNA SOD1 HUMANA COM MUTAÇÕES ASSOCIADAS À ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA**

FAMILIAL E SUA RELAÇÃO COM A DEFESA EM CÉLULAS SOB DIFERENTES TIPOS DE ESTRESSE OXIDATIVO. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), 2018.

MARTINS, D.; ENGLISH, A. M. SOD1 oxidation and formation of soluble aggregates in yeast: relevance to sporadic ALS development. **Redox biology**, v. 2, p. 632–9, jan. 2014.

MILLER, K. E. et al. Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) Analysis: Advances and Recent Applications for Genome-Wide Interaction Studies. **Journal of molecular biology**, v. 427, n. 11, p. 2039–2055, 5 jun. 2015.

MORANO, K. A.; GRANT, C. M.; MOYE-ROWLEY, W. S. The response to heat shock and oxidative stress in *saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 190, n. April, p. 1157–1195, 2012.

MOREIRA, L. G. A. et al. Structural and functional analysis of human SOD1 in amyotrophic lateral sclerosis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1–9, 2013.

MOSKOVITZ, J. et al. Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 23, p. 12920–5, 6 nov. 2001.

NAGABABU, E.; CHREST, F. J.; RIFKIND, J. M. Hydrogen-peroxide-induced heme degradation in red blood cells: the protective roles of catalase and glutathione peroxidase. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1620, n. 1–3, p. 211–7, 17 mar. 2003.

NIELSEN, J. Systems biology of lipid metabolism: from yeast to human. **FEBS letters**, v. 583, n. 24, p. 3905–13, 17 dez. 2009.

NISHIDA, C. R.; GRALLA, E. B.; VALENTINE, J. S. Characterization of three yeast copper-zinc superoxide dismutase mutants analogous to those coded for in familial amyotrophic lateral sclerosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 21, p. 9906–10, 11 out. 1994.

NOZIK-GRAYCK, E.; SULIMAN, H. B.; PIANTADOSI, C. A. Extracellular superoxide dismutase. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 37, p. 2466–2471, 2005.

O'BRIEN, E. M. et al. Mitochondrial protein oxidation in yeast mutants lacking manganese- (MnSOD) or copper- and zinc-containing superoxide dismutase (CuZnSOD): Evidence that mnsod and cuznsod have both unique and overlapping functions in protecting mitochondrial proteins from. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 51817–51827, 2004.

OLIVEIRA, A. V. et al. **Exploring the power of yeast to model aging and age-related neurodegenerative disorders** *Biogerontology*, 2017.

PACKER, L. **Superoxide dismutase**. [s.l.] Academic Press, 2002.

PANCHAL, K.; TIWARI, A. K. Mitochondrial dynamics, a key executioner in neurodegenerative diseases. **Mitochondrion**, 5 nov. 2018.

PELED-KAMAR, M. et al. Oxidative stress mediates impairment of muscle function in transgenic mice with elevated level of wild-type Cu/Zn superoxide dismutase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 8, p. 3883–7, abr. 1997.

PEREIRA, M. D.; ELEUTHERIO, E. C.; PANEK, A. D. Acquisition of tolerance against oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **BMC microbiology**, v. 1, p. 11, 2001.

PIMENTEL, C. et al. Yap1 mediates tolerance to cobalt toxicity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1840, n. 6, p. 1977–86, jun. 2014.

POLYMENIS, M.; KENNEDY, B. K. Chronological and replicative lifespan in yeast: Do they meet in the middle? **Cell Cycle News & Views**, v. 11, n. 19, p. 3531–3535, 2012.

RABIZADEH, S. et al. Mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis convert superoxide dismutase from an antiapoptotic gene to a proapoptotic gene: studies in yeast and neural cells. **Proceedings of the National Academy of**

Sciences of the United States of America, v. 92, n. 7, p. 3024–8, 28 mar. 1995.

REAUME, A. G. et al. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. **Nature genetics**, v. 13, n. 1, p. 43–7, maio 1996.

RIBEIRO, T. P. et al. Iron, copper, and manganese complexes with in vitro superoxide dismutase and/or catalase activities that keep *Saccharomyces cerevisiae* cells alive under severe oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 80, p. 67–76, 2015.

RODRIGUEZ, J. A. et al. Familial amyotrophic lateral sclerosis-associated mutations decrease the thermal stability of distinctly metallated species of human copper/zinc superoxide dismutase. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 18, p. 15932–7, 3 maio 2002.

ROSEN, D. R. et al. A frequent ala 4 to val superoxide dismutase-1 mutation is associated with a rapidly progressive familial amyotrophic lateral sclerosis. **Human Molecular Genetics**, v. 3, n. 6, p. 981–987, 1 jun. 1994.

ROSENFELD, E.; BEAUVOIT, B. Role of the non-respiratory pathways in the utilization of molecular oxygen by *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 20, n. 13, p. 1115–1144, 15 out. 2003.

SAEED, M. et al. Age and founder effect of SOD1 A4V mutation causing ALS. **Neurology**, v. 72, n. 19, p. 1634–9, 2009.

SALEM, K. et al. Copper–zinc superoxide dismutase-mediated redox regulation of bortezomib resistance in multiple myeloma. **Redox Biology**, v. 4, p. 23–33, 2015.

SANJAY, M. K. et al. Copper, Zinc-Superoxide Dismutase from Clinically Isolated *Escherichia coli*: Cloning, Analysis of sodC and Its Possible Role in Pathogenicity. **Indian journal of microbiology**, v. 51, n. 3, p. 326–31, jul. 2011.

SCOTT, M. D.; MESHNICK, S. R.; EATON, J. W. Superoxide dismutase-rich bacteria. Paradoxical increase in oxidant toxicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 8, p. 3640–3645, 1987.

SHENG, Y. et al. A Comparison of Two Yeast MnSODs: Mitochondrial *Saccharomyces cerevisiae* versus Cytosolic *Candida albicans*. **J Am Chem Soc**, v. 133, n. 51, p. 20878–20889, 2011.

SINGH, U.; DEVARAJ, S.; JIALAL, I. Vitamin E, oxidative stress, and inflammation. **Annual review of nutrition**, v. 25, p. 151–174, 2005.

SOHAL, R. S.; SOHAL, B. H.; ORR, W. C. Mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide generation, protein oxidative damage, and longevity in different species of flies. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 19, n. 4, p. 499–504, out. 1995.

SOOCH, B. S.; KAULDHAR, B. S.; PURI, M. Recent insights into microbial catalases: Isolation, production and purification. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 8, p. 1429–1447, 2014.

STEELS, E. L.; LEARMONTH, R. P.; WATSON, K. Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. **Microbiology**, v. 140, n. 3, p. 569–576, 1 mar. 1994.

STICKLAND, L. H. The determination of small quantities of bacteria by means of the biuret reaction. **Journal of general microbiology**, v. 5, n. 4, p. 698–703, out. 1951.

TENREIRO, S. et al. Harnessing the power of yeast to unravel the molecular basis of neurodegeneration. **Journal of Neurochemistry**, v. 127, p. 438–452, 2013.

TENREIRO, S. et al. Phosphorylation Modulates Clearance of Alpha-Synuclein Inclusions in a Yeast Model of Parkinson's Disease. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 5, p. e1004302, 8 maio 2014.

TENREIRO, S. et al. Yeast reveals similar molecular mechanisms underlying alpha- and beta-synuclein toxicity. **Human Molecular Genetics**, v. 25, n. 2, p. 275–290, 2016.

TENREIRO, S.; OUTEIRO, T. F. Simple is good: Yeast models of neurodegeneration. **FEMS Yeast Research**, v. 10, p. 970–979, 2010.

THANAN, R. et al. Oxidative Stress and Its Significant Roles in Neurodegenerative Diseases and Cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 1, p. 193–217, jan. 2014.

THEVELEIN, J. M. Signal transduction in yeast. **Yeast (Chichester, England)**, v. 10, p. 1753–1790, 1994.

THEVELEIN, J. M.; DE WINDE, J. H. Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular microbiology**, v. 33, n. 5, p. 904–18, set. 1999.

TOLEDANO, M. B. **Yeast Stress Responses**. [s.l.] Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2003.

TREVISOL, E. T. V et al. The effect of trehalose on the fermentation performance of aged cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, p. 697–704, 2011.

TRIST, B. G.; HARE, D. J.; DOUBLE, K. L. A Proposed Mechanism for Neurodegeneration in Movement Disorders Characterized by Metal Dyshomeostasis and Oxidative Stress. **Cell Chemical Biology**, v. 25, n. 7, p. 807–816, 19 jul. 2018.

TSANG, C. K. et al. Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. **Nature communications**, v. 5, p. 3446, 2014.

TSANG, C. K. et al. Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcriptional factor to regulate oxidative stress resistance. **Nat Commun**, v. 5, n. 3446, 2015.

TU, P. H. et al. Transgenic mice carrying a human mutant superoxide dismutase transgene develop neuronal cytoskeletal pathology resembling human amyotrophic lateral sclerosis lesions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 7, p. 3155–60, 2 abr. 1996.

VALENTINE, J. S.; DOUCETTE, P. A; ZITTIN POTTER, S. Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. **Annual review of biochemistry**, v. 74, p. 563–593, 2005.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, p. 44–84, 2007.

VAN DAMME, P.; ROBBERECHT, W.; VAN DEN BOSCH, L. Modelling amyotrophic lateral sclerosis: progress and possibilities. **Disease Models & Mechanisms**, v. 10, n. 5, p. 537–549, 2017.

WEICHERT, A. et al. Wild-type Cu/Zn superoxide dismutase stabilizes mutant variants by heterodimerization. **Neurobiology of disease**, v. 62, p. 479–88, fev. 2014.

WHO, W. H. O. Global Health and Aging. **NIH Publication**, v. 11, n. 7737, p. 1–32, 2011.

WHO, W. H. O. **Health statistics and information systems, cause-specific mortality.** Disponível em:

<http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/index1.html>. Acesso em: 9 jun. 2015.

WHO, W. H. O. **World Health Statistics: Monitoring Health for the SDGs (Sustainable Development Goals).** Geneva: [s.n.].

WYSS-CORAY, T. Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation HHS Public Access. **Nature**, v. 539, n. 7628, p. 180–186, 2016.

YOUNGMAN, L. D.; PARK, J. Y.; AMES, B. N. Protein oxidation associated with aging is reduced by dietary restriction of protein or calories. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 19, p. 9112–6, out. 1992.