

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

MARIANE LEICHSENRING SCHULZ

**Investigação dos Processos Biológicos Associados à
Produção Endógena de Aldeídos Reativos**

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 5890

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

19/06/2019

MARIANE LEICHSENRING SCHULZ

**Investigação dos Processos Biológicos Associados à Produção
Endógena de Aldeídos Reativos**

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

Orientadora: Profa. Dra. Marisa Helena Gennari de Medeiros

São Paulo

2019

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

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

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

S388i Schulz, Mariane Leichsenring
Investigação dos Processos Biológicos Associados à
Produção Endógena de Aldeídos Reativos / Mariane
Leichsenring Schulz. - São Paulo, 2019.
93 p.

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

1. Aldeídos Endógenos. 2. Adutos de DNA. 3.
Carnosina. 4. Esclerose Lateral Amiotrófica. 5. HPLC-
MS/MS. I. T. II. Medeiros, Marisa Helena Gennari
de, orientador.

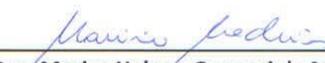


UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

"Investigação dos processos biológicos associados à
produção endógena de aldeídos reativos"

MARIANE LEICHSENRING SCHULZ

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestra em Ciências - Área: Bioquímica.

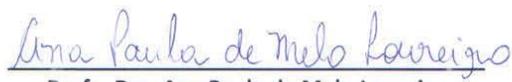


Profa. Dra. Marisa Helena Gennari de Medeiros
(Orientadora e Presidente)

Aprovado (a) por:



Profa. Dra. Daniela Ramos Truzzi
IQ - USP



Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro
FCF - USP



Profa. Dra. Gláucia Regina Martinez
UFPR

SÃO PAULO
18 de julho de 2019

Ao meu primo e aos meus sobrinhos Gustavinho, Lorena e Bruninho. Aos meus avós Dalila, Silvio, Maria Augusta e Gert.

Aos alunos que passaram e passarão pelo laboratório da

Prof.^a Dr.^a Marisa Medeiros.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Criador do objeto de estudo da ciência, a Natureza. Querido Pai Celeste, muito obrigada por me conceder excelentes oportunidades para minha formação profissional, através das quais desenvolvi a capacidade cognitiva e muitas habilidades técnicas. Muito obrigada também por suas orientações sobre o estilo de vida; a obediência a elas me proporcionou saúde física e emocional. Reconheço a Tua bondosa direção durante esta etapa de minha formação. Por tudo isso, muito obrigada!

Agradeço ao papai e a mamãe, os meus primeiros e mais influentes professores. Por palavras e pelo exemplo eles me deram uma educação integral, abrangendo os aspectos físicos, sociais e espirituais. Inspiraram-me a buscar o conhecimento verdadeiro, a apreciar o estudo da natureza e a ensinar com bondade as lições aprendidas. Eles me deram o mais valioso legado: usar minha vida em serviço movido pelo amor, a Deus e ao meu próximo. Papai e mamãe, em reconhecimento à amorosa dedicação que dispensaram a mim e por terem moldado quem hoje sou, quero honrá-los em todo meu viver. Ich liebe euch, sehr!

Ao meu querido esposo, Evandro, também tenho muitas razões para agradecer. Por querer ouvir como foi o meu dia, sempre que chego em casa; por dividir comigo as responsabilidades da vida adulta; por ser tão comprometido na busca pela verdade pura; pelo amor e apoio enormes e sempre demonstrados; por sermos tão unidos. Faltam palavras para expressar de forma completa o quanto te agradeço. Príncipe Lindo, muito obrigada, eu te amo muito!

Agradeço imensamente aos meus sogros, Rute e Gilmar. Vocês contribuíram mais para este trabalho do que imaginam! Muito obrigada pelo apoio e carinho de vocês!

À minha irmã querida e linda que tanto amo e admiro. Aos meus avós, que contribuíram

para formação de minha identidade histórica e cultural através de suas ricas experiências e histórias compartilhadas. Conviver com vocês é um privilégio enorme!!! Agradeço aos demais parentes que de perto ou de longe, direta ou indiretamente me apoiaram. Amo vocês!

Tenho uma segunda, mas não menos importante família: os amigos da igreja. A comunhão com vocês a cada sábado me fortaleceu grandemente. Obrigada pelas palavras de encorajamento e ânimo, e pelas oportunidades de crescimento físico, social e espiritual.

Nestes dois anos minha terceira família foi a ‘família laboratório’, e é à ela que eu devo este trabalho. Com pessoas queridas e inteligentes aprendi muito sobre bioquímica, sobre comportamento, trabalho em grupo... Enfim, me ensinaram como ser uma profissional capaz de beneficiar a sociedade. Gostaria de agradecê-los um a um:

Começo agradecendo à professora Marisa, por me dar a oportunidade de trabalhar em seu laboratório. Agradeço pela supervisão neste trabalho de mestrado, pelas correções e contribuições. Foram muito valiosas! Também sou muito grata pela nossa amizade! Certamente, levarei por toda vida preciosas lições que você me ensinou. Agradeço também ao professor Paolo Di Mascio, pela confiança, pelas sugestões e contribuições para este trabalho.

À querida Fernanda, que além de ser uma técnica extremamente competente, é também uma grande amiga! Fer, muito, muito obrigada por tudo o que você me ensinou, e por todas as vezes que ajudou em meus experimentos. Nossa amizade é muito valiosa!!! Te admiro muito! Agradeço à Izaura e à Agda, ao Edson e à Doris pelo trabalho e dedicação em manter os equipamentos e o laboratório em condições ótimas. Vocês facilitaram muito o meu trabalho!

À Ana Helena, que me ensinou tanto, me presenteou com a sua amizade e fez os dias no laboratório bem mais divertidos. Devo grande parte de meu mestrado a você! Muito, muito obrigada :) Ao Victor, meu primeiro instrutor, aquele que me ensinou o bê-á-bá da espectrometria de massas. Muito obrigada por ter compartilhado seu precioso conhecimento comigo. Torço pela

sua felicidade! Ao Adriano, que em pouco tempo já se tornou parte deste trabalho. Muito obrigada por me motivar e me desafogar das minhas muitas atividades!

Aos recém-chegados Bianca, Lucas e Joice, que são tão queridos, prestativos e divertidos! Vocês, juntamente com o Adriano, são como irmãos para mim! Muito obrigada pela convivência. Também agradeço à Angélica, que tive pouco tempo de convivência, mas que influenciou grandemente este trabalho. Muito obrigada por todo apoio.

Para realizar este trabalho também tive o auxílio de outras pessoas e instituições: Prof. Antonio Carlos de Lima, Prof.^a Lúcia Barroso, e os alunos Leonardo Costa e Marinaldo de Sousa do CEA (Centro de estatística aplicada) USP, pela ajuda no tratamento estatístico de uma parte dos dados apresentados nessa dissertação. Ao Matheus e ao Eduardo, que me deram o privilégio de orientar seu TCC do ensino técnico em química pela ETEC Getúlio Vargas.

Pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro e bolsa concedida (Código de Financiamento 001).

Ao Centro de Pesquisa de Processos Redox em Biomedicina, o CEPID Redoxoma. Agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro (Proc. 2013/07937-8) e ao grupo pela oportunidade de fazer parte desta grande rede de cientistas altamente qualificados, e por tanto conteúdo aprendido nos seminários. À Pró-Reitoria de Pesquisa da USP pelo suporte financeiro através do Núcleo de Apoio a pesquisa NAP-Redoxoma (Pró-Reitoria de Pesquisa-USP: Proc. 2011.1.9352.1.8). Agradeço também ao CNPq (Proc. 301404/2016-0) pelo suporte financeiro.

Enfim, ao Instituto de Química – USP, e à Universidade de São Paulo, meu agradecimento. É um enorme privilégio ser aluna desta instituição e universidade.

“Cristo, em quem estão escondidos todos os tesouros da sabedoria e da ciência.”

Colossenses 2:2, 3

RESUMO

Schulz, M.L. **Investigação dos Processos Biológicos Associados à Produção Endógena de Aldeídos Reativos**. 2019. 87p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Os aldeídos são espécies reativas que podem ser produzidos endogenamente por processos como a lipoperoxidação, podendo reagir com lipídios, proteínas e DNA. Diversas evidências apontam para o envolvimento de aldeídos reativos na progressão de patologias como doenças cardiovasculares, arteriosclerose e doenças neurodegenerativas. O nosso grupo estuda os mecanismos de formação, detoxificação e reação com biomoléculas de aldeídos reativos endógenos e exógenos e seu papel em patologias como a esclerose lateral amiotrófica (ALS). Um dos mecanismos de detoxificação desses aldeídos é através da conjugação com a carnosina. Recentemente, foi observado que a suplementação de animais transgênicos ALS SOD^{G93A} com carnosina via oral resultou em retardo da perda de peso e tendência de aumento da sobrevivência dos animais. O presente projeto buscou investigar o possível papel da carnosina em animais modelo para ALS. Para isso as modificações em DNA induzidas por aldeídos reativos e a formação de adutos de carnosina-aldeídos foram analisadas através de metodologia HPLC-MS/MS. Assim observamos que ratos suplementados com carnosina apresentaram níveis significativamente menores de proteína carbonilada em músculo e fígado. Em fígado foram vistos níveis menores de dois adutos de DNA, 8-oxodGuo e 1,N²-HO-propanodGuo, em animais suplementados. Em cérebro foram detectados níveis menores de 1,N²-εdGuo. Com relação aos adutos carnosina-aldeídos, foi observado níveis significativamente maiores do aduto CAR-HHE na medula. Os

resultados aqui apresentados, juntamente com outros trabalhos já publicados no meio científico, sugerem a utilização de sequestradores de aldeídos como uma estratégia terapêutica em condições fisiopatológicas nas quais ao acúmulo dessas espécies está comprovado.

Palavras-chave: Aldeídos Endógenos, Adutos de DNA, Carnosina, Esclerose Lateral Amiotrófica, HPLC-MS/MS.

ABSTRACT

Schulz, M.L. **Research on Biological Processes Associated with Endogenous Production of Reactive Aldehydes**. 2019. 87p. Masters Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Aldehydes are reactive species that can be produced endogenously by processes such as lipid peroxidation, which can react with lipids, proteins and DNA. Several evidences point to the involvement of reactive aldehydes in the progression of pathologies such as cardiovascular diseases, atherosclerosis and neurodegenerative diseases. Our group studies the mechanisms of formation, detoxification and reaction with biomolecules of endogenous and exogenous reactive aldehydes and their role in pathologies such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS). One of the detoxification mechanisms of these aldehydes is through carnosine conjugation. Recently, we observed that oral carnosine supplementation in transgenic ALS SOD^{G93A} animals resulted in delayed weight loss and a tendency to increase the survival of the animals. The present project investigated the potential role of carnosine in animal models for ALS. Thus, reactive aldehydes induced DNA modifications and carnosine aldehyde adducts were analyzed by HPLC-MS/MS. We observed that rats supplemented with carnosine presented significantly lower levels of protein carbonylation in muscle and liver. Lower levels of two DNA adducts, 8-oxodGuo and 1, *N*²-HO-propanodGuo, were observed in liver of the supplemented animals. Lower levels of 1, *N*²-εdGuo were detected in the brain. Regarding the carnosine-aldehyde adducts, significantly higher levels of the CAR-HHE adduct were observed in spinal cord. The results presented here together with other works already published in the literature, suggest the use of aldehyde scavengers as a

therapeutic strategy under pathological conditions in which is proven the accumulation of these species.

Keywords: Endogenous Aldehydes, DNA Adducts, Carnosine, Amyotrophic Lateral Sclerosis, HPLC-MS/MS.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR	Acroleína
ALDH	Enzima aldeído desidrogenase
ALS	Sigla em inglês para Esclerose Lateral Amiotrófica
CAR	Carnosina
dGuo	2'-Desoxiguanosina
DNA	Sigla em inglês para ácido desoxirribonucleico
DNPH	2,4-Dinitrofenilhidrazina
SOD1	Cu,Zn-Superóxido dismutase
hSOD1	Cu,Zn-Superóxido dismutase humana
SOD1 ^{G93A}	Enzima Cu,Zn-superóxido dismutase humana com substituição da glicina 93 por alanina.
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ERO	Espécie reativa de oxigênio
ESI	Sigla em inglês para <i>Ionização por eletrospray</i>
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona dissulfeto
GSTs	Glutathiona-S-transferase
HHE	<i>Trans</i> -4-hidroxi-2(E)-hexenal
HNE	<i>Trans</i> -4-hidroxi-2(E)-nonenal
HPLC-ESI-MS/MS	Sigla em inglês para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas em

	tandem com ionização por eletrospray
MS	Sigla em inglês para Espectrômetro de massas
SRM	Sigla em inglês para Monitoramento de reação simples
1,N ² -HO-MedGuo	1,N ² -hidroxi-metil-2'-deoxiguanosina
[¹⁵ N ₅]-1,N ² -HO- MedGuo	[¹⁵ N ₅]-1,N ² -hidroxi-metil-2'-deoxiguanosina
8-oxodGuo	8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina
[¹⁵ N ₅]-8-oxodGuo	[¹⁵ N ₅]- 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina
1,N ² -HO-propanodGuo	1,N ² -hidroxi-propano -2'-desoxiguanosina
[¹⁵ N ₅]- 1,N ² -HO- propanodGuo	[¹⁵ N ₅]- 1,N ² -hidroxi-propano -2'-desoxiguanosina
1,N ² -εdGuo	1,N ² -Eteno-2'-desoxiguanosina
[¹⁵ N ₅]- 1,N ² -εdGuo	[¹⁵ N ₅]- 1,N ² -Eteno-2'-desoxiguanosina
1,N ² -propanodGuo	1,N ² -(α-Metil,γ-hidroxi)propano -2'-desoxiguanosina
[¹⁵ N ₅ ¹³ C ₄]- 1,N ² - propanodGuo	[¹⁵ N ₅ ¹³ C ₄]- 1,N ² -(α-Metil,γ-hidroxi)propano -2'- desoxiguanosina

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	4
RESUMO.....	8
ABSTRACT	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	12
SUMÁRIO.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	17
1. 1. Estresse Redox.....	17
1.1.1. Breve Histórico.....	18
1.1.2. Fontes e Formação das Espécies Reativas.....	19
1.1.3. Aldeídos em Sistemas Biológicos	21
1.1.4. Antioxidantes e Detoxificação de Espécies Reativas.....	22
1.1.5. Superóxido Dismutase.....	24
1.1.6. Carnosina.....	25
1.2. Lesões em DNA.....	28
1.2.1. Adutos de DNA	30
1.2.2. Biomarcadores	32
1.3. Esclerose Lateral Amiotrófica.....	32
2. OBJETIVOS.....	37

2. 1. Objetivo Geral:	37
2.2. Objetivos específicos:.....	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3. 1. Reagentes.....	38
3.2. Equipamentos	38
3.3. Modelo e Experimentação Animal	39
3.4. Extração de DNA.....	42
3.5. Hidrólise Enzimática de DNA.....	44
3.6. Quantificação de Adutos de DNA por HPLC-ESI ⁺ -MS/MS.....	45
3.6.1. Curvas de Calibração.....	48
3.7. Extração de Carnosina e seus Adutos.....	48
3.8. Quantificação de Proteína Carbonilada	49
3.9. Quantificação de Carnosina e seus adutos por HPLC-ESI ⁺ -MS/MS	50
3.10. Análises Estatísticas	54
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4.1. Desenvolvimento da Metodologia para Quantificação de Adutos de DNA por HPLC-ESI ⁺ -MS/MS.....	55
4.1.1. Curvas de Calibração.....	57
4.1.2. Limites de Detecção e Quantificação	60
4.2. Instabilidade Química do Aduto 1,N ² -HO-MedGuo	60

4.3. Modelo e Experimentação Animal	62
4.4. Quantificação de Adutos de DNA em Fígado	62
4.5. Quantificação de Adutos de DNA em Cérebro	66
4.6. Carnosina Livre	68
4.7. Extração de DNA e Carnosina e seus Adutos da Medula	70
4.8. Proteína Carbonilada	73
5. CONCLUSÕES	76
6. REFERÊNCIAS	78
ANEXO	91
Súmula Curricular.....	91
Publicações	93

1. INTRODUÇÃO

1.1. Estresse Redox

Radicais livres são espécies químicas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados e por isso participam de reações de óxido-redução (redox) envolvendo apenas um elétron por vez. As espécies não radicalares, por sua vez, reagem sempre doando ou recebendo os elétrons em pares. Os termos cunhados como Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) ou Nitrogênio (ERN) abrangem tanto radicais livres quanto espécies não radicalares, e se referem a moléculas com ampla reatividade frente às biomoléculas (Augusto, 2006). A reatividade de uma determinada espécie depende de sua concentração no meio em consideração, e da constante de velocidade para espécies não radicalares (entre $0,02 \text{ L mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ e $4 \times 10^7 \text{ L mol}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Sies, Berndt, & Jones, 2017), ou do potencial de redução para espécies radicalares (entre $-0,80\text{V}$ e $2,31\text{V}$) (Winterbourn, 2008).

Antioxidantes são substâncias que “retardam, previnem ou removem danos oxidativos causados a uma molécula alvo” (Winterbourn, 2008). As defesas antioxidantes podem ser enzimáticas ou não enzimáticas. Os antioxidantes não enzimáticos são moléculas de baixo peso molecular que podem ser endógenas ou provenientes da dieta.

Para manter a homeostase, os organismos vivos precisam lidar com variações físico-químicas no ambiente fisiológico. Oscilações do potencial oxidativo das células são atualmente entendidas como processos naturais se forem controladas, condição que foi denominada “Estresse Oxidativo Basal” ou “Eu-estresse”. Se, porém, houver um desbalanço entre espécies oxidantes e antioxidantes, predominando os oxidantes, a condição é patológica e conhecida como “Estresse Redox” (Sies et al., 2017), que é o termo atualmente aceito no lugar de “Estresse Oxidativo”, porém o termo antigo ainda é bastante difundido na literatura. Neste caso há aumento de danos

às biomoléculas (DNA, proteínas e lipídeos) os quais podem implicar no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, inflamatórias e câncer.

Para melhor compreensão do desenvolvimento científico na área da biologia redox, apresenta-se a seguir uma narrativa com as principais contribuições em ordem cronológica.

1.1.1. Breve Histórico

As reações redox em meio biológico começaram a ser mais profundamente estudadas na década de 1950 e o foco dos pesquisadores estava em fontes externas de espécies reativas, as quais estavam associadas unicamente à processos toxicológicos. A pesquisadora sul-americana Rebeca Gerschman propôs um mecanismo comum entre os efeitos da irradiação ionizante e o envenenamento a altas pressões de oxigênio: a formação de radicais livres (Gerschman, Gilbert, Nye, Dwyer, & Fenn, 1954). Poucos depois Denham Harman formulou a “Teoria de Envelhecimento via Radicais Livres” baseada nas considerações de que os radicais livres estão presentes na vasta maioria dos organismos vivos, surgem no decurso normal do metabolismo, e podem vir em menor proporção de fontes de radiação ionizante (Harman, 2009).

O estudo das reações redox se expandiu para novas direções até então não consideradas, a partir de 1969 quando McCord e Fridovich identificaram a enzima superóxido dismutase (SOD) (McCord & Fridovich, 1969). Ao ser trazido à luz a existência de uma enzima especializada em catalisar a dismutação de um radical, sugeriu-se que a relevância das reações redox seria muito mais ampla, e passou-se a considerar com grande interesse os radicais livres de origem endógena.

Outra descoberta científica importante se deu na década de 1990, quando o radical livre óxido nítrico (NO[•]) foi identificado como sinalizador natural do sistema nervoso e cardiovascular pelos pesquisadores R. Furchgott, L. Ignarro e F. Murad, ganhadores do prêmio Nobel, e S.

Moncada (Palmer, Ferrige, & Moncada, 1987).

O conceito de estresse redox foi definido em 1985 por Helmut Sies, como “uma perturbação na balança pró-oxidante antioxidante, favorecendo o primeiro” (Sies & Cadenas, 1985). Ou seja, foi proposto que pró-oxidantes e antioxidantes devem estar em proporção equilibrada nos organismos vivos, sendo essenciais para governar a vida através da sinalização redox, e o excesso de espécies oxidantes causa o estresse redox, o qual está associado a várias patologias (Sies et al., 2017).

1.1.2. Fontes e Formação das Espécies Reativas

As espécies reativas são formadas por agentes físico-químicos presentes no ambiente, ou por processos bioquímicos que se dão dentro de organismos vivos. Os principais agentes **exógenos** que contribuem diretamente para a formação de espécies reativas e alguns exemplos de espécies reativas associados a eles são (Halliwell & Gutteridge, 2007):

1. A radiação ionizante, sendo os raios gama e raios X os mais energéticos, os quais podem promover a radiólise da água, gerando o radical hidroxila (HO[•]);
2. A poluição atmosférica como, por exemplo, o ozônio troposférico (O₃);
3. A exposição à luz UV, cuja energia pode ser absorvida por cromóforos da pele e ser transferida para o oxigênio, formando espécies como o oxigênio singlete (¹O₂) (Di Mascio et al., 2019).

Alguns processos **endógenos** que geram espécies reativas são listados a seguir e ilustrados na Figura 1.1:

1. O metabolismo oxidativo de drogas, catalisado por enzimas da família citocromo P₄₅₀ e pelas enzimas álcool e aldeído desidrogenases (Anzenbacher & Anzenbacherová, 2001);

- O combate a microrganismos em neutrófilos, utilizando o complexo de NADPH oxidases as quais geram peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e a enzima mieloperoxidase que produz ácido hipocloroso (HClO) (Winterbourn, Vissers, & Kettle, 2000).
- A respiração mitocondrial, principal fonte endógena de espécies reativas, gera o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) devido ao vazamento de elétrons nos complexos I II e III da cadeia respiratória e outras enzimas redox, como algumas desidrogenases (Kowaltowski, 2019).

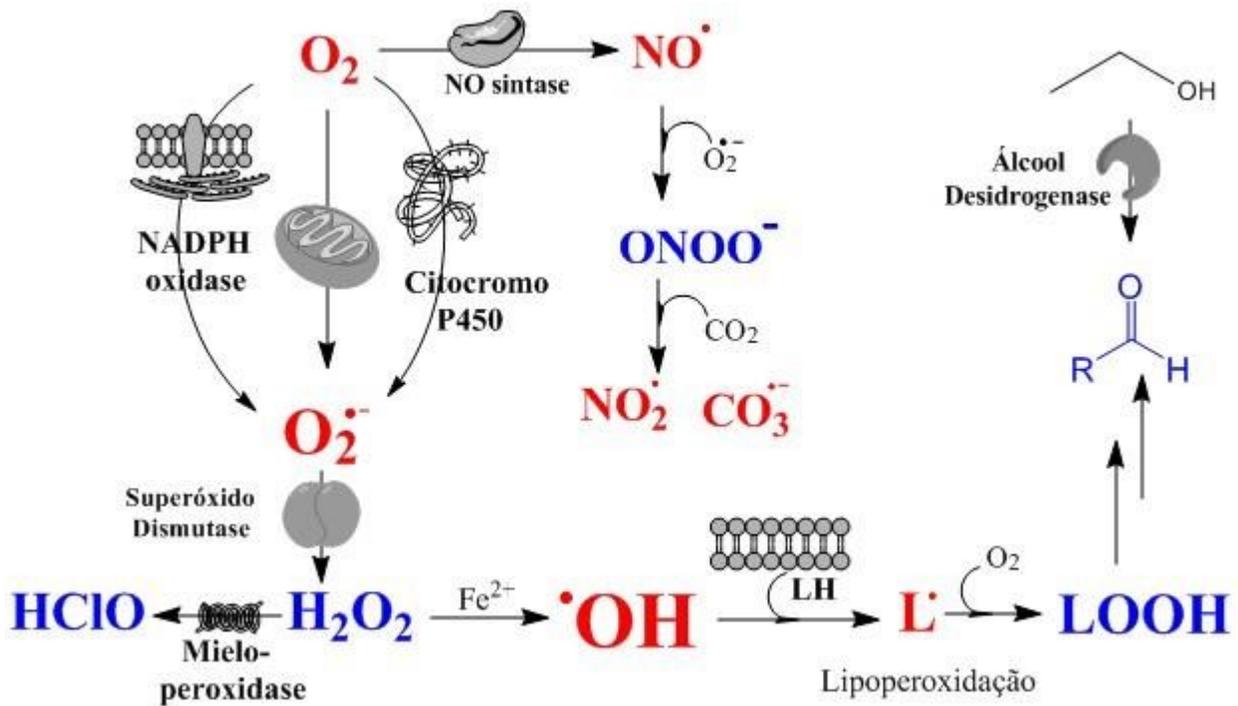


Figura 1.1. Vias de formação das principais espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e carbono. As principais enzimas que catalisam reações de geração de ER também estão indicadas. As substâncias em azul indicam espécies não radicais, e as substâncias em vermelho, as espécies radicais. LH – lipídio; L^{\cdot} – radical alquila; LOOH – hidroperóxido orgânico.

1.1.3. Aldeídos em Sistemas Biológicos

Os aldeídos (função orgânica contendo uma carbonila ligada a um hidrogênio) presentes nos seres vivos podem ser de origem **exógena**, quando encontrados em alimentos e poluição atmosférica, ou de origem **endógena** quando são produzidos *in vivo*. Os aldeídos gerados em meio biológico são, principalmente, produtos de oxidação de lipídeos e de carboidratos (O'Brien, Siraki, & Shangari, 2005). O acúmulo destes produtos de oxidação tem sido associado à doenças como Alzheimer, esquizofrenia, Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, arteriosclerose, diabetes, câncer e AVC (Yin, Xu, & Porter, 2011).

São conhecidos dois mecanismos principais pelos quais os aldeídos reagem: por base de Schiff, quando um grupo amina faz ataque nucleofílico ao carbono da carbonila, ou por adição de Michael, quando há abstração de um hidrogênio β por qualquer nucleófilo. Alguns aldeídos produtos de oxidação de biomoléculas são α,β -insaturados, o que os torna ainda mais eletrofílicos (chamados de eletrófilos moles), e preferencialmente reagem por adição de Michael com nucleófilos moles, como grupos tióis ou resíduos de cisteína (LoPachin & Gavin, 2014).

As principais vias de metabolização de aldeídos são através da ação das seguintes enzimas: aldeído desidrogenase (ALDH) que catalisa a oxidação dos aldeídos, a superfamília das álcool desidrogenases (da qual a enzima aldose redutase faz parte) que promove a redução dos aldeídos, e pela ação da glutatona-S-transferase (GSTs) que catalisa a conjugação de glutatona reduzida a vários substratos, dentre eles os aldeídos (Baba et al., 2013; O'Brien et al., 2005). Alternativamente, outros componentes celulares também podem participar das vias de metabolização de aldeídos, como a conjugação com glutatona ou com dipeptídeo contendo histidina como a carnosina (Aldini, Carini, Beretta, Bradamante, & Facino, 2002; Xie, Baba, Sweeney, & Barski, 2013).

Os exemplos de aldeídos endógenos mais estudados são:

HNE: A molécula *trans*-4-hidroxi-2(E)-nonenal (HNE) foi um dos primeiros aldeídos identificados como citotóxico. É gerado a partir da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados, como o ômega-6. Os mecanismos de formação de HNE foram revisados por Spickett (Spickett, 2013). As concentrações de HNE podem chegar a 45µM em plasma e 100 mM no interior de membranas (Loureiro, Mascio, & Medeiros, 2002).

HHE: Análogo ao HNE, o *trans*-4-hidroxi-2(E)-hexenal é gerado a partir da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados, como o ômega-3 (Long & Picklo, 2010). Apesar de ser menos estudado do que o HNE, Long et al. demonstraram que o HHE reage mais rapidamente com glutathione reduzida GSH do que HNE (Long, Rosenberger, & Picklo, 2010).

Acroleína: Este aldeído pode ser gerado endogenamente quando há estresse redox, pode vir da dieta através de alimentos fritos e produtos alcoólicos, ou pode ser inalado como um poluente proveniente da exaustão de automóveis e da fumaça de cigarro. Por sua alta reatividade é considerado uma substância tóxica de alta prioridade para agências de proteção ambiental (Moghe et al., 2015).

Acetaldeído: pode ser formado a partir da oxidação do malonaldeído, no metabolismo do álcool, e também pode ser inalado devido à poluição atmosférica e fumaça de cigarro (Hecht, McIntee, & Wang, 2001).

1.1.4. Antioxidantes e Detoxificação de Espécies Reativas

Os mecanismos de defesa contra as espécies reativas são tão variados quanto são as propriedades químicas das próprias espécies reativas (He et al., 2017). As vias de ação antioxidante de enzimas e moléculas de baixo peso molecular frequentemente se cruzam,

formando um complexo sistema para prevenir ou interromper os danos causados pelas espécies reativas, como mostrado na Figura 1.2:

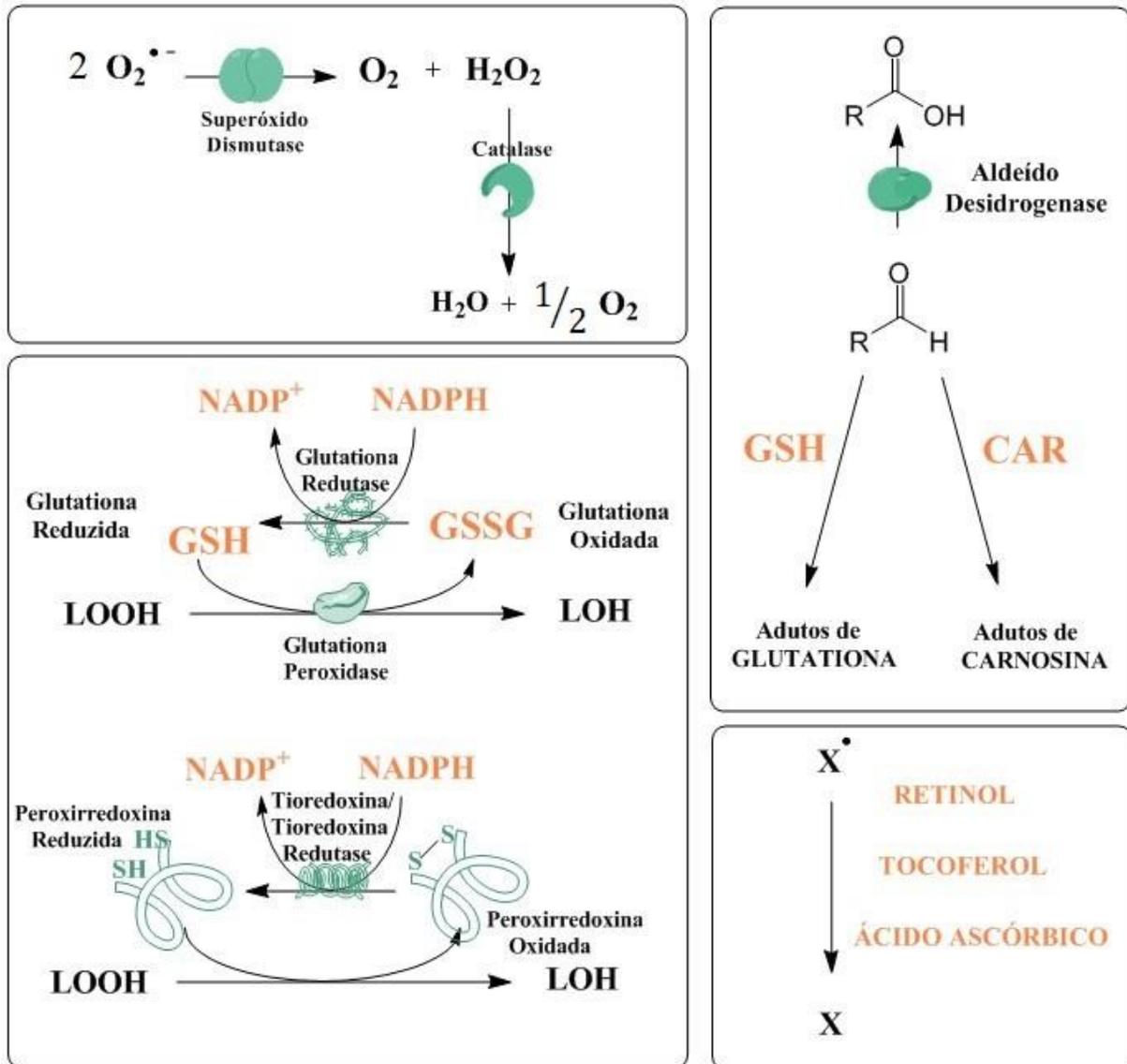
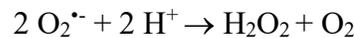


Figura 1.2. Principais antioxidantes e vias de detoxificação de espécies reativas. As principais enzimas que catalisam reações de degradação de espécies reativas estão indicadas em verde. Os principais antioxidantes de baixo peso molecular estão indicados em laranja. X^\bullet e X – substância radicalar e não radicalar, respectivamente; LOOH – hidropéroxido orgânico; LOH – álcool orgânico; CAR – carnosina.

1.1.5. Superóxido Dismutase

Uma vez que o radical superóxido é um subproduto do metabolismo do oxigênio, existe uma enzima amplamente distribuída nos organismos aeróbicos para decompor esta espécie reativa: a superóxido dismutase (SOD). A dismutação do ânion radical superóxido gera peróxido de hidrogênio e gás oxigênio como mostrado a seguir (Valentine, Doucette, & Potter, 2005):



Estão descritas três isoformas da enzima SOD em mamíferos: 1) CuZn-SOD ou SOD1, que está localizada no citoplasma; 2) EC-SOD ou SOD3 (também contém cobre e zinco como cofatores), no espaço extracelular; e 3) Mn-SOD ou SOD2 nas mitocôndrias (Zelko, Mariani, & Folz, 2002). Por estar relacionada a um interessante modelo animal de esclerose lateral amiotrófica (item 1.3), apenas a isoforma SOD1 será abordada neste texto.

A enzima Superóxido Dismutase 1 humana é um dímero de subunidades iguais, cada subunidade contendo 153 resíduos de aminoácidos, possuindo massa molecular total de 32-kDa. Contém cobre e zinco no sítio ativo. A maior parte está presente no citosol, sendo encontrada também nas mitocôndrias (espaço intra-membranar) e no núcleo (Valentine et al., 2005).

A interação da SOD1 com o H_2O_2 pode gerar um forte oxidante, o peróxido monocarbonato. Essa reação foi extensivamente estudada e a natureza do oxidante formado, muito discutida (Hodgson & Fridovich, 1975). Existem fortes evidências de que o sistema

SOD1/H₂O₂ oxida HCO₃⁻ formando CO₃^{•-} (Medinas, Cerchiaro, Trindade, & Augusto, 2007), oxidante que pode se difundir e oxidar diversos substratos em solução.

1.1.6. Carnosina

Um antioxidante de grande interesse é a carnosina, pois é encontrado em concentrações na faixa milimolar em músculo cardíaco e esquelético em mamíferos, e é detectado na maioria dos vertebrados. Carnosina é um dipeptídeo de L-histidina e β-alanina (Figura 1.3), e leva este nome porque foi descoberta pela primeira vez em amostras de carne. Variações na estrutura da carnosina, como metilação nos nitrogênios imidazólicos formando os compostos anserina e ofidina, são encontradas em vários organismos (A. A. Boldyrev, Aldini, & Derave, 2013). Até o momento o perfil de distribuição de carnosina entre os tecidos e fluídos corporais foi traçado somente em camundongos (Kamal, Jiang, Hu, Keep, & Smith, 2009) e em ratos (Aldini, Orioli, Carini, & Facino, 2004). Em humanos são encontradas principalmente a carnosina em músculo, fígado e regiões do sistema nervoso central e N-acetil-carnosina nos rins (Artioli, Sale, & Jones, 2018).

A β-alanina não é um aminoácido constituinte de proteínas humanas, por isso acredita-se que a carnosina não seja proveniente da degradação proteica. A alimentação é apontada como a principal fonte deste β-aminoácido, sendo a degradação de uracila pelo fígado uma possível fonte endógena. A histidina é um aminoácido essencial e normalmente encontrado em abundância no sangue, portanto, a concentração de carnosina depende da concentração de β-alanina e das taxas de formação e degradação enzimáticas catalisadas pela carnosina sintetase e a carnosinase, respectivamente (A. A. Boldyrev et al., 2013).

Dipeptídeos contendo histidina são bastante estáveis, suportando temperaturas de até 120

°C por 20 minutos (Aristoy, Soler, & Toldrá, 2004). O tempo de meia-vida da carnosina no músculo é de 3 a 4 semanas, assim sua distribuição indica os tecidos onde a enzima Carnosina Sintetase é majoritariamente expressa (Kwiatkowski, Kiersztan, & Drozak, 2018). Em relação à degradação da carnosina, foram identificadas duas metaloproteases: CN1, carnosinase expressa no sistema nervoso central, e CN2, uma dipeptidase citosólica não específica amplamente distribuída nos tecidos. Em animais roedores uma enzima ortóloga à CN1 foi encontrada apenas nos rins (Teufel et al., 2003).

Quando administrada oralmente, parte das moléculas de carnosina é absorvida no intestino delgado pelo transportador de oligopeptídeos PEPT1. No citoplasma dos enterócitos a carnosina pode ser hidrolisada pela CN2 liberando ambos os aminoácidos na corrente sanguínea, ou pode ser transportada através da membrana basolateral chegando intacta no sangue (A. A. Boldyrev et al., 2013). Uma segunda proteína conhecida no transporte de carnosina é a PEPT2, a qual está localizada nas células epiteliais dos túbulos renais para a reabsorção de carnosina. A PEPT2 também está expressa em células epiteliais do plexo coroide, córtex cerebral, bulbo olfatório, olhos, pulmões, baço e músculo esquelético (Kamal et al., 2009).

A primeira função fisiológica atribuída a carnosina foi como tampão nos músculos devido ao anel imidazólico da histidina (pK_a 6,72). Posteriormente, vários trabalhos atribuíram à carnosina, a atividade antioxidante sendo por diferentes mecanismos, como quelante de metais, inibidor da glicoxidação e carbonilação proteica, bem como capacidade de sequestrar oxigênio singlete, peróxidos, HOCl e aldeídos (A. A. Boldyrev et al., 2013; Kwiatkowski et al., 2018).

Kim e colaboradores mostraram que ratos suplementados com 0,5% de carnosina (porcentagem referente ao total da composição energética da dieta dos animais) apresentaram maior atividade da SOD em soro, pele e fígado. A atividade da enzima glutathione peroxidase também aumentou no fígado dos ratos suplementados (Kim, Kim, Kim, Choi, & Lee, 2011).

O papel da carnosina como sequestrador biológico de aldeídos está cada vez mais discutido na literatura (Aldini et al., 2002; Baba et al., 2013; V. H. Carvalho et al., 2018). Nosso grupo caracterizou um novo produto da adição de carnosina a um aldeído, a acroleína (V. S. Bispo, Campos, Di Mascio, & Medeiros, 2016). Estruturas de adutos aldeídicos de carnosina estão mostradas na Figura 1.3:

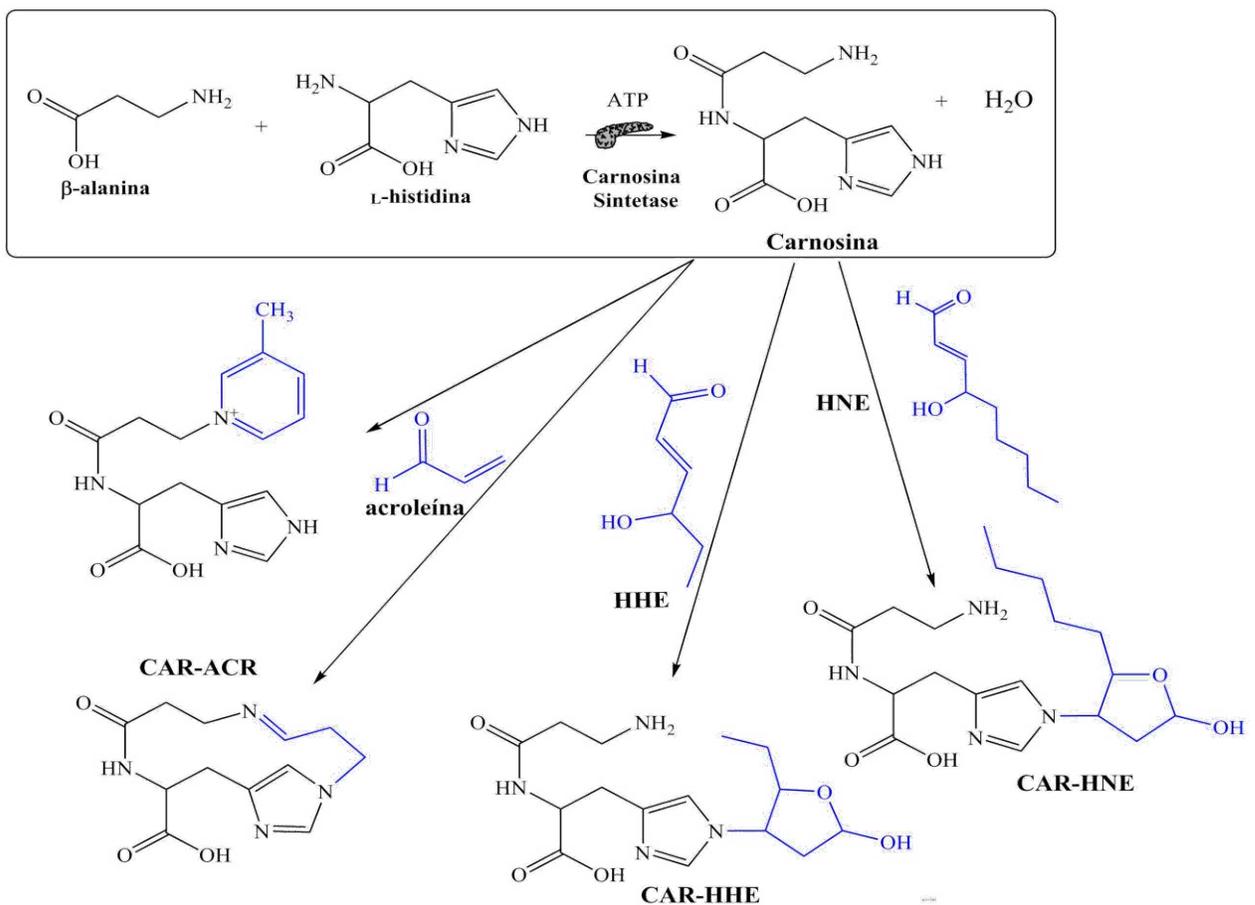


Figura 1.3. Formação da Carnosina *in vivo* catalisada pela enzima carnosina sintetase, a partir dos aminoácidos β -alanina e L-histidina. Estrutura dos produtos de alquilação da carnosina pelos aldeídos acroleína, HHE e HNE, indicados em azul. Modificado de (V. S. Bispo et al., 2016).

Barski e colaboradores calcularam as constantes de velocidade da reação de aldeídos com os dipeptídeos carnosina, anserina e homocarnosina e com o aminoácido histidina. A constante

de velocidade foi menor para os aldeídos reagindo com histidina, sendo que a reação mais eficiente e completa foi com carnosina (Barski et al., 2013). Os valores de constantes de velocidade de alguns aldeídos com carnosina estão mostrados a seguir, na Tabela 1.1.

Tabela 1.1. Constantes de velocidade de reações entre aldeídos e carnosina. Modificada de (Barski et al., 2013):

	HNE	HHE	Acroleína	4-oxononenal	Octenal
Carnosina /(M ⁻¹ s ⁻¹)	0,048 ± 0,0025	0,044 ± 0,003	0,51 ± 0,03	0,034 ± 0,0009	0,028 ± 0,002

A suplementação com carnosina como prática clínica vem sendo estudada com mais intensidade nos últimos vinte anos. Apesar de serem necessários estudos clínicos de maior escala, algumas pesquisas mostraram resultados bastante promissores do tratamento de doenças usando a carnosina, as quais foram revisadas por Artioli e colaboradores (Artioli et al., 2018). Boldyrev e colaboradores notaram que a carnosina potencializa o efeito de DOPA (dihidroxifenilalanina) em pacientes com doença de Parkinson (A. Boldyrev et al., 2008). Há indícios de que a carnosina retarda a progressão do diabetes em humanos, pois um grupo de obesos não diabéticos que receberam suplementação de carnosina tiveram menores níveis de glicose e insulina após o teste de ingestão de glicose quando comparado a um grupo controle (De Courten et al., 2016).

1.2. Lesões em DNA

Apesar de apresentar certa estabilidade química devido a sua forma natural de dupla hélice, o DNA não é inerte. Grupos químicos das bases nitrogenadas podem ser alterados por radiação, reações com compostos endógenos ou exógenos. Lesões, as quais são caracterizadas

por modificações químicas na molécula de DNA, se não forem reparadas podem causar mutações ou levar a morte celular (Halliwell & Gutteridge, 2007).

A guanina, por exemplo, reage com oxigênio singlete ou radical hidroxila, formando uma lesão conhecida como 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo) (Figura 1.4). Esta é a base nitrogenada mais susceptível à oxidação devido ao seu menor potencial de redução (Close & Wardman, 2016).

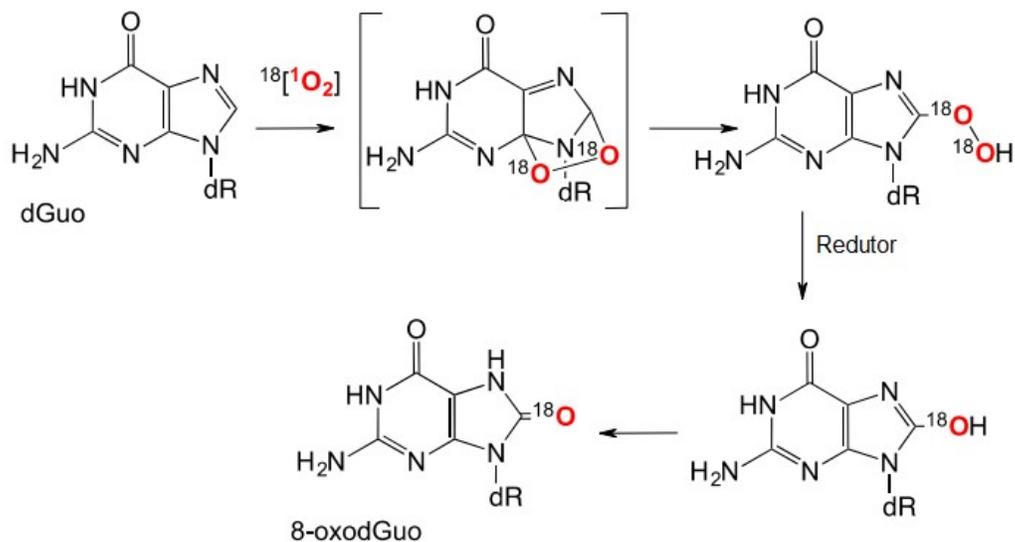


Figura 1.4. Formação de 8-oxodGuo. Em vermelho estão indicados os átomos de oxigênio com marcações isotópicas. Adaptado de (Di Mascio et al., 2016).

Estudos *in vitro* mostraram que esta lesão é mutagênica, ou seja, se não reparada leva a alterações na sequência de bases de uma determinada sequência gênica. Isso ocorre porque a 8-oxodGuo sofre uma rotação em torno da sua ligação glicosídica passando de *anti* para *syn*. Na conformação *syn* a guanina modificada faz interações com a adenina ao invés de interagir com a citosina. Assim, se a modificação for mantida até a duplicação do DNA, a sequência das bases

será alterada, alterando também a informação gênica da célula (transversão G → T) (Banda, Nuñez, Burnside, Bradshaw, & David, 2017). Há, porém, diversos mecanismos *in vivo* para reparar este dano quando incorporado ao DNA ou ainda dentre os nucleotídeos livres. O sistema de reparo diminui a frequência de mutação em células renais de macacos (COS-7) para 2,5-4,8% e em *E. coli* para apenas 1,8% (Moriya, 1993).

1.2.1. Adutos de DNA

Além da oxidação, as bases nitrogenadas também podem sofrer alquilação por subprodutos da lipoperoxidação, formando adutos de DNA (Medeiros, 2019). Alguns adutos são estudados pelo nosso grupo e padrões autênticos já foram sintetizados e caracterizados anteriormente (Angélica Bianchini Sanchez, 2017) e estão esquematizados na Figura 1.5.

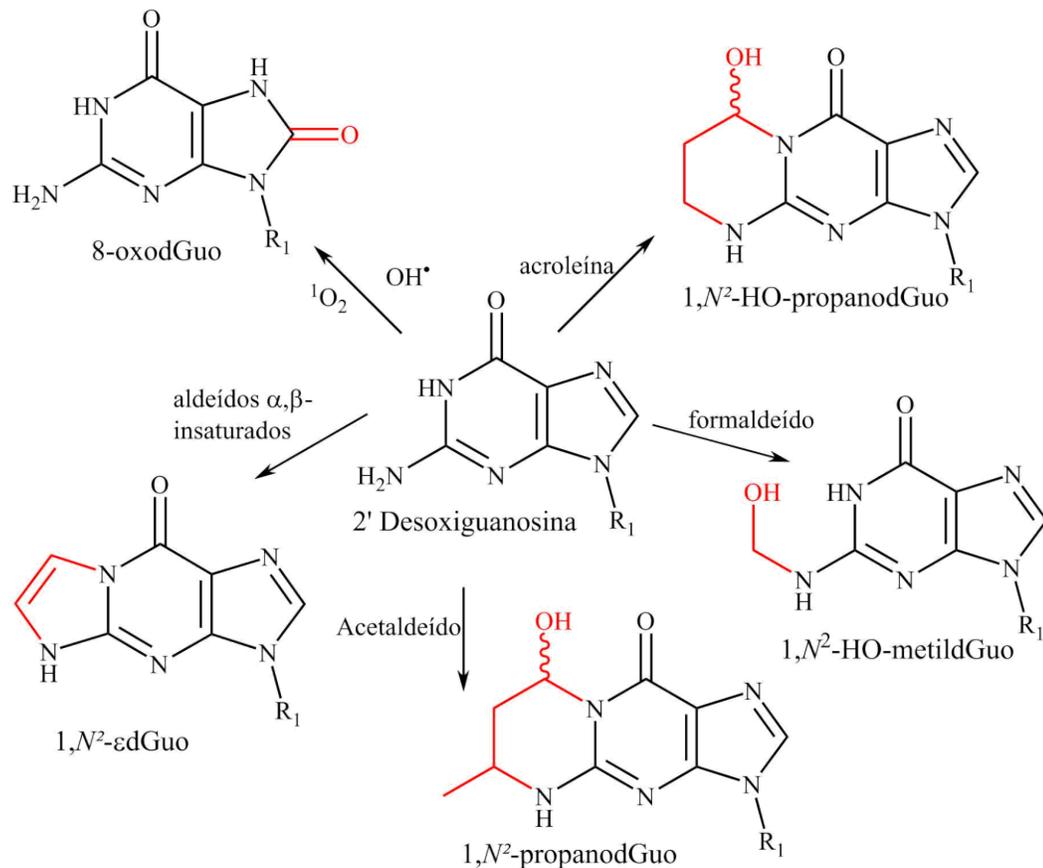


Figura 1.5. 2'-Desoxiguanosina e alguns dos produtos de oxidação e alquilação (adutos). Em vermelho estão indicadas as adições químicas à 2'-desoxiguanosina. R1 = desoxi-ribose.

Um número crescente de estudo mostra que aldeídos interagem com DNA formando adutos (Blair, 2008; Medeiros, 2019). Adutos cíclicos do tipo propanoadutos são formados a partir da adição direta de aldeídos como HNE, HHE e acroleína à nucleosídeos. Os aldeídos produtos de lipídeos peroxidados podem formar epóxidos (éter cíclico com três átomos que formam um anel) os quais também podem reagir com bases do DNA formando os etenoadutos (1,N²-εdGuo).

Nosso grupo caracterizou e demonstrou a formação de eteno adutos a partir de aldeídos de peroxidação lipídica (V. M. Carvalho et al., 2000, 1998; Loureiro, De Arruda Campos, Gomes,

Di Mascio, & Medeiros, 2004; Loureiro, Di Mascio, Gomes, & Medeiros, 2000). Nestes trabalhos foram elucidadas diferentes estruturas de produtos de reação do aldeído DDE (trans,trans-2,4-decadienal) com dGuo (2'-desoxiguanosina) e dAdo (2'-desoxiadenosina).

Formaldeído e acetaldeído tem preferência para reagir com nucleófilos como o nitrogênio 2 (N2) da 2'-desoxiguanosina, formando propano adutos (LoPachin & Gavin, 2014). Nosso grupo demonstrou a formação inequívoca deste tipo de aduto de DNA ao tratar células em cultura com [¹³C₂]-acetaldeído (Garcia et al., 2011), e posteriormente em pulmão e cérebro de ratos expostos ao [¹³C₂]-acetaldeído (Angélica B. Sanchez et al., 2018).

1.2.2. Biomarcadores

Adutos de DNA são considerados verdadeiros biomarcadores, pois estão relacionados à formação de intermediários reativos que podem se ligar ao DNA e à outras molécula (Tretyakova, Villalta, & Kotapati, 2013). Frijihoff e colaboradores fizeram uma revisão dos principais biomarcadores de estresse oxidativo e à quais doenças estão relacionados (Frijihoff et al., 2015). A oxidação do nucleosídeo 2'-desoxiguanosina foi associado ao câncer e à amiloidose sistêmica. Dentre os biomarcadores de ALS, foram listados: o fator de transcrição Nrf2, proteínas carboniladas, malonaldeído e níveis de GSH versus GSSG.

1.3. Esclerose Lateral Amiotrófica

Em 1869 Charcot descreveu pela primeira vez a degeneração motora chamada Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA, ou ALS do inglês *Amyotrophic Lateral Sclerosis*). Trata-se de uma

doença caracterizada pela degeneração progressiva dos neurônios motores acarretando atrofia, paralisia e morte. A doença se inicia pela paralisia de um membro e progride para outros membros até que a morte ocorre por insuficiência respiratória, quando os neurônios responsáveis pelo movimento do diafragma são atingidos (Charcot & Joffroy, 1869). O início da doença ou o primeiro diagnóstico é feito entre 50 e 60 anos, e por já se tratar de um estágio avançado, o paciente tem de 4 a 10 anos de vida após o diagnóstico (Taylor, Brown, & Cleveland, 2016).

Cinco mil novos casos de ALS são diagnosticados por ano nos EUA, e o total mundial atinge 1,75 casos/100.000 habitantes por ano (Luna, Logroscino, Couratier, & Marin, 2017). No Brasil a taxa de mortalidade devido à ALS para pessoas acima de 45 anos é de 1,77 a 2,3 / 100.000 pessoas por ano (Moura, Casulari, & Novaes, 2016)

A ALS é uma doença multifatorial e multissistêmica e 90% dos casos são esporádicos que são os pacientes sem antecedente familiar, ou seja, sem mutações genéticas herdadas. Diversos trabalhos têm demonstrado que a degeneração dos neurônios motores é resultado de mecanismos complexos envolvendo estresse oxidativo, excitotoxicidade por glutamato (Glu), disfunção e agregação de proteínas, problemas no transporte axonal e processos neuro-inflamatórios, os quais estão esquematizados na Figura 1.6. Ainda é difícil definir se os fatores são causa, consequência ou associação. Forma-se um ciclo vicioso, onde um fator agrava o outro (Barber & Shaw, 2010).

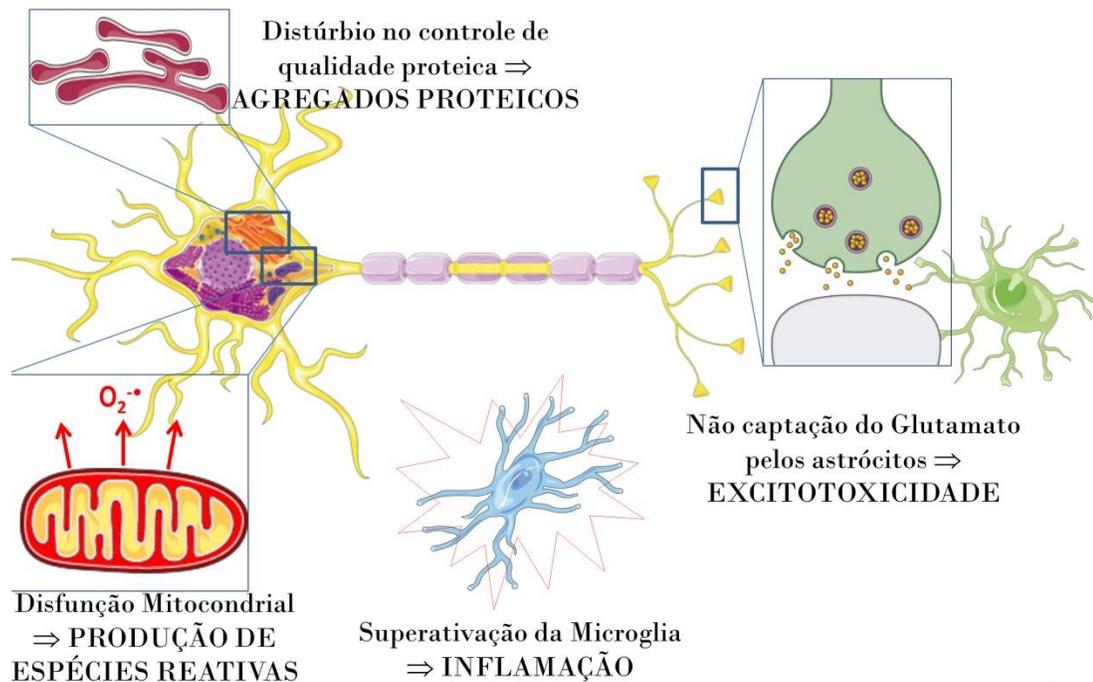


Figura 1.6. Esquema indicando os mecanismos patológicos associados à ALS. Ao centro está representado um neurônio, no qual são destacados: a organela retículo endoplasmático, a organela mitocôndria, uma célula de microglia e o terminal do axônio liberando glutamato.

A participação de estresse oxidativo na patologia de ALS é evidenciada pela presença de danos oxidativos em DNA, proteínas e lipídios nos tecidos de pacientes (Barber & Shaw, 2010; Bozzo, Mirra, & Carri, 2017).

Os casos familiares de ALS representam 10% dos casos totais, e foram associados a mutações nos genes da enzima SOD1 (*SOD1*), da proteína angiogenina (*ANG*), da proteína TDB-43 (*TARDBP*), da proteína dinactina (*Dinactina*), entre outros (Taylor et al., 2016). Mutações pontuais no gene da SOD1 representam cerca de 20% dos casos de ALS familiar e têm recebido maior atenção. Ainda não se sabe por que a forma mutante desta proteína abundante e expressa em todos os tecidos é particularmente tóxica para os neurônios motores, causando ALS. Mais de uma década de estudos extensivos forneceram fortes evidências de que um “ganho de função

tóxica” ao invés da perda da função enzimática normal da enzima é a causa da doença. Como a ALS esporádica e familiar são patologicamente indistinguíveis, acredita-se que as funções celulares alteradas como consequência da expressão da SOD1 desencadeiam vias que podem ser ativadas por outros fatores nos casos esporádicos (Schmitt & Agar, 2017).

A mutação G93A é a mais estudada devido aos camundongos transgênicos criados em 1994 (Gurney et al., 1994). Posteriormente Howland e colaboradores desenvolveram e caracterizaram ratos Sprague-Dawley transgênicos portando a mutação SOD1^{G93A} humana (Howland et al., 2002). Os animais transfectados com SOD1^{G93A} humana desenvolvem o quadro clínico de ALS, constituindo um excelente modelo para o estudo dos mecanismos da doença, enquanto que os animais que super expressam a proteína selvagem SOD humana, não apresentam sinais de doenças relacionadas ao neurônio motor.

Os animais com SOD1 humana mutante são hoje o único modelo disponível para a realização de testes pré-clínicos de novas terapias para ALS. Não há ainda um tratamento efetivo para ALS. Hoje, existe somente um medicamento aprovado (Riluzol - Rilutek[®] Sanofi Aventis), o qual aumenta a sobrevida do paciente, e diversos tratamentos paliativos (D’Amico, Factor-Litvak, Santella, & Mitsumoto, 2013).

Recentemente, em um trabalho anterior de nosso grupo, foi observado que a suplementação de animais transgênicos ALS SOD^{G93A} com carnosina via oral resultou em retardo da perda de peso em consequência da atrofia muscular e tendência de aumento da sobrevida dos animais. Investigar os mecanismos responsáveis pelo aumento dessa sobrevida estudando modificações em DNA induzidas por aldeídos reativos e a formação de adutos de carnosina-aldeídos em músculo de animais suplementados com carnosina pode resultar em informações importantes na terapia da ALS. Por ser uma doença neurodegenerativa, também é interessante investigar os adutos de DNA e carnosina em tecidos do sistema nervoso central, como cérebro e

medula.

Além do músculo, cérebro e medula, tecidos que estão diretamente relacionados com a doença, análises no fígado também podem ajudar na compreensão dos mecanismos moleculares da proteção da carnosina. Além de carnosina endógena já ter sido detectada no fígado (Artioli et al., 2018), um trabalho recente mostrou que as alterações no sistema imune em animais modelo para ALS afetaram especialmente este órgão (Gasco, Zaragoza, García-Redondo, Calvo, & Osta, 2017). Outro trabalho mostrou que os exames histológicos de pacientes com ALS apresentavam lesões gordurosas mais pronunciadas em comparação com portadores da doença de Parkinson (Dupuis et al., 2008).

A hipótese da utilização de sequestradores de aldeídos pode ser uma estratégia terapêutica que merece ser investigada em situações onde o acúmulo dessas espécies está indicado.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

Investigar processos biológicos associados à modificação em biomoléculas por aldeídos reativos e o seu mecanismo de detoxificação por carnosina em ratos transgênicos modelo de ALS.

2.2. Objetivos específicos:

- 1- Quantificar os adutos DNA-aldeídos bem como o produto de oxidação 8-oxodGuo em fígado, cérebro e medula de ratos usados no modelo experimental de ALS suplementados ou não com carnosina.
- 2- Quantificar os adutos carnosina-aldeídos e carnosina livre em fígado, músculo e cérebro de ratos usados no modelo experimental de ALS e suplementação com carnosina.
- 3- Investigar o possível papel de carnosina em animais transgênicos com relação a progressão da doença, pela análise e comparação dos níveis de adutos carnosina-aldeídos e DNA-aldeídos em fígado, músculo, medula e cérebro de ratos transgênicos modelo para ALS suplementados ou não com carnosina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes

Todas as soluções foram preparadas utilizando água deionizada obtida de um sistema Milli-Q (Millipore, Billerica, USA). Os solventes: etanol, metanol, isopropanol e acetonitrila grau HPLC e MS foram obtidos de J.T. Baker Chemical Co. (Phillipsburg, USA) ou Merck (Darmstadt, Alemanha). Ácido fórmico grau MS foi fornecido pela Merck (Darmstadt, Alemanha). [¹⁵N₅]-8-oxodGuo foi fornecido por Cambridge Isotope Laboratories (Andover, USA). EDTA, Tris-Triton-X100, cloreto de sódio, proteinase K, ribonucleases A e T1, nucleasse P1, fosfatase alcalina, dodecilsulfato de sódio (SDS) e mesilato de desferroxamina utilizados são da Sigma (St. Louis, USA). Fosfato de potássio, cloreto de magnésio, e sacarose foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

Cocktail de inibidor de protease (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Os demais reagentes citados na metodologia eram do maior grau de pureza disponível no mercado.

3.2. Equipamentos

Foram utilizados centrífuga modelo 5804 R da Eppendorf (Hamburg, Alemanha), com rotor de ângulo fixo F-45-30-11, ThermoMixer C da Eppendorf (Hamburg, Alemanha). As medidas de pH foram feitas em um pHmetro da ThermoScientific modelo OrionStar A111 (Massachusetts, USA). As incubações em banho-maria foram feitas em banho modelo 144 da Fanen (São Paulo, Brasil). Foi utilizada balança analítica da RADWAG (Radom, Poland). O liofilizador e o concentrador utilizados foram, respectivamente, FreeZone 2.5 Plus e Refrigerated

CentriVap Concentrator da empresa Labconco (Kansas City, USA). O espectrofotômetro utilizado foi o modelo UV-16508C da Shimadzu (Tóquio, Japão). O homogeneizador utilizado foi o Power Gen 1000 da Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA). Os demais equipamentos utilizados serão descritos na metodologia.

3.3. Modelo e Experimentação Animal

Ratos Sprague-Dawley transgênicos expressando SOD1^{G93A} humana, obtidos de Taconic (Germantown, USA), foram usados como modelo para a doença ALS. De acordo com Howland et al, a expressão de 8 vezes mais hSOD1^{G93A} em relação à SOD endógena na medula é suficiente para mimetizar a doença em ratos de 120-160 dias (Howland et al., 2002).

A experimentação animal foi conduzida pelo doutorando Vanderson Bispo (V. da S. Bispo, 2015). Todos os animais vieram da colônia do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, a partir de matrizes adquiridas na Taconic (Germantown, USA). Os experimentos obedeceram às diretrizes e normas preconizadas pela NIH-National Institute of Health, pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório – SBCAL e pela lei nº 11.794, Sérgio Arouca de 2008. Todos os procedimentos foram ainda revisados e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Química – USP (CEUA/IQ USP 04/2012) (V. da S. Bispo, 2015).

O estudo experimental começou com 40 animais machos, sendo 20 deles portadores do gene hSOD1^{G93A} confirmado por PCR (grupo ALS) e 20 animais selvagens da mesma ninhada como controles (grupo CTL). Cada grupo foi subdividido em outros dois grupos: os que

receberam suplementação de 1mg de L-carnosina por ml de água no bebedouro, a partir da 7^a semana de vida (grupo Car), e os animais que não receberam a suplementação na água do bebedouro, conforme mostrado na Figura 3.1. A água do bebedouro foi trocada três vezes por semana, garantindo a estabilidade da carnosina em água.

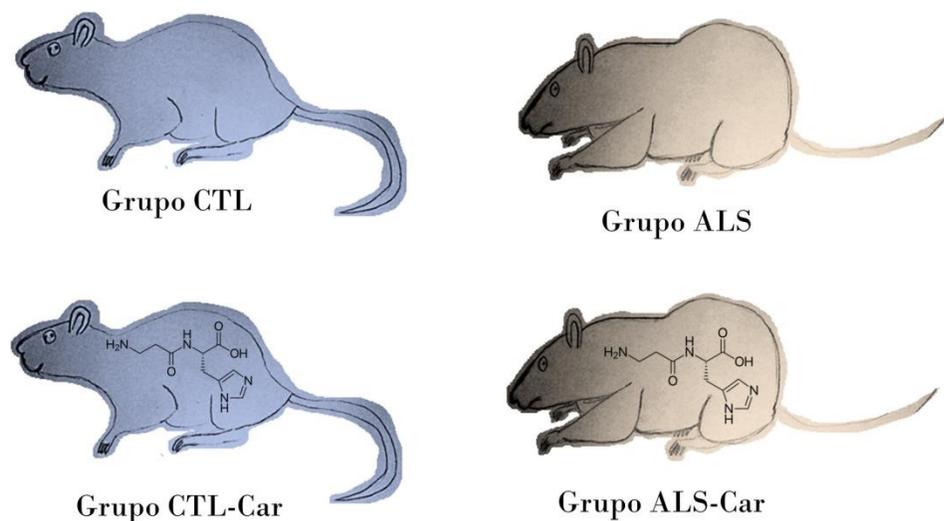


Figura 3.1. Modelo experimental no qual 40 animais foram divididos em quatro grupos: selvagens com e sem suplementação de carnosina (CTL-Car e CTL respectivamente), e ratos transgênicos hSOD1^{G93A} com e sem suplementação de carnosina (ALS-Car e ALS respectivamente). A suplementação foi feita na água do bebedouro na concentração de 1mg/ml.

Como esse foi um primeiro estudo sobre efeito da carnosina em ALS, a concentração da carnosina oferecida na água foi ajustada considerando os dados descritos por Herculano e colaboradores em estudos com camundongos e Alzheimer (Herculano et al., 2013).

A Figura 3.2 (A) indica que a adição de carnosina na água oferecida aos animais não causou recusa e que a quantidade de carnosina consumida entre os grupos que receberam o suplemento foi praticamente a mesma, em torno de 35 ± 5 mg carnosina/animal/semana.

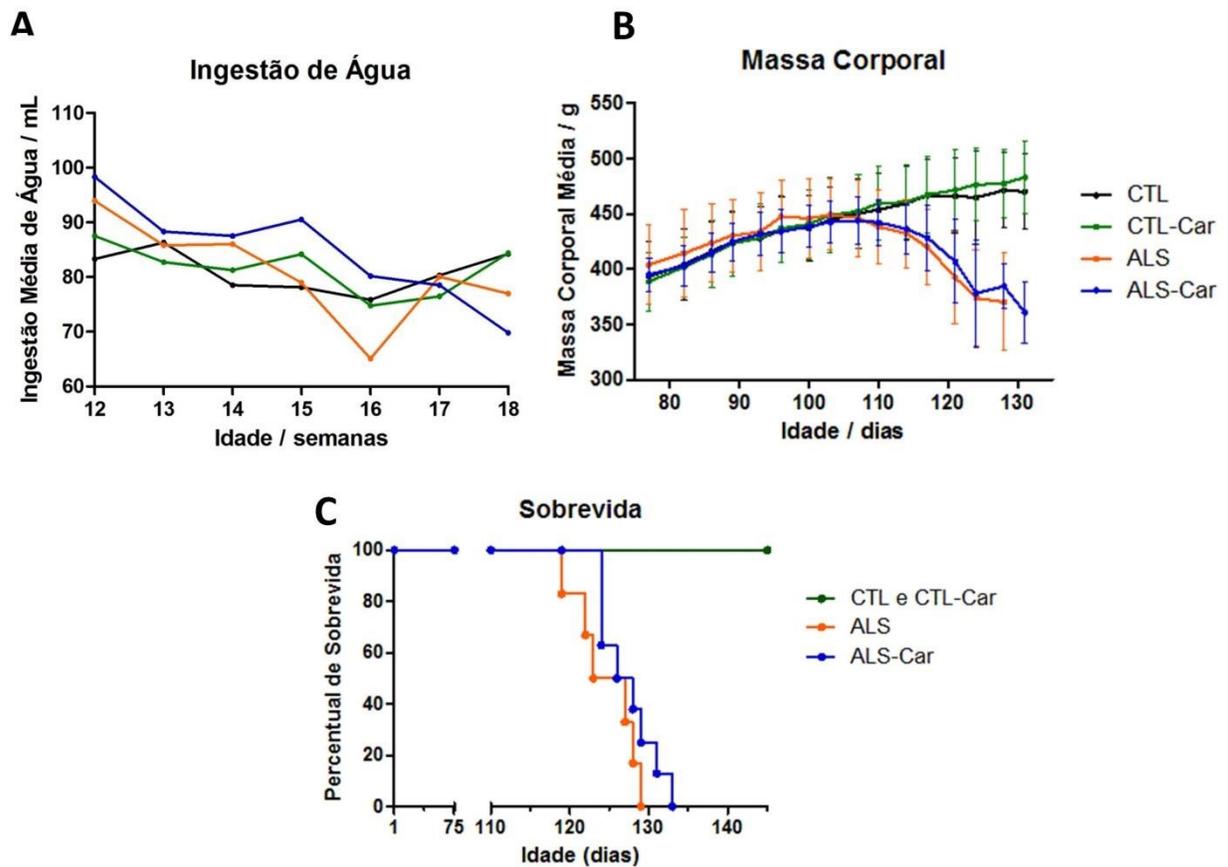


Figura 3.2. Resumo dos resultados da experimentação animal. (A) Acompanhamento do consumo hídrico médio dos animais a cada semana. (B) Acompanhamento de massa corporal média dos animais pertencentes a cada grupo experimental: CTL (n=10), CTL-Car (n=8), ALS (n=6) e ALS-Car (n=8). O teste estatístico utilizado para comparar os grupos CTL e ALS foi o *Mann-Whitney*, $p=0,0093$. (C) Gráfico de sobrevivência estimada por Kaplan-Meier para os animais ALS suplementados (ALS-Car) ou não suplementados com carnosina (ALS). O teste estatístico utilizado para comparar os dois grupos foi o *logrank*, $p=0,2$. Retratamento dos dados anteriormente apresentados por Bispo (V. da S. Bispo, 2015).

Conforme mostraram trabalhos usando o mesmo modelo experimental (Howland et al., 2002; Linares et al., 2013) e de acordo com o sistema de avaliação da doença proposto por Matsumoto et al. em ratos transgênicos SOD^{G93A} (Matsumoto et al., 2006), a progressão da doença foi quantificada pela perda de peso dos animais. A Figura 3.2 (B) mostra que os animais controles apresentaram ganho de massa corporal contínua no período avaliado. Porém, os animais

ALS apresentaram um pico de massa por volta dos 110 dias de vida, perdendo massa a partir desta idade.

Para evitar o sofrimento dos animais, os ratos transgênicos sofreram eutanásia após apresentarem 20% de diminuição de massa em relação a maior massa no período observado. Os animais controles sofreram eutanásia com 145 dias de vida. Para o grupo ALS, a sobrevida dos animais recebendo ou não a suplementação, foi estimada pelo método de Kaplan-Meier (Colosimo & Giolo, 2010). Para testar se estas duas populações conceituais de animais apresentam a mesma sobrevivência, foi utilizado o teste *logrank* (Colosimo & Giolo, 2010). Essas técnicas consideram que, no grupo ALS, podem ser observados ratos que são sacrificados devido à perda de peso (falhas) e, eventualmente, animais que morrem por outras causas ou não apresentaram perda de peso ao final dos 145 dias de acompanhamento (censuras).

A comparação da sobrevida nos grupos ALS e ALS-Car pode ser vista na Figura 3.2 (C). Apesar de não existir diferença estatística entre os grupos ALS e ALS-Car ($p = 0,2$) observa-se uma tendência de aumento na sobrevida dos animais suplementados.

Ao longo do tratamento alguns ratos ALS foram excluídos do experimento animal por demorarem a apresentar o fenótipo típico da doença, como a perda de peso e a não paralisia das patas dianteiras, que são os primeiros membros a serem afetados. Sendo assim, restaram seis animais no grupo ALS e oito animais no grupo ALS-Car. Depois dos animais serem eutanasiados, os tecidos foram retirados e estocados em freezer -80°C .

3.4. Extração de DNA

Algumas modificações foram feitas a partir da metodologia desenvolvida pela doutoranda

Angélica Sanches (Angélica Bianchini Sanchez, 2017).

Cerca de 200 e 300 mg de tecido de fígado (lóbulo médio), medula ou cérebro (sem o córtex e o cerebelo) foram homogeneizados em 4 mL de tampão A (sacarose 320 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris-HCl 10 mM, desferroxamina 0,1 mM, 1% de Triton X-100, pH 7,5) e centrifugados a $1.300 \times g$ (3.500 rpm) por 10 min a 4°C. O precipitado foi ressuspensionado em 5 mL de tampão A e centrifugado novamente nas mesmas condições. O precipitado foi ressuspensionado em 2,4 mL de tampão B (Tris-HCl 10 mM, EDTA-Na₂ 5 mM, desferroxamina 0,15 mM, pH 8,0) e 75 µL de uma solução de SDS 10% (m/v). A esta solução foram adicionados 60 µL de uma solução 10 mg/mL de RNase A (em tampão acetato de sódio 10 mM, pH 5,0, previamente fervida por 10 min) e 16 µL de uma solução 20 U/µL de RNase T1 (em tampão Tris-HCl 10 mM, EDTA-Na₂ 1 mM, desferroxamina 2,5 mM, pH 7,4). A amostra foi incubada a 37°C por 1 hora. Em seguida, foram adicionados 675 µL de uma solução de SDS 10% (m/v), e 60 µL de uma solução de proteinase K 20 mg/mL. Após outra incubação a 37°C por 2 horas e centrifugação a $12.800 \times g$ (11.000 rpm) por 15 min, adicionou-se 10% do volume total (cerca de 300 µL) de solução de iodeto de sódio (NaI 7,6 M, Tris-HCl 40 mM, EDTA-Na₂ 20 mM, desferroxamina 0,3 mM, pH 8,0) ou solução de NaCl 5 M nas amostras de fígado. Depois de 20 min. de incubação a 4°C, seguiu-se nova centrifugação a $8.600 \times g$ (9.000 rpm) por 15 min. O sobrenadante foi coletado e a ele adicionado 5 mL de isopropanol gelado. O tubo foi mantido no freezer (-20°C) por uma noite para precipitação do DNA.

Depois se seguiu uma centrifugação de $10.600 \times g$ (10.000 rpm) por 15 min. O precipitado foi coletado e lavado cuidadosamente com 4 mL de isopropanol 100%. Centrifugado a $1.300 \times g$ (3.500 rpm) por 5 min. a 4°C e descartado o sobrenadante. O mesmo processo foi repetido para lavagem com 4 mL de isopropanol 60% e 2 mL de etanol 70%. Descartado o

sobrenadante, o DNA depois de seco no liofilizador *SpeedVac*, foi ressuscitado em 100 μL de desferroxamina 3 mM. A concentração e pureza foram determinadas, respectivamente, pela leitura da absorbância a 260 nm e pela relação Abs260/Abs280, maior que 1,7 pelo espectrofotômetro *DeNovix DS-11+Spectrophotometer* (DeNovix, Wilmington, Delaware, USA).

3.5. Hidrólise Enzimática de DNA

A 150 μg de DNA foram adicionados 5 μL de tampão acetato de sódio (3,0 M, pH 5,0), 25 μL de nuclease P1 (0,4 U/ μL) e 7,6 μL de uma solução contendo todos os padrões internos dos adutos utilizando 2'-desoxiguanosina isotopicamente marcada [$^{15}\text{N}_5$] (100 fmol/ μL de 8-oxodGuo, 1, N^2 -HO-MedGuo, 1, N^2 -HO- propanodGuo, 1 fmol/ μL de 1, N^2 - ϵ dGuo, 2 fmol/ μL de 1, N^2 -propanodGuo). Depois de misturada em vórtex e centrifugada com o mini-centrífuga, a mistura foi incubada por 1 hora e 30 min. a 37°C no escuro e agitação de 550 rpm. Em seguida, adicionou-se 7 μL de tampão Tris-HCl (3,0 M, pH 7,4), 5 μL de tampão para fosfatase alcalina (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, MgCl₂ 5mM, ZnCl₂ 0,2 mM e 50% de glicerol, pH 6,0) e 25 μL de fosfatase alcalina (0,2 U/ μL). Seguiu-se a incubação a 37°C por 1 hora e agitação de 550 rpm. As amostras foram avolumadas para 210 μl e injetados 100 μL no HPLC-ESI+-MS/MS. Os resultados foram normalizados pela concentração de 2'-desoxiguanosina (dGuo) não modificada, quantificada em HPLC Agilent (Califórnia, USA) pelo detector de arranjo de diodo Agilent 1200 DAD G1315C. As medidas de dGuo foram feitas simultaneamente à detecção dos adutos de DNA, descrita na seção 3.6. Esta metodologia descrita originalmente no trabalho de Fiala e colaboradores (Fiala, Conaway, & Mathis, 1989) e adaptada posteriormente em nosso grupo (Angélica Bianchini Sanchez, 2017).

3.6. Quantificação de Adutos de DNA por HPLC-ESI⁺-MS/MS

Para a separação dos adutos foi utilizado um sistema HPLC Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, USA) constituído por um auto injetor Agilent 1200 High Performance resfriado a 4 °C, Bomba Agilent 1200 *Binary Pump* SL, detector Agilent 1200 DAD G1315C, forno de coluna Agilent 1200 G1216B a 30 °C e uma válvula automática para redirecionamento de fluxo em alta pressão. Foram empregados todos os padrões internos dos adutos utilizando 2'- desoxiguanosina isotopicamente marcada [¹⁵N₅]. Os adutos de DNA foram, separados inicialmente em coluna analítica Luna C18(2) 250 mm x 4.6 mm i.d., 5 µm (Phenomenex, Torrance, CA), de acordo com o método gradiente de água e acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico, descrito na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Gradiente de ácido fórmico 0,1% em solução aquosa, e ácido fórmico 0,1% em acetonitrila utilizado durante a análise em sistema HPLC-ESI⁺-MS/MS para detecção dos adutos de DNA:

Tempo /min	% ACN	Fluxo /(µL/min)
0,01	5,0	500
10,00	12,0	250
15,00	12,0	250
40,00	40,0	250
41,00	95,0	500
45,00	95,0	500
46,00	5,0	500
50,00	5,0	500

Uma segunda bomba Agilent 1200 *Isocratic Pump* SL foi usada para alimentar a segunda coluna Luna C18(2) 150 mm x 2 mm i.d., 3 μ m (Phenomenex, Torrance, CA), com fluxo isocrático de 250 μ L/min e solução de 20% de acetonitrila contendo 0.1% ácido fórmico, que estava sendo usada para manter um fluxo constante para o espectrômetro de massa durante a análise. Uma válvula para direcionar o fluxo troca duas vezes de posição: aos 17 min, permitindo que o eluente da primeira coluna, que até o momento era descartado, entre na segunda coluna e em seguida no espectrômetro de massa, e aos 40 min, permitindo a lavagem e o equilíbrio da primeira coluna, como mostrado na Figura 3.3. O tempo total desta análise é de 50 min.

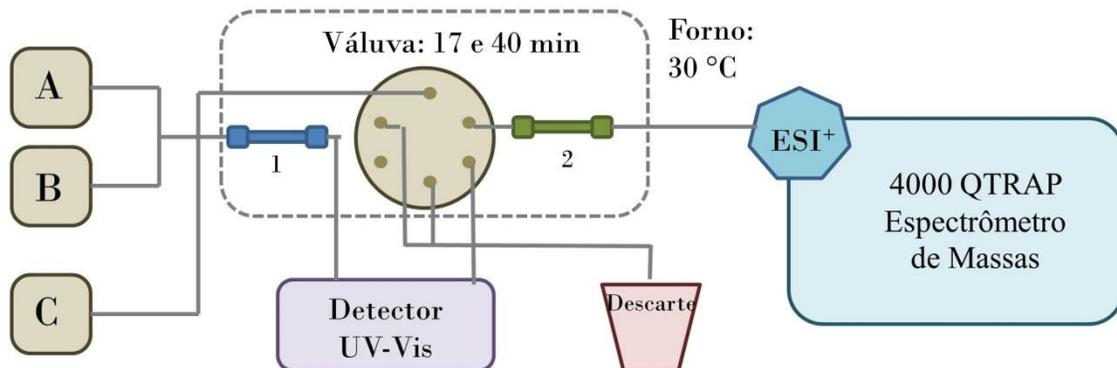


Figura 3.3. Esquema representativo da configuração do método HPLC-ESI⁺-MS/MS para detecção de adutos de DNA. A, B e C representam os módulos do HPLC que bombeiam respectivamente os solventes: água com 0,1% de ácido fórmico, acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico, e água com 20% de acetonitrila e 0.1% ácido fórmico. Os números 1 e 2 representam respectivamente as colunas cromatográficas: Luna C18(2) 250 mm x 4.6 mm i.d., 5 μ m e Luna C18(2) 150 mm x 2 mm i.d., 3 μ m.

Os adutos foram analisados com ionização por *electrospray* (ESI) no modo positivo e detecção por monitoramento de reação selecionada (SRM) em um espectrômetro de massa triplo quadrupolo API 4000 Q-TRAP (AB Sciex, Washington D.C., WA) sendo o terceiro quadrupolo uma câmara híbrida íon trap. As transições escolhidas para os íons estão dispostas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Transições selecionadas a partir de otimização para os adutos de DNA e os respectivos padrões internos analisados por HPLC-ESI⁺-MS/MS:

Aduto	Transições [M+H]⁺	Padrão Interno	Transições [M+H]⁺
1,N ² -HO-MedGuo	298,100→181,900	[¹⁵ N ₅]-1,N ² -HO-MedGuo	303,100→186,900
	298,100→164,000		303,100→169,000
8-oxodGuo	284,100→167,900	[¹⁵ N ₅]-8-oxodGuo	289,100→172,900
	284,100→140,000		289,100→145,000
1,N ² -HO-propanodGuo	324,100→208,000	[¹⁵ N ₅]-1,N ² -HO-propanodGuo	329,100→213,000
	324,100→189,900		329,100→194,900
1,N ² -εdGuo	292,100→176,000	[¹⁵ N ₅]-1,N ² -εdGuo	297,100→181,000
	292,100→121,000		297,100→153,000
	292,100→148,000		
1,N ² -propanodGuo	338,100→222,000	[¹⁵ N ₅ ¹³ C ₄]-1,N ² -propanodGuo	347,100→231,000
	338,100→178,000		347,100→185,000

Todos os parâmetros do espectrômetro de massa foram ajustados para aquisição da melhor transição $[M+H]^+ \rightarrow [M+H-2-D\text{-erythro-pentose}]^+$ como transição de maior intensidade e portanto, de quantificação, além de uma segunda ou terceira transição para confirmação estrutural. A curtain gas foi de 20 psi, temperatura 550 °C, gás de nebulização e gás auxiliar 40 psi, voltagem aplicada no spray de íons na Fonte Turbo Ion Spray +5500 V, gás de colisão alto, aquecimento da *Interface Heater* ativado em 100 °C e o potencial de entrada fixado em 10 V. Os dados foram adquiridos e tratados com o software Analyst 1.6 (AB Sciex, Washington D.C., WA).

3.6.1. Curvas de Calibração

Foram construídas curvas de calibração para cada um dos cinco em relação aos padrões isotopicamente marcados correspondentes. As concentrações dos padrões variaram de 0,1 nM a 50 nM, sendo adicionados em cada amostra os padrões isotopicamente marcados na concentração aproximada dos mesmos nas amostras para que não houvesse supressão. Cada curva foi construída pela relação entre as áreas de cada aduto e seu respectivo padrão marcado versus a quantidade de padrão não marcado adicionado.

Também foi feita uma curva de 2'-desoxiguanosina não modificada para normalizar os dados adquiridos por MS para cada amostra. A concentração de 2'-desoxiguanosina (dGuo) foi quantificada pela área da absorbância no comprimento de onda de 254 nm.

3.7. Extração de Carnosina e seus Adutos

A extração e a análise de carnosina e seus adutos foram feitas conforme descrito por Victor Carvalho et al. (V. H. Carvalho et al., 2018) com algumas modificações.

Alíquotas de fígado (lóbulo médio), músculo (pata traseira), medula ou córtex (lado direito) (200 mg) foram homogeneizadas em tampão C (KH_2PO_4 150 mM pH 6.0, EDTA- Na_2 1 mM, DTT 1 mM, e mistura de inibidor de protease diluída 1:1000 (Sigma, MO)) em volume (μL) igual a 3 vezes o valor da massa (mg) do tecido de cada amostra. Os padrões internos CARd4, CAR-HHed₅ e CAR-HNEd₁₁ foram adicionados para concentração final de 10 nM. Então o homogenato foi submetido à centrifugação $13.000 \times g$ (11.000 rpm) por 20 min e o sobrenadante foi coletado. Uma parte do sobrenadante (aprox. 100 μL) foi reservada para posterior análise da concentração de proteína através do método colorimétrico por reação com o ácido bicinonínico

usando o kit comercial Pierce™ BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) – instruções indicadas pelo fabricante. Outra parte do sobrenadante foi reservada para a determinação de proteína carbonilada (item 3.8). A absorbância foi medida usando o equipamento espectrofotômetro *NanoDrop* 1000 (Thermo Scientific, Massachusetts, USA)

Em 100 µL do sobrenadante foram adicionados 3 µL de HClO₄ 70% (v/v) para precipitar proteínas da amostra e deixar apenas os peptídeos menores. Após agitação em vórtex a solução foi deixada em repouso a 4°C por 15 min. e centrifugada a 13.000 × g (11.000 rpm) por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o pH foi ajustado para 5 usando solução NaOH 10 M. Antes de ser analisada no sistema HPLC-MS/MS, a amostra foi filtrada em membrana de 0,1 µm usando tubos de filtração e centrifugação Millipore Cat No. UFC30VV00 (Millipore, Bedford, Massachusetts) por centrifugação a 13.000 × g (11.000 rpm) por 10 min.

A análise da concentração de carnosina e seus adutos foi feita conforme a metodologia descrita no item 3.9.

3.8. Quantificação de Proteína Carbonilada

O conteúdo de proteína carbonilada foi quantificado espectrofotometricamente usando o derivatizante 2,4-dinitro-fenilhidrazina (DNPH) como descrito por Colombo et al. (Colombo et al., 2016). O primeiro sobrenadante obtido na extração descrita na seção 3.8 (antes da precipitação de proteína), foi diluído com tampão C para a concentração final de 1 mg de proteína/mL de volume final de 1 mL. Então foram feitas duas alíquotas de 400 µL desta solução e adicionados 200 µL de DNPH 10 mM (em HCl 2 M) em uma alíquota, e 200 µL de HCl 2 M em outra alíquota e o protocolo segue igual para ambas as soluções. Após misturar as soluções

em vórtex e incubá-las no escuro a 1000 rpm por 1 hora a 25°C, foram adicionados 600 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (v/v) e as amostras foram incubadas por 15 min. a 4°C. Depois as amostras foram centrifugadas a 15.000 × g por 20 min. e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 1 mL de TCA em cada precipitado e homogeneizou-se as amostras em vórtex, e foram centrifugadas a 15.000 × g por 5 min. O precipitado foi lavado com 1 mL de solução etanol e acetato de etila 1:1 e centrifugado a 15.000 × g por 5 min. e o sobrenadante descartado. A lavagem se repetiu até o precipitado não apresentar coloração, que indica que todo o DNPH livre foi removido.

O precipitado final foi submetido a secagem em um concentrador a vácuo para a evaporação do solvente (aprox. 5 min. para não ressecar o sólido) e ressuspendido em 1 mL de cloreto de guanidina 6 M. A absorbância das soluções foi medida em duplicata usando placa de 96 poços (200 µL de volume em cada poço – caminho óptico = 0,5 cm) e leitor de microplaca Espectrofotômetro *Infinite* M200 (TECAN, Männedorf, Suíça) no comprimento de onda 366 nm. A diferença entre a absorbância da amostra tratada com DNPH e a tratada com HCl foi usada para o cálculo de proteína carbonilada conforme mostra a seguinte equação:

$$[\text{Proteína Carbonilada } (\mu\text{M})] = (\text{Abs}_{\text{DNPH-HCl}} / (0.022 \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times 0.5 \text{ cm}))$$

3.9. Quantificação de Carnosina e seus adutos por HPLC-ESI⁺-MS/MS

A metodologia HPLC-MS/MS para a análise e quantificação de carnosina e seus adutos utilizada neste trabalho foi conforme descrito por Victor Carvalho et al. (V. H. Carvalho et al., 2018) com algumas modificações.

Para a separação dos analitos de interesse foi utilizado um sistema HPLC Agilent (Agilent

Technologies, Santa Clara, Califórnia, USA) constituído por um auto injetor Agilent 1200 High Performance resfriado a 4 °C, Bomba Agilent 1200 *Binary Pump* SL, detector Agilent 1200 DAD G1315C, forno de coluna Agilent 1200 G1216B a 45 °C e uma válvula automática para redirecionamento de fluxo em alta pressão. Foram empregados todos dois padrões internos de adutos de carnosina e carnosina isotopicamente marcada com deutério. Os analitos foram separados inicialmente em coluna analítica Kinetex C18 100 mm x 4.6 mm i.d., 2,6 µm (Phenomenex, Torrance, CA), de acordo com o método gradiente de acetato de amônio 5 mM pH 5,5 e acetonitrila, descrito na Tabela 3.3.

Tabela 3.3. Gradiente de acetato de amônio 5 mM pH 5,5 e acetonitrila utilizado durante a análise em sistema HPLC-ESI⁺-MS/MS para detecção de carnosina e seus adutos:

Tempo /min	% ACN	Fluxo /(µL/min)
0,01	10,0	150
6,00	10,0	150
10,00	90,0	300
15,00	90,0	300
20,00	10,0	150
30,00	10,0	150

Uma segunda bomba Shimadzu 10-AVp *Isocratic Pump* (Shimadzu, Tóquio, Japão) foi usada para alimentar a segunda coluna analítica Kinetex C18 100 mm x 2.1 mm i.d., 2,6 µm (Phenomenex, Torrance, CA) com fluxo isocrático de 150 µL/min e solução de acetato de amônio 5 mM pH 5,5 com 10% de acetonitrila, que estava sendo usada para manter um fluxo

constante para o espectrômetro de massa durante a análise. Uma válvula para direcionar o fluxo troca duas vezes de posição: aos 3 min, permitindo que o eluente da primeira coluna, que até o momento era descartado, entre na segunda coluna e em seguida no espectrômetro de massa, e aos 14 min, permitindo a lavagem e o equilíbrio da primeira coluna, como mostrado na Figura 3.4. O tempo total desta análise é de 30 min.

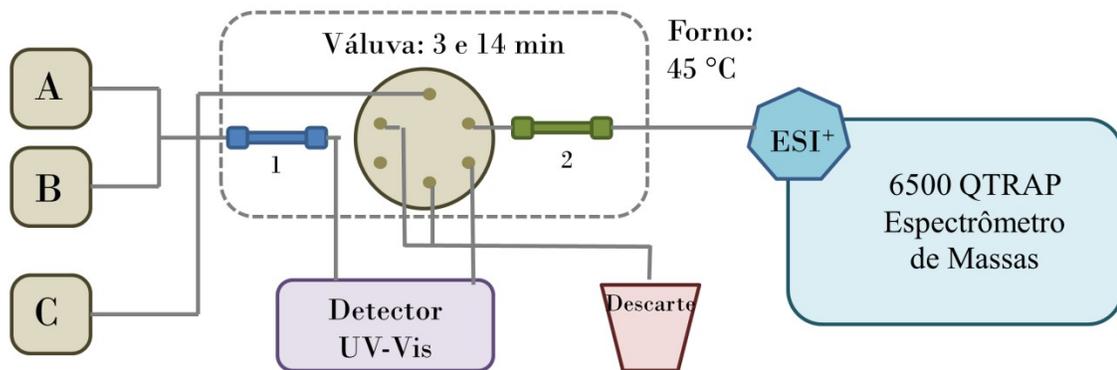


Figura 3.4. Esquema representativo da configuração do método HPLC-ESI⁺-MS/MS para detecção de carnosina e seus adutos. A, B e C representam os módulos do HPLC que bombeiam respectivamente os solventes: acetato de amônio 5 mM e pH 5,5, acetonitrila, e acetato de amônio 5 mM com 10% de acetonitrila. Os números 1 e 2 representam respectivamente as colunas cromatográficas: Kinetex C18 100 mm x 4,6 mm i.d., 2,6 μm e Kinetex C18 100 mm x 2,1 mm i.d., 2,6 μm.

Os adutos foram analisados com ionização por *electrospray* (ESI) no modo positivo e detecção por monitoramento de reação selecionada (SRM) em um espectrômetro de massa triplo quadrupolo API 6500 Q-TRAP (AB Sciex, Washington D.C., WA) sendo o terceiro quadrupolo uma câmara híbrida íon trap. As transições escolhidas para os íons estão dispostas na Tabela 3.4.

Tabela 3.4. Transições selecionadas a partir de otimização para carnosina e seus adutos, e os respectivos padrões internos analisados por HPLC-ESI⁺-MS/MS:

Aduto	Transições [M+H] ⁺	Padrão Interno	Transições [M+H] ⁺
Carnosina	227,062→110,085	Carnosina- <i>d</i> ₄	231,000→110,000
	227,062→210,000		231,000→214,000
Carnosina- Acroleína	303,148→110,100	Carnosina-	346,137→329,300
	303,148→166,100		HHE- <i>d</i> ₅
	303,148→210,100		346,137→110,100
Carnosina- HHE	341,034→324,200	Carnosina-	346,137→329,300
	341,034→224,000		HHE- <i>d</i> ₅
	341,034→110,000		346,137→110,100
Carnosina- HNE	383,205→366,200	Carnosina-	394,289→377,200
	383,205→266,000		HNE- <i>d</i> ₁₁
	383,205→110,100		394,289→110,100

Todos os parâmetros do espectrômetro de massa foram ajustados para aquisição de uma transição de maior intensidade e, portanto, de quantificação, além de uma segunda ou terceira transição para confirmação estrutural. A *curtain gas* foi de 15 psi, temperatura 500 °C, gás de nebulização e gás auxiliar 50 psi, voltagem aplicada no spray de íons na Fonte Turbo Ion Spray +5500 V, gás de colisão alto, aquecimento da *Interface Heater* ativado em 100 °C e o potencial de entrada fixado em 10 V. Os dados foram adquiridos e tratados com o software Analyst 1.6 (AB Sciex, Washington D.C., WA).

3.10. Análises Estatísticas

O tratamento dos dados adquiridos por espectrometria de massas e os cálculos feitos para determinar as concentrações de cada aduto foram feitos conforme descrito no trabalho de Traube e colaboradores (Traube et al., 2019).

O teste estatístico utilizado para analisar a curva de sobrevivência estimada pelo método de Kaplan-Meier (Figura 3.2) foi o teste *logrank*, através do programa RStudio, versão 1.1.456 (RStudio Team (2016) RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, Massachusetts, USA, <http://www.rstudio.com/>). Os gráficos mostrados nas Figuras 4.1, 4.2, 4.3 e 4.5 foram gerados pelo programa Microsoft Excel, versão 14.0.7190.5000 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA).

Todos os demais gráficos e análises estatísticas apresentadas neste trabalho foram feitas usando o GraphPad Prism versão 5.01 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com). Na comparação de grupos foi usado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, duas caldas para p-valores e intervalo de confiança igual a 95%. Nos gráficos de quantificação de adutos de DNA, carnosina e proteína carbonilada, cada ponto representa um animal, a barra horizontal maior indica a média do grupo, e as barras horizontais menores indicam o erro padrão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Desenvolvimento da Metodologia para Quantificação de Adutos de DNA por HPLC-ESI⁺-MS/MS

O método para detecção simultânea das cinco modificações de DNA (Figura 1.5) foi modificado e padronizado utilizando como base uma metodologia estabelecida anteriormente (Angélica Bianchini Sanchez, 2017). Parâmetros foram modificados para adaptar a metodologia à análise das amostras biológicas, pois apesar de passarem por lavagens (itens 3.4 e 3.5), as soluções podem conter interferentes que prejudicam a análise. Foi usado o padrão interno [¹⁵N₅-¹³C₄]-1,N²-propanodGuo pois na matriz biológica haviam moléculas com as mesmas transições do padrão [¹⁵N₅]-1,N²-propanodGuo.

Um cromatograma representativo de DNA hidrolisado é mostrado na Figura 4.1. A detecção por absorvância no UV no comprimento de onda 260 nm, é mostrada no lado direito superior da mesma figura. Os quatro sinais em forma de pico no cromatograma de absorvância em 260 nm indicam que a hidrólise do DNA foi bem sucedida, pois os quatro nucleosídeos são detectados e estão bem separados.

Os dados foram adquiridos pelo espectrômetro de massas no modo de monitoramento de reação selecionada (SRM). Neste modo o íon precursor é isolado, fragmentado e posteriormente apenas os íons produtos selecionados são monitorados. Cada par ‘íon precursor’ e ‘um de seus fragmentos’ constitui uma transição (curva do cromatograma de massas). Na presente metodologia foram selecionadas pelo menos duas transições de massa previamente estabelecidas para cada molécula (Tabela 3.2) A transição mais intensa é usada para o cálculo da área do pico, para quantificação da substância na amostra e por isso chamada de transição de

quantificação. Com o objetivo de confirmar a identidade da molécula alvo na amostra, foram estabelecidas transições de confirmação com base no padrão de fragmentação dos padrões. Estas transições estão indicadas como linhas mais claras e mais escuras, respectivamente no cromatograma (Figura 4.1).

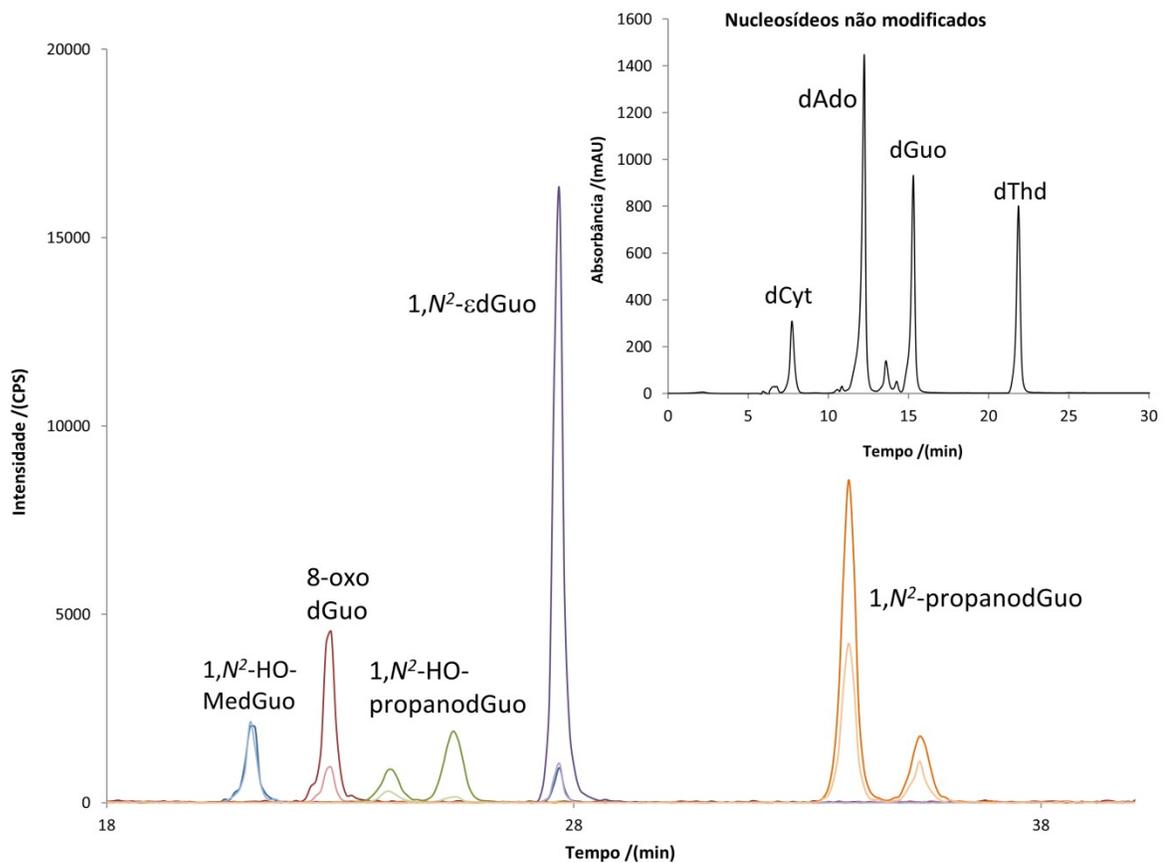


Figura 4.1. Cromatograma representativo da metodologia estabelecida para detectar cinco modificações de dGuo usando amostra de DNA com os padrões de cada aduto. Na primeira parte do cromatograma (de 5 até 22 minutos) são detectados os nucleosídeos não modificados, por absorvância em 260 nm. O primeiro aduto é eluído aos 21 min e o último, o isômero 6S e 8S, aos 35 e 36,5 min, os quais são detectados pelo espectrômetro de massas. As linhas mais intensas e as mais claras de cada pico representam a transição de quantificação e a transição de confirmação, respectivamente.

A Figura 4.1 mostra a detecção de todos os adutos com separação por linha de base indicando, portanto, que o método foi desenvolvido com sucesso e permite a quantificação simultânea dos cinco adutos de DNA. Este método é chamado de Adutoma, pois permite analisar de uma só vez um amplo espectro de modificações na 2'-desoxiguanosina, podendo assim conhecer o perfil de adutos de DNA em determinada amostra.

4.1.1. Curvas de Calibração

Para quantificação precisa e reprodutível por espectrometria de massas, é comumente usada a técnica de diluição isotópica. Esta consiste em adicionar moléculas análogas, ou mais parecidas possível com o analito de interesse, de preferência utiliza-se padrão autêntico, isso é, a mesma molécula com um ou mais átomos isotopicamente marcados. Chamados de padrões isotópicos, eles são adicionados em quantidade conhecida durante a preparação da amostra. As vantagens são: minimização das perdas do analito durante o processamento da amostra e correção das diferenças de ionização nas fontes ESI (*electrospray ionization*) (Tretyakova et al., 2013). Como em outros métodos de quantificação, para a espectrometria de massas também é necessário construir de curvas de calibração. Assim valores obtidos a partir da análise de amostras são interpolados na curva e uma quantidade absoluta é obtida (Traube et al., 2019).

Portanto, é necessária a síntese, purificação e caracterização prévia de cada molécula alvo que se deseja quantificar em amostras: o padrão isotopicamente marcado (para a técnica de diluição isotópica), e o padrão não marcado (para as curvas de calibração e otimização dos parâmetros de ionização e fragmentação no espectrômetro de massa). Os padrões utilizados neste trabalho foram previamente sintetizados, purificados e caracterizados pela Dra. Angélica B. Sanchez (Angélica Bianchini Sanchez, 2017).

As curvas de calibração foram construídas e injetadas a cada período de uso do espectrômetro de massas para análise dos adutos de DNA. Isso é importante para garantir que desvios na sensibilidade do equipamento não influenciem os valores de quantificação dos analitos nas amostras. Na Figura 4.2 está representada uma curva para cada um dos adutos de DNA. As curvas foram feitas em água, usando concentrações crescentes conhecidas de cada padrão. Para cada ponto da curva foram adicionados os padrões autênticos isotopicamente marcados em concentração fixa. A curva de dGuo foi calculada a partir da área do pico de absorção em 254 nm, comprimento de absorção máxima deste nucleosídeo.

As equações de reta foram usadas para o cálculo da concentração dos analitos em amostras biológicas. Os valores de R^2 , também chamados de coeficiente de determinação, mostram a linearidade da relação entre a razão das áreas e a concentração de cada analito.

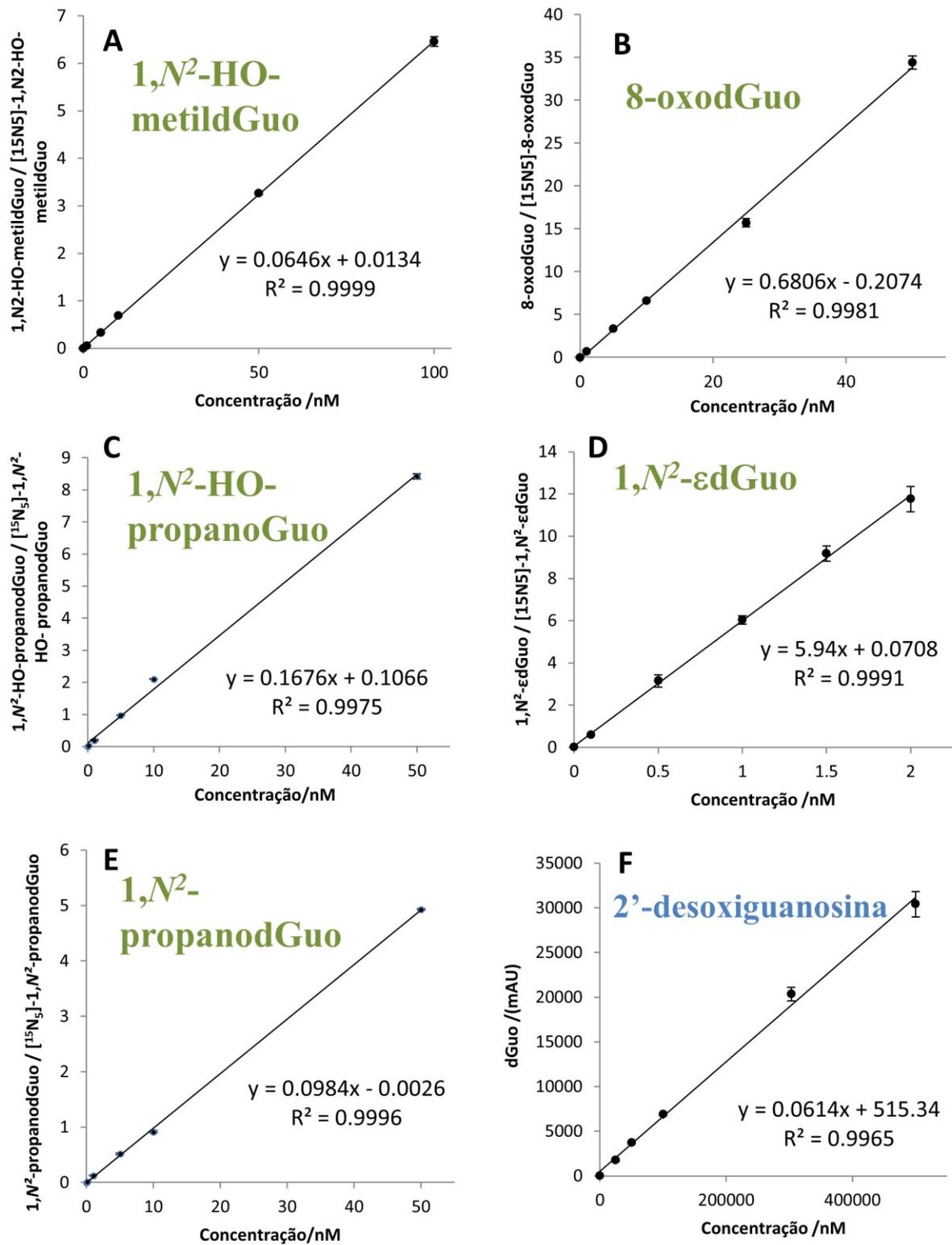


Figura 4.2. (A-E) Curvas de calibração para cada aduto de DNA usando o método da diluição isotópica. (F) Curva de calibração para o nucleosídeo dGuo. As equações de reta e os valores correspondentes de R^2 estão indicados em cada gráfico.

4.1.2. Limites de Detecção e Quantificação

“O limite de quantificação é a menor concentração ou teor que pode ser quantificada com a maior incerteza aceitável ou Incerteza Máxima Aceitável” (*Manual de Garantia da Qualidade Analítica*, 2011). Para técnicas analíticas que apresentam ruído na linha de base, como o ruído basal proveniente a fonte de ionização usada na espectrometria de massas acoplada à HPLC, é necessário estabelecer um critério para determinar qual será a ‘incerteza máxima aceitável’.

Nesta técnica, normalmente o critério usado é a razão entre o sinal e o ruído. Experimentalmente o limite de quantificação foi determinado como razão sinal/ruído maior ou igual a 6. O limite de detecção foi estabelecido como razão sinal/ruído maior ou igual a 3. Os valores de concentração correspondentes aos limites de detecção e quantificação estão listados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Limites de detecção e quantificação de cada aduto de DNA.

Aduto	Limite de Detecção	Limite de Quantificação
1,N ² -HO-MedGuo	300 fmol	600 fmol
8-oxodGuo	300 fmol	600 fmol
1,N ² -HO- propanodGuo	5 fmol	10 fmol
1,N ² -εdGuo	3 fmol	6 fmol
1,N ² -propanodGuo	3 fmol	6 fmol

4.2. Instabilidade Química do Aduto 1,N²-HO-MedGuo

O aduto 1,N²-HO-MedGuo endógeno foi detectado em todos os grupos de ratos em fígado

e cérebro, mas seu padrão isotópico correspondente, adicionado no início da hidrólise do DNA (item 3.5), apresentou pico com formato e área insatisfatórios em todas as análises de amostras de DNA hidrolisado. A Figura 4.3 mostra o perfil cromatográfico deste aduto. Posteriormente foi confirmado que este aduto é instável e se degrada durante o processo de hidrólise do DNA, durante os períodos de incubação a 37°C. É possível que o padrão isotópico seja mais degradado pois fica por mais tempo em solução na forma hidrolisada, o que o torna mais reativo do que o mesmo composto que é posteriormente hidrolisado do DNA.

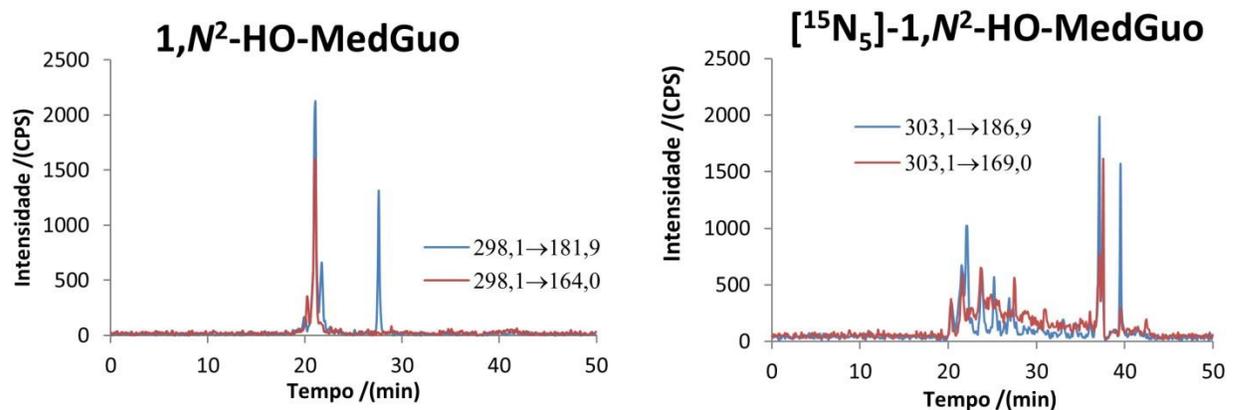


Figura 4.3. Cromatogramas representativos da análise de 1,N²-HO-MedGuo em DNA de fígado de rato controle sem suplementação. À esquerda esta o aduto endógeno; à direita está padrão isotópico.

Yu e colaboradores já haviam mostrado que este composto é instável, e por isso para medi-lo é necessário fazer a redução química com cianoborohidreto de sódio (NaCNBH₃) (Yu et al., 2015). Portanto, considerando a instabilidade deste composto e a impossibilidade de reduzir apenas este aduto, mantendo os demais sem modificação química, os dados de 1,N²-HO-MedGuo não foram considerados nas análises dos DNA dos ratos na perspectiva de utilizar o adutoma.

4.3. Modelo e Experimentação Animal

Como já descrito anteriormente (Item 3.3), toda a experimentação com os animais já havia sido conduzida pelo doutorando Vanderson Bispo (V. da S. Bispo, 2015) e os dados de consumo hídrico, massa corporal dos animais e porcentagem de sobrevivência foram apresentados na sua tese de doutorado. Porém um novo tratamento estatístico desses dados de experimentação foi efetuado como parte deste projeto de mestrado com a ajuda da pós-doutoranda Ana Helena Sales de Oliveira. Esses dados estão reapresentados em Materiais e Métodos (item 3.3) para facilitar a compreensão dos resultados agora obtidos.

4.4. Quantificação de Adutos de DNA em Fígado

Os adutos de DNA foram analisados através da metodologia Aduoma (Item 4.1) com o objetivo de investigar possível papel de carnosina em animais transgênicos com relação à progressão da doença.

A Figura 4.4 mostra um cromatograma representativo da análise simultânea de quatro modificações em DNA detectadas pelo método descrito no item 4.1 em fígado de rato controle. Observamos que nem todos os adutos são detectados nesses tecidos.

A concentração dos adutos $1,N^2$ - ϵ dGuo e $1,N^2$ -propanodGuo ficaram abaixo dos limites de detecção, porém seus respectivos padrões isotópicos foram detectados, confirmando não haver problema com o método de hidrólise e análise HPLC-MS/MS. As quantidades de DNA injetados para análise das amostras variou entre 1 e 30 nmol, dependendo do rendimento da extração de DNA.

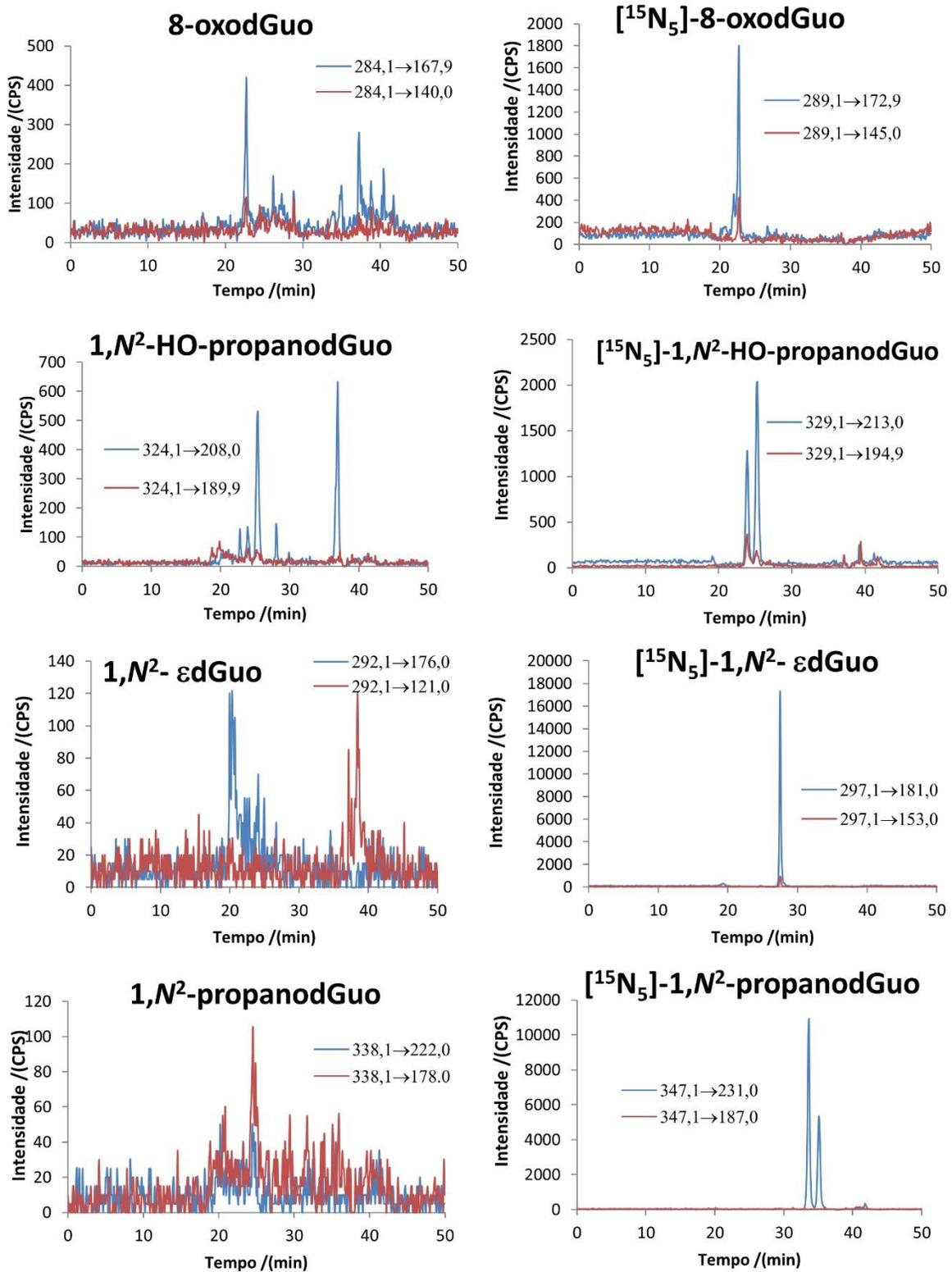


Figura 4.4. Cromatogramas representativos da análise de Adutoma de aproximadamente 1nmol de DNA de fígado de rato controle sem suplementação. À esquerda estão cada um dos adutos endógenos; à direita estão os respectivos padrões isotópicos.

A Figura 4.5 compara os níveis das modificações de dGuo nos diferentes grupos: controle (CTL), controle suplementado com carnosina (CTL-Car), transgênicos SOD^{G93A} (ALS) e transgênicos SOD^{G93A} suplementados com carnosina (ALS-Car) em fígado. Neste tecido o nível de 8-oxodGuo, um conhecido biomarcador de estresse redox, apresenta uma diminuição de cinco vezes nos animais CTL-Car em relação aos controles não suplementados. Nos animais ALS a diferença nos níveis de 8-oxodGuo é quatro vezes menor nos animais ALS-Car. Carnosina tem sido reconhecida como um dipeptídeo neuro-protetor e parte dessa proteção é atribuída a sua atividade antioxidante (Fouad, Qutub, Al Rashed, & Al-Melhim, 2017; Kim et al., 2011). Portanto, níveis menores de 8-oxodGuo nos animais suplementados, confirmam essa ação antioxidante da carnosina nesses animais.

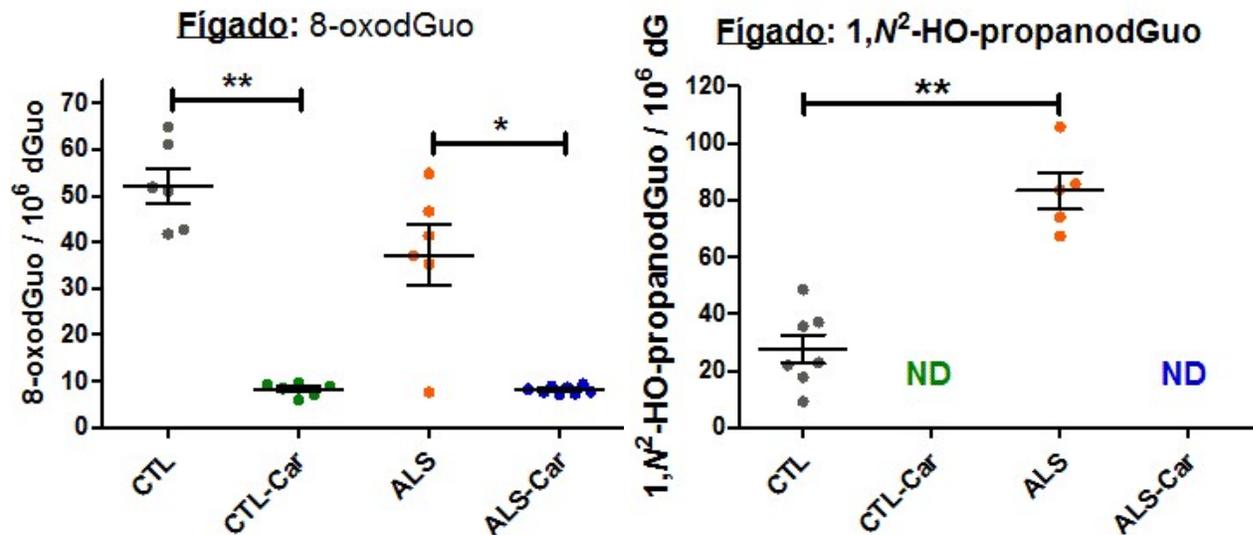


Figura 4.5. Níveis de duas modificações de dGuo detectadas em DNA de Fígado dos ratos. O teste estatístico utilizado para comparar os grupos foi *Mann-Whitney*. Fígado 8-oxodGuo: **corresponde a $p=0,0022$; *corresponde a $p=0,02$. Fígado 1,N²-HO-propanodGuo: **corresponde a $p=0,0025$; ND corresponde a 'não detectado'.

Comparando os grupos CTL e ALS nota-se que os níveis de 8-oxodGuo no fígado dos animais ALS são, aparentemente, um pouco menores. Apesar desses dados não serem estatisticamente diferentes, podem refletir uma tendência que poderia ser explicada pela oxidação posterior da 8-oxodGuo, uma vez que, por apresentar potencial de oxidação menor que qualquer nucleosídeo natural, torna-se alvo de outros oxidantes em ambiente em estresse redox (Burrows & Muller, 1998; Martinez, 2003).

Percebe-se também que a concentração de 8-oxodGuo em fígado está maior (média 30 modificações 8-oxodGuo/ 10^6 dGuo) do que o nível basal médio apresentado pelo Comitê Europeu de padrões em Danos Oxidativos ao DNA – sigla em inglês ESCODD – que ficou em 4,24 / 10^6 dGuo (ESCODD, Gedik, & Collins, 2005). Esta diferença de aproximadamente dez vezes pode ser explicada por uma mudança de protocolo. Durante a extração do DNA de fígado foi utilizado o sal NaCl na precipitação do DNA, de acordo com protocolo já estabelecido no laboratório (Angélica Bianchini Sanchez, 2017). Porém, outro trabalho que usou NaI na extração de DNA de fígado de ratos controles obteve média de 30 modificações 8-oxodGuo/ 10^6 dGuo (Lodovici, Bigagli, Luceri, Manni, & Zaid, 2011), grandeza mais próxima do valor apresentado aqui neste trabalho. Isso indica que no fígado possam ocorrer mais reações que gerem espécies reativas, oxidando mais o seu DNA.

No fígado dos animais ALS também foi observado um nível aproximadamente quatro vezes maior de 1, N^2 -HO-propanodGuo, o aduto obtido pela reação de dGuo com a acroleína, um aldeído α,β -insaturado produto da lipoperoxidação. Este aduto não foi detectado nos grupos CTL-Car e ALS-Car (Figura 4.4), indicando, novamente, um efeito protetor da carnosina. Em ALS são descritas alterações neuro-inflamatórias, assim com elevação nos níveis de moléculas pro-inflamatórias (D'Ambrosi, Cozzolino, & Carri, 2017). A lipoperoxidação está aumentada o que pode acarretar perda neuronal (Blasco et al., 2017). Outro trabalho mostrou que a resposta

inflamatória devido à neurodegeneração afeta especialmente o fígado e o músculo (Gasco et al., 2017). Em decorrência, pode haver aumento de oxidação lipídica e formação de aldeídos, como a acroleína, portanto este aduto pode ser considerado um biomarcador para o estresse redox

De acordo com a pesquisa que fizemos, não há dados que relacione a acroleína no fígado de animais ou humanos com ALS. Porém, já foi mostrado aumento de acroleína em cérebro *post mortem* de pacientes com Alzheimer (Williams, Lynn, Markesbery, & Lovell, 2006). Já foi demonstrado, também, que a acroleína causa agregados de neuro-filamentos (Jeong & Kang, 2008).

4.5. Quantificação de Adutos de DNA em Cérebro

Para a extração de DNA do cérebro foi utilizado o método descrito por Hamilton e colaboradores (Hamilton et al., 2001) usando NaI. na tentativa de diminuir a oxidação do DNA durante os procedimentos. O iodeto de sódio é um sal caotrópico, ou seja, é capaz de romper ligações de hidrogênio em solução aquosa, afetando a estrutura nativa do DNA e proteínas. Assim a precipitação de proteínas é melhor e a pureza do DNA é maior.

A Figura 4.6 mostra que houve significativa diminuição de 8-oxodGuo no cérebro dos animais ALS em relação aos CTL, bem como ALS-Car em relação aos CTL-Car. Essa tendência também foi vista em fígado, porém menos pronunciada, podendo ser explicada da mesma forma, ou seja pela adicional oxidação de 8-oxodGuo formando o óxido oxalúrico (Martinez, 2003). Por outro lado, os níveis de 8-oxodGuo em cérebro, diferentemente do fígado, não variaram com a suplementação. Portanto, mesmo que esteja ocorrendo a subsequente oxidação de 8-oxodGuo, há indícios de que a suplementação com carnosina não impede esta oxidação.

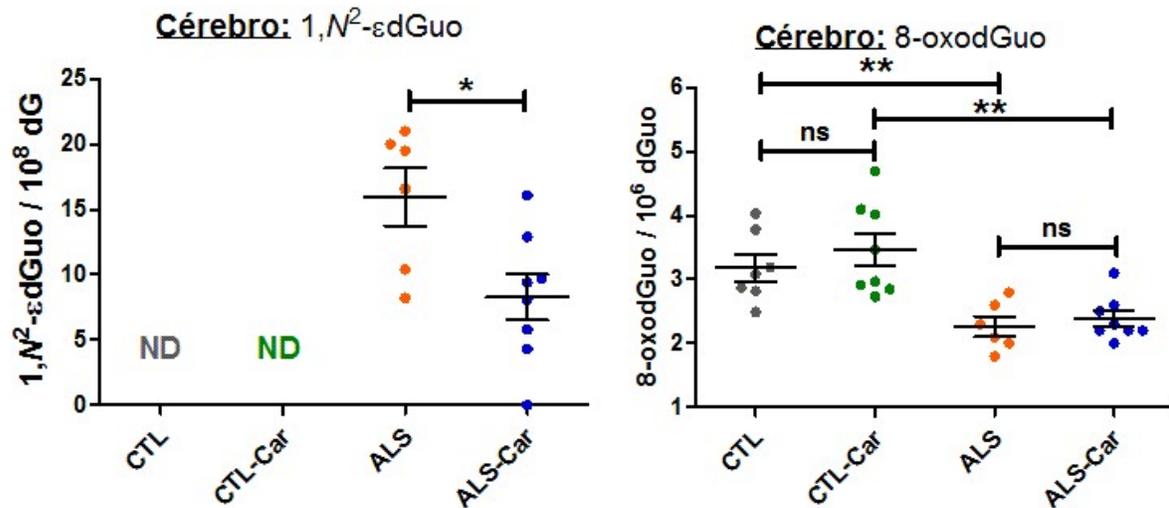


Figura 4.6. Níveis de duas modificações de dGuo detectadas em DNA de Cérebro dos ratos. O teste estatístico utilizado para comparar os grupos foi *Mann-Whitney*. Cérebro 8-oxodGuo: CTL e ALS **corresponde a $p=0,0047$ e CTL-Car e ALS-Car **corresponde a $p=0,0019$; 'ns' corresponde a 'não significativo'. Cérebro 1,N²-εdGuo: *corresponde a $p=0,02$; ND corresponde a 'não detectado'.

Percebe-se aumento significativo do aduto 1,N²-εdGuo no cérebro dos animais ALS em relação aos animais ALS que receberam a suplementação com carnosina. O aduto exocíclico 1,N²-εdGuo, clássico marcador de peroxidação lipídica, detectado no cérebro, corrobora o estresse redox nesse tecido e aponta para o possível efeito protetor da carnosina nesse tecido. A doença ALS afeta primeiramente cérebro, que é também o tecido mais rico em lipídeos (Blasco et al., 2017).

Em trabalho anterior do nosso grupo foi mostrado aumento 8-oxodGuo e 1,N²-εdGuo no DNA de timo de bezerro incubado com SOD1 na presença de peróxido de hidrogênio (Lívea Fujita Barbosa, Garcia, Di Mascio, & De Medeiros, 2009). Maior atividade da proteína p53 foi também observada utilizando cultura de células de neuroblastoma transfectados com SOD1^{G93A}, indicando que o acúmulo de lesões no DNA pode desencadear o processo de apoptose neste modelo celular de ALS. Observou-se que a SOD1 pode estar associada à cromatina, e que a

SOD1^{G93A} possui maior afinidade pelo DNA e maior atividade peroxidásica no núcleo. Estes resultados indicam que as lesões no DNA observadas no modelo celular de ALS podem ser diretamente promovidas pela SOD1 mutante (Livea F. Barbosa et al., 2010).

Outro trabalho do grupo mostrou que os níveis de aldeído α,β -insaturado livre no cérebro aumenta nos ratos ALS sintomáticos, ou seja, depois que alcançam o peso máximo e começam a manifestar os sintomas da doença (Freitas, 2014). Estes dados corroboram o resultado apresentado sobre o aumento dos níveis de 1,N²- ϵ dGuo em animal ALS. Nosso resultado também mostra evidência do papel de detoxificação de aldeídos exercido pela carnosina.

As análises de adutos de DNA em músculo estão em andamento, sendo realizadas majoritariamente pela técnica do laboratório Joice Rodrigues.

4.6. Carnosina Livre

Com o objetivo de verificar se a suplementação modificou os níveis de L-carnosina, os tecidos foram processados conforme descrito em Materiais e Métodos (item 3.7) e analisados utilizando a metodologia descrita no item 3.9. Os resultados estão mostrados a seguir na Figura 4.7.

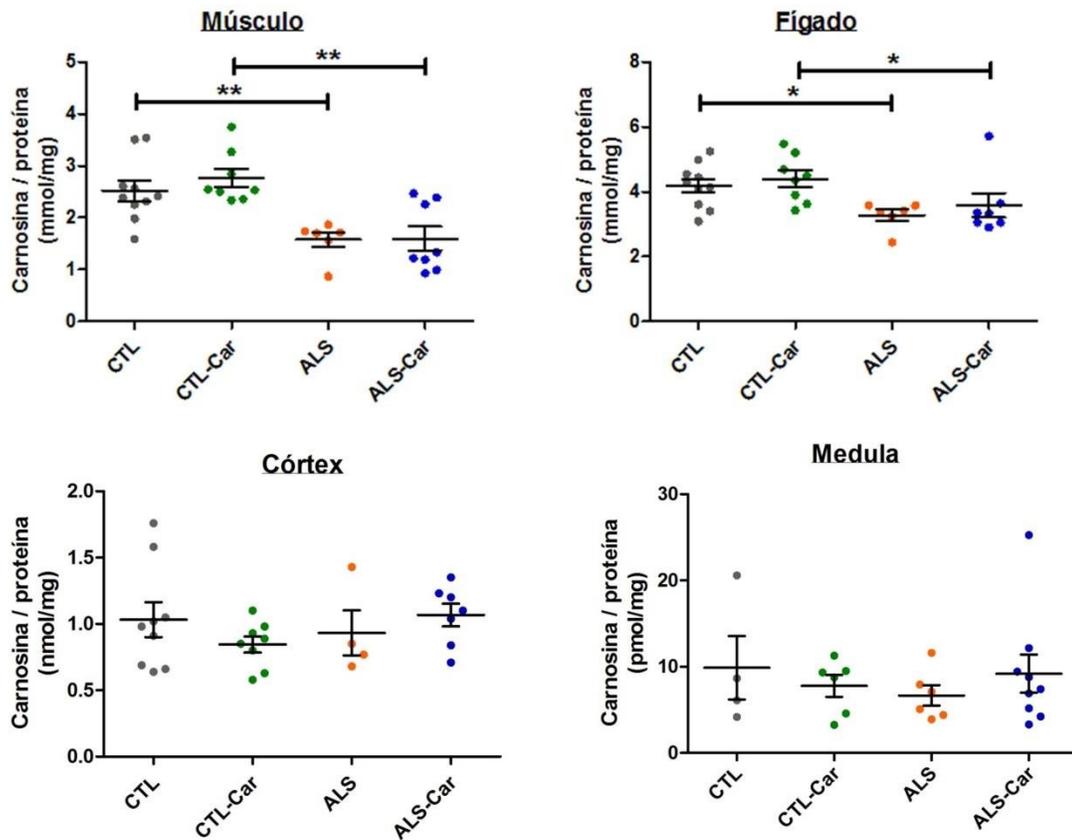


Figura 4.7. Níveis de carnosina detectados em músculo, fígado, córtex e medula dos ratos. O teste estatístico utilizado para comparar os grupos foi *Mann-Whitney*. Músculo: CTL e ALS **corresponde a $p=0,0030$; CTL-Car e ALS-Car **corresponde a $p=0,0019$. Fígado: CTL e ALS *corresponde a $p=0,0160$; CTL-Car e ALS-Car *corresponde a $p=0,0401$; Medula: *corresponde a $p=0,0152$.

Observa-se que os níveis de carnosina são significativamente menores nos ratos ALS em todos os tecidos testados (com exceção do córtex) e que a suplementação não aumentou a concentração de carnosina nesses tecidos analisados quando comparado os grupos CTL e CTL-Car, ou ALS e ALS-Car. Como esse foi um primeiro estudo sobre efeito da carnosina em ALS, a concentração da carnosina oferecida na água foi ajustada considerando os dados descritos por Herculano e colaboradores em estudos com camundongos e Alzheimer (Herculano et al., 2013), portanto, pode não ser a concentração ótima para serem observados os melhores efeitos em ratos

selvagens e ratos transgênicos SOD^{G93A}. Também pode indicar problema de absorção da molécula em decorrência da doença, porém mais estudos precisam ser feitos para elucidar esta hipótese.

Um trabalho recente usou a mesma dose de suplementação de carnosina em rato que nós utilizamos no presente trabalho, aproximadamente 35 ± 5 mg carnosina/animal/semana, porém a administração não foi oral e sim por injeção intraperitoneal. Com apenas duas semanas de suplementação os autores detectaram diminuição da enzima alanina aminotransferase em soro e diminuição de malonaldeído, óxido nítrico, TNF- α , no fígado (Fouad, Qutub, Al Rashed, & Al-Melhim, 2017).

Em músculo, fígado e medula observamos diminuição significativa nos níveis de carnosina nos animais modelos para ALS quando comparados com os animais controle tanto CTL versus CTL-Car, quanto ALS versus ALS-Car. Stuerenburg e Kunze já haviam mostrado que biópsias de músculo de pacientes ALS apresentam decréscimo significativo de carnosina, e sugerem que isso se deva à denervação relacionada à doença (Stuerenburg & Kunze, 1999). A diminuição de carnosina livre em ALS (Figura 4.7) sugere um possível consumo de carnosina por outras vias, como oxidação e conjugação com biomoléculas.

4.7. Extração de DNA e Carnosina e seus Adutos da Medula

Para que os níveis de adutos de DNA e de carnosina pudessem ser comparados e para que houvesse reprodutibilidade entre os indivíduos, foi necessário garantir que as regiões da medula da qual seriam extraídas as massas de tecido não fossem diferentes. Para isso os protocolos descritos nos itens 3.7 e 3.9 foram ligeiramente modificados: as medulas foram inicialmente

submetidas à homogeneização sem a adição de tampão A ou tampão C. Depois foram pesados 200 mg para extração de adutos DNA e 200 mg para extração de adutos de carnosina, e então adicionados os respectivos tampões em cada alíquota.

Infelizmente as concentrações de DNA após a extração ficaram muito baixas (entre 43 e 420 ng de DNA/ μ L), isso pode ser porque a medula é constituída majoritariamente de axônios, tendo assim pouco corpo neuronal, onde está o núcleo e assim, o DNA.

Há bastante interesse no aduto de carnosina com acroleína, pois a reação com este aldeído tem maior constante de velocidade em relação ao HHE e ao HNE (Barski et al., 2013). Porém, ao investigar este aduto na medula, descobrimos que há um ou mais interferentes na matriz biológica que suprimem o sinal do composto CAR-ACR em aproximadamente 50 vezes (dado não mostrado). Devido este problema de detecção do aduto, a razão entre a intensidade do sinal e do ruído ficou abaixo do limite de detecção em algumas amostras. A investigação de CAR-ACR em medula continua sendo feita pelo aluno de iniciação científica, Adriano P. A. de Oliveira.

O nível do aduto de carnosina com HHE diminui nos animais ALS quando comparados com os controles, mas aumentou nos ratos ALS suplementados com carnosina (Figura 4.8). Este resultado indica que a carnosina está participando do mecanismo de detoxificação, se ligando a este aldeído e impedindo que este se ligue à DNA e proteínas.

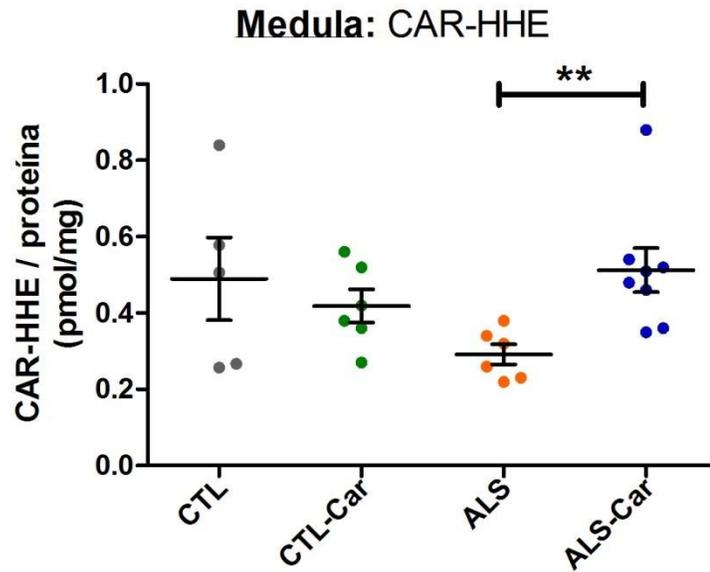


Figura 4.8. Níveis do aduto de carnosina com o aldeído HHE em Medula dos ratos separados nos grupos. O teste estatístico utilizado para comparar os grupos foi *Mann-Whitney*. CAR-ACR: **corresponde a $p=0,0022$. CAR-HHE: CTL e ALS *corresponde a $p=0,0103$ ALS e ALS-Car *corresponde a $p=0,0293$.

Usando medulas obtidas de autópsias de pacientes, Shibata e colaboradores fizeram análises de proteínas ligadas a HHE por técnica de imuno-histoquímica. Comparando os pacientes ALS com indivíduos sem problemas neurológicos, foi detectado acúmulo de proteínas ligadas a HHE no grupo ALS (Shibata et al., 2004). Este dado corrobora a hipótese de esteja sendo formado mais do aldeído HHE na medula devido à peroxidação lipídica relacionada à doença ALS, também em humanos.

Este mesmo aduto, CAR-HHE, também foi detectado no córtex dos animais na concentração média de 0,2 pmol de CAR-HHE por mg de proteína. Porém a concentração não foi estatisticamente diferente comparando quaisquer dos quatro grupos, dois a dois. Análises dos adutos de carnosina fígado e em músculo foram feitos em colaboração com a pós-doutoranda Ana Helena Sales. Nestes tecidos não foram vistas diferenças significativas de adutos de

carnosina quando comparados os animais ALS e CTL, ou em relação ao tratamento. Por isso os dados não estão apresentados aqui.

4.8. Proteína Carbonilada

Um das modificações em que as proteínas podem sofrer quando são oxidadas é a formação de grupos carbonila. Estes grupos reativos podem se originar da oxidação direta de resíduos de aminoácidos, hidrólise da cadeia principal por ataque radicalar, adições de Michael (cisteína, lisina e histidina são nucleófilos para atacar aldeídos) e glicação através de adição de produtos de oxidação de açúcares às proteínas (Colombo et al., 2016). Portanto níveis de proteína carbonilada são utilizados como indicadores do estado redox de um determinado microambiente biológico. Em trabalho anterior Andrus et al. (Andrus, Fleck, Gurney, & Hall, 1998) mostraram que a concentração de proteína carbonilada é maior na medula de animais transgênicos modelo para ALS ($SOD1^{G93A}$) do que em animais selvagens. Estes autores observaram uma diferença cerca de duas vezes maior nos animais ALS no primeiro mês de vida. Já aos 120 dias, idade que os animais ALS já estão bastante afetados pela doença, o conteúdo de proteína carbonilada foi seis vezes maior em relação aos animais selvagens.

Os níveis de proteína carbonilada foram medidos em fígado e músculo dos ratos conforme a metodologia descrita no item 3.8. A parte experimental foi conduzida majoritariamente pela pós doutoranda Ana Helena Sales. Em músculo foi observado aumento da concentração de proteína carbonilada nos animais ALS em relação aos animais controle (CTL) (Figura 4.9-B).

O tratamento com carnosina resultou em diminuição do total de proteínas carboniladas em animais transgênicos, tanto em fígado quanto em músculo (Figura 4.9). Em fígado o efeito de diminuição de proteínas carboniladas pela carnosina foi observado também nos animais

selvagens, indicando que o dipeptídeo pode ter efeito protetor em condições de estresse oxidativo não crônicas.

Os níveis detectados de proteína carbonilada foram maiores em músculo do que em fígado (Figura 4.9), indicando que o estresse oxidativo deve estar mais acentuado em músculo. Isso está de acordo com a atual compreensão da doença, cujo principal fenômeno biológico é a morte dos neurônios motores. Infelizmente não foi possível detectar a concentração de proteínas carboniladas em medula e cérebro.

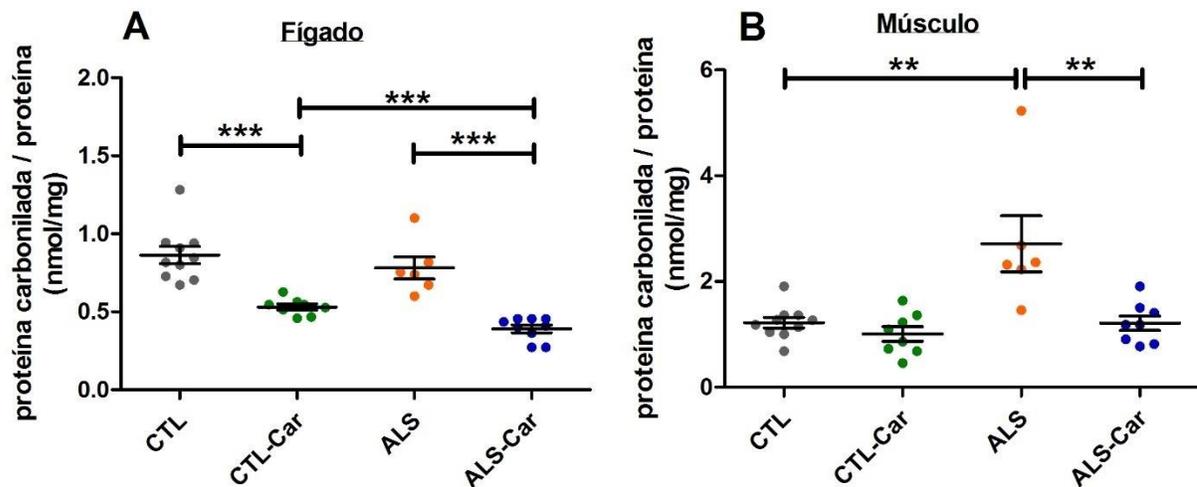


Figura 4.9. Concentração de Proteínas Carboniladas em (A) Fígado e (B) Músculo. (A) *** Grupos são significativamente diferentes de acordo com o teste não paramétrico Mann Whitney test ($P < 0,0009$). Os grupos CTL e ALS não apresentaram diferença significativa. (B) ** Grupos são significativamente diferentes de acordo com o teste não paramétrico Mann Whitney test ($P < 0,0027$). Os grupos CTL e ALS, bem como os grupos CTL-Car e ALS-Car não apresentaram diferença significativa entre eles.

Carbonilação de enzimas pode diminuir ou até mesmo extinguir sua atividade catalítica. Proteínas com este tipo de modificação também podem formar agregados de alto peso molecular,

que são menos suscetíveis a degradação por proteassoma, podendo até mesmo inibir a função de proteases (Nyström, 2005). Os agregados proteicos são tóxicos e estão associados à várias doenças neurodegenerativas, inclusive ALS.

Nossos dados sustentam a hipótese de que ALS é uma doença com um desbalanço no equilíbrio redox, principalmente em músculo, indica que o tratamento com antioxidantes como a carnosina podem corrigir o desequilíbrio, e sugere um mecanismo para o desenvolvimento de ALS esporádica: através da formação de agregados proteicos devido a carbonilação. De fato, Linares et al. (Linares et al., 2013) mostraram que o tratamento com tempol em ratos modelo ALS reduziu os níveis de hSOD^{G93A} carbonilada em relação aos animais ALS não tratados, e estendeu moderadamente o tempo de vida dos animais sugerindo que nitróxidos cíclicos teriam papel antioxidante em ALS.

5. CONCLUSÕES

No presente estudo os níveis de carnosina livre, adutos carnosina-aldeídos, adutos de DNA-aldeídos, lesões obtidas por oxidação no DNA, e de proteína carbonilada foram analisados em tecidos de ratos controle e ratos transgênicos SOD^{G23A} modelo para ALS.

Para isso, um método baseado em HPLC-MS/MS foi otimizado para a quantificação simultânea de quatro adutos de DNA e um produto de oxidação da 2'-desoxiguanosina em uma mesma corrida. Esse método permitiu a quantificação ultrasensível desses adutos de DNA em ratos transgênicos modelo para ALS. Aplicamos outra metodologia HPLC-MS/MS também bastante sensível para a análise de carnosina e adutos de carnosina-aldeído nos diferentes tecidos.

A Figura 5.1 sumariza os principais resultados obtidos nessas análises. Resumidamente, os ratos suplementados com carnosina apresentaram níveis significativamente menores de proteína carbonilada em músculo e fígado. Em fígado foram vistos níveis menores de dois adutos de DNA, 8-oxodGuo e 1,N²-HO-propanodGuo, em animais suplementados. Em cérebro foram detectados níveis menores de 1,N²-edGuo.

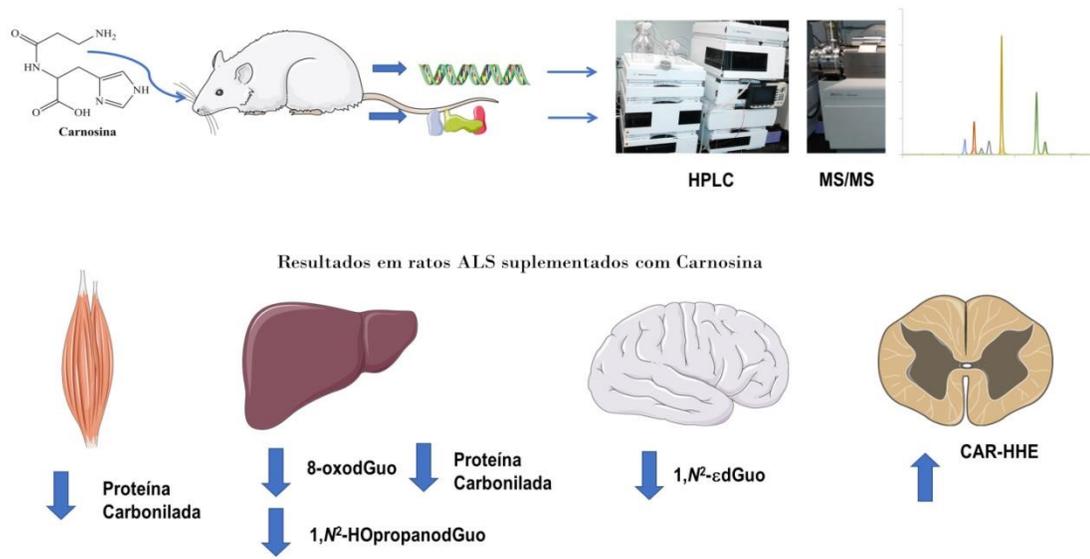


Figura 5.1. Resumo dos resultados obtidos neste trabalho de mestrado.

Esses adutos de DNA estão relacionados ao estresse redox, bem como os níveis de proteína carbonilada. A redução destes potenciais biomarcadores de estresse redox promovida pela carnosina pode apontar para mecanismos antioxidantes dessa molécula.

Com relação aos adutos carnosina-aldeídos, foi observado somente níveis significativamente maiores do aduto CAR-HHE na medula, apontando para o papel da carnosina na detoxificação de aldeídos reativos *in vivo*. Apesar de termos observado apenas um aduto de Carnosina-aldeído alterado, é a primeira vez que esse tipo de aduto é detectado no modelo de ALS e merece investigação futura para um possível efeito terapêutico dessa molécula.

Em conclusão, os resultados aqui apresentados indicam ação antioxidante da carnosina nos ratos ALS diminuindo adutos de DNA e possuindo ação detoxificante ao sequestrar HHE na medula dos animais ALS suplementados. Também sugere adutos de DNA como biomarcadores para patologias relacionadas ao estresse redox, como ALS.

6. REFERÊNCIAS

- Aldini, G., Carini, M., Beretta, G., Bradamante, S., & Facino, R. M. (2002). Carnosine is a quencher of 4-hydroxy-nonenal: Through what mechanism of reaction? *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 298(5), 699–706. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02545-7](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02545-7)
- Aldini, G., Orioli, M., Carini, M., & Facino, R. M. (2004). Profiling histidine-containing dipeptides in rat tissues by liquid chromatography/electrospray ionization tandem spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 39(12), 1417–1428. <https://doi.org/10.1002/jms.696>
- Andrus, P. K., Fleck, T. J., Gurney, M. E., & Hall, E. D. (1998). Protein Oxidative Damage in a Transgenic Mouse Model of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, 71, 2041–2048. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.71052041.x>
- Anzenbacher, P., & Anzenbacherová, E. (2001). Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58, 737–747.
- Aristoy, M. C., Soler, C., & Toldrá, F. (2004). A simple, fast and reliable methodology for the analysis of histidine dipeptides as markers of the presence of animal origin proteins in feeds for ruminants. *Food Chemistry*, 84(3), 485–491. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.07.030>
- Artioli, G. G., Sale, C., & Jones, R. L. (2018). Carnosine in health and disease. *European Journal of Sport Science*, 19(1), 30–39. <https://doi.org/10.1080/17461391.2018.1444096>
- Augusto, O. (2006). *Radicais Livres - bons, maus e naturais* (Única). São Paulo: Oficina de Textos.

- Baba, S. P., Hoetker, J. D., Merchant, M., Klein, J. B., Cai, J., Barski, O. A., ... Bhatnagar, A. (2013). Role of aldose reductase in the metabolism and detoxification of carnosine-acrolein conjugates. *Journal of Biological Chemistry*, 288(39), 28163–28179. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.504753>
- Banda, D. M., Nuñez, N. N., Burnside, M. A., Bradshaw, K. M., & David, S. S. (2017). Repair of 8-oxoG:A mismatches by the MUTYH glycosylase: Mechanism, metals and medicine. *Free Radical Biology and Medicine*, 107(November 2016), 202–215. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.008>
- Barber, S. C., & Shaw, P. J. (2010). Oxidative stress in ALS: Key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(5), 629–641. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.11.018>
- Barbosa, Livea F., Cerqueira, F. M., Macedo, A. F. A., Garcia, C. C. M., Angeli, J. P. F., Schumacher, R. I., ... Medeiros, M. H. G. (2010). Increased SOD1 association with chromatin, DNA damage, p53 activation, and apoptosis in a cellular model of SOD1-linked ALS. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1802(5), 462–471. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.01.011>
- Barbosa, Lívea Fujita, Garcia, C. C. M., Di Mascio, P., & De Medeiros, M. H. G. (2009). DNA oxidation, strand-breaks and etheno-adducts formation promoted by Cu, Zn-superoxide dismutase-H₂O₂ in the presence and absence of bicarbonate. *Dalton Transactions*, 1450–1459. <https://doi.org/10.1039/b813235f>
- Barski, O. A., Xie, Z., Baba, S. P., Sithu, S. D., Agarwal, A., Cai, J., ... Srivastava, S. (2013). Dietary carnosine prevents early atherosclerotic lesion formation in apolipoprotein e-null mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(6), 1162–1170. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300572>

- Bispo, V. da S. (2015). *Investigação dos mecanismos biológicos de detoxificação de aldeídos a,b- insaturados em ratos SOD G93A modelo para ALS*. Universidade de São Paulo.
- Bispo, V. S., Campos, I. P. de A., Di Mascio, P., & Medeiros, M. H. G. (2016). Structural Elucidation of a Carnosine-Acrolein Adduct and its Quantification in Human Urine Samples. *Scientific Reports*, 6(January), 1–5. <https://doi.org/10.1038/srep19348>
- Blair, I. A. (2008). DNA Adducts with Lipid Peroxidation Products. *Journal of Biological Chemistry*, 283(23), 15545–15549. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700051200>
- Blasco, H., Veyrat-Durebex, C., Bocca, C., Patin, F., Vourc'H, P., Kouassi Nzoughe, J., ... Reynier, P. (2017). Lipidomics Reveals Cerebrospinal-Fluid Signatures of ALS. *Scientific Reports*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17389-9>
- Boldyrev, A. A., Aldini, G., & Derave, W. (2013). Physiology and Pathophysiology of Carnosine. *Physiological Reviews*, 93(4), 1803–1845. <https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2012>
- Boldyrev, A., Fedorova, T., Stepanova, M., Dobrotvorskaya, I., Kozlova, E., Boldanova, N., ... Illarioshkin, S. (2008). Carnosine increases efficiency of DOPA therapy of Parkinson's disease: A pilot study. *Rejuvenation Research*, 11(4), 821–827. <https://doi.org/10.1089/rej.2008.0716>
- Bozzo, F., Mirra, A., & Carri, M. T. (2017). Oxidative stress and mitochondrial damage in the pathogenesis of ALS: New perspectives. *Neuroscience Letters*, 636, 3–8. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.04.065>
- Burrows, C. J., & Muller, J. G. (1998). Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission. *Chemical Reviews*, 98(3), 1109–1152. <https://doi.org/10.1021/cr960421s>
- Carvalho, V. H., Oliveira, A. H. S., de Oliveira, L. F., da Silva, R. P., Di Mascio, P., Gualano, B., ... Medeiros, M. H. G. (2018). Exercise and β -alanine supplementation on carnosine-

- acrolein adduct in skeletal muscle. *Redox Biology*, *18*(June), 222–228.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.07.009>
- Carvalho, V. M., Asahara, F., Di Mascio, P., De Arruda Campos, I. P., Cadet, J., & Medeiros, M. H. G. (2000). Novel 1,N6-etheno-2'-deoxyadenosine adducts from lipid peroxidation products. *Chemical Research in Toxicology*, *13*(5), 397–405.
<https://doi.org/10.1021/tx9901682>
- Carvalho, V. M., Di Mascio, P., De Arruda Campos, I. P., Douki, T., Cadet, J., & Medeiros, M. H. G. (1998). Formation of 1,N8-etheno-2'-deoxyadenosine adducts by trans,trans-2,4-decadienal. *Chemical Research in Toxicology*, *11*(9), 1042–1047.
<https://doi.org/10.1021/tx9800710>
- Charcot, J.-M., & Joffroy, A. (1869). Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lésions de la substance grise et des faisceaux antéro-latéraux de la moelle épinière. *Arch Physiol Norm Pathol*, *2*(628), 354.
- Close, D. M., & Wardman, P. (2016). Calculations of the Energetics of Oxidation of Aqueous Nucleosides and the Effects of Prototropic Equilibria. *Journal of Physical Chemistry A*, *120*(23), 4043–4048. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.6b02653>
- Colombo, G., Clerici, M., Garavaglia, M. E., Giustarini, D., Rossi, R., Milzani, A., & Dalle-Donne, I. (2016). A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *1019*, 178–190. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.11.052>
- Colosimo, E. A., & Giolo, S. R. (2010). *Análise de Sobrevivência Aplicada* (1ª reimpre). São Paulo: ABE - PROJETO FISHER.
- D'Ambrosi, N., Cozzolino, M., & Carri, M. T. (2017). Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Role of Redox (dys)Regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*, *29*(1),

ars.2017.7271. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7271>

- D'Amico, E., Factor-Litvak, P., Santella, R. M., & Mitsumoto, H. (2013). Clinical perspective on oxidative stress in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*, *65*, 509–527. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.06.029>
- De Courten, B., Jakubova, M., De Courten, M. P. J., Kukurova, I. J., Vallova, S., Krumpolec, P., ... Ukropcova, B. (2016). Effects of carnosine supplementation on glucose metabolism: Pilot clinical trial. *Obesity*, *24*(5), 1027–1034. <https://doi.org/10.1002/oby.21434>
- Di Mascio, P., Martinez, G. R., Miyamoto, S., Ronsein, G. E., Medeiros, M. H. G., & Cadet, J. (2016). Singlet molecular oxygen: Düsseldorf - São Paulo, the Brazilian connection. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *595*, 161–175. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.11.016>
- Di Mascio, P., Martinez, G. R., Miyamoto, S., Ronsein, G. E., Medeiros, M. H. G., & Cadet, J. (2019). Singlet Molecular Oxygen Reactions with Nucleic Acids, Lipids, and Proteins [Review-article]. *Chemical Reviews*, *119*(3), 2043–2086. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00554>
- Dupuis, L., Corcia, P., Fergani, A., Gonzalez De Aguilar, J. L., Bonnefont-Rousselot, D., Bittar, R., ... Meininger, V. (2008). Dyslipidemia is a protective factor in amyotrophic lateral sclerosis symbol. *Neurology*, *70*(13), 1004–1009. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000285080.70324.27>
- ESCODD, Gedik, C. M., & Collins, A. (2005). Establishing the background level of base oxidation in human lymphocyte DNA: Results of an interlaboratory validation study. *FASEB Journal*, *19*(1), 82–84. <https://doi.org/10.1096/fj.04-1767fje>
- Fiala, E. S., Conaway, C. C., & Mathis, J. E. (1989). Oxidative DNA and RNA Damage in the Livers of Sprague-Dawley Rats Treated with the Hepatocarcinogen 2-Nitropropane. *Cancer*

Research, 49(20), 5518–5522.

- Fouad, A. A., Qutub, H. O., Al Rashed, A. S., & Al-Melhim, W. N. (2017). Therapeutic effect of carnosine in rat model of experimental liver carcinogenesis. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 56(February), 10–14. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.08.021>
- Freitas, F. P. (2014). *Investigação de Potenciais Biomarcadores Redox – Um enfoque em aldeídos e seus produtos*. Universidade de São Paulo.
- Frijhoff, J., Winyard, P. G., Zarkovic, N., Davies, S. S., Stocker, R., Cheng, D., ... Ghezzi, P. (2015). Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 23(14), 1144–1170. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6317>
- Garcia, C. C. M., Angeli, J. P. F., Freitas, F. P., Gomes, O. F., De Oliveira, T. F., Loureiro, A. P. M., ... Medeiros, M. H. G. (2011). [13C2]-acetaldehyde promotes unequivocal formation of 1, N 2-propano-2'-deoxyguanosine in human cells. *Journal of the American Chemical Society*, 133(24), 9140–9143. <https://doi.org/10.1021/ja2004686>
- Gasco, S., Zaragoza, P., García-Redondo, A., Calvo, A. C., & Osta, R. (2017). Inflammatory and non-inflammatory monocytes as novel prognostic biomarkers of survival in SOD1G93A mouse model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS ONE*, 12(9), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184626>
- Gerschman, R., Gilbert, D. L., Nye, S. W., Dwyer, P., & Fenn, W. O. (1954). Oxygen poisoning and X-irradiation: A mechanism in common. *Science*, 119(3097), 623–626. <https://doi.org/10.1126/science.119.3097.623>
- Gurney, M. E., Pu, H., Chiu, A. Y., Dal Canto, M. C., Polchow, C. Y., Alexander, D. D., ... Siddique, T. (1994). Motor Neuron Degeneration in Mice That Express a Human Cu,Zn Superoxide Dismutase Mutation. *Source: Science, New Series*, 264, 1772–1775. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/2883932%5Cnhttp://about.jstor.org/terms>

- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine* (Fourth). Oxford: Oxford University Press.
- Hamilton, M. L., Guo, Z., Fuller, C. D., Van Remmen, H., Ward, W. F., Austad, S. N., ... Richardson, A. (2001). A reliable assessment of 8-oxo-2-deoxyguanosine levels in nuclear and mitochondrial DNA using the sodium iodide method to isolate DNA. *Nucleic Acids Research*, *29*(10), 2117–2126. <https://doi.org/10.1093/nar/29.10.2117>
- Harman, D. (2009). Origin and evolution of the free radical theory of aging: A brief personal history, 1954-2009. *Biogerontology*, *10*(6), 773–781. <https://doi.org/10.1007/s10522-009-9234-2>
- He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T., & Ma, X. (2017). Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *44*(2), 532–553. <https://doi.org/10.1159/000485089>
- Hecht, S. S., McIntee, E. J., & Wang, M. (2001). New DNA adducts of crotonaldehyde and acetaldehyde. *Toxicology*, *166*(1–2), 31–36. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00436-X](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00436-X)
- Herculano, B., Tamura, M., Ohba, A., Shimatani, M., Kutsuna, N., & Hisatsune, T. (2013). β -Alanyl-L-histidine rescues cognitive deficits caused by feeding a high fat diet in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *33*, 983–997. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-121324>
- Hodgson, E. K., & Fridovich, I. (1975). The Interaction of Bovine Erythrocyte Superoxide Dismutase with Hydrogen Peroxide. Inactivation of the Enzyme. *Biochemistry*, *14*(24), 5294–5299. <https://doi.org/10.1021/bi00695a010>
- Howland, D. S., Liu, J., She, Y., Goad, B., Maragakis, N. J., Kim, B., ... Rothstein, J. D. (2002). Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-

- mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(3), 1604–1609. <https://doi.org/10.1073/pnas.032539299>
- Jeong, M.-S., & Kang, J.-H. (2008). Acrolein, the toxic endogenous aldehyde, induces neurofilament-L aggregation. *BMB Reports*, 41(9), 635–639. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2008.41.9.635>
- Kamal, M. A., Jiang, H., Hu, Y., Keep, R. F., & Smith, D. E. (2009). Influence of genetic knockout of Pept2 on the in vivo disposition of endogenous and exogenous carnosine in wild-type and Pept2 null mice. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 296(4), R986–R991. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.90744.2008>
- Kim, M. Y., Kim, E. J., Kim, Y., Choi, C., & Lee, B. (2011). Effects of α -lipoic acid and L-carnosine supplementation on antioxidant activities and lipid profiles in rats. 5(5), 421–428.
- Kowaltowski, A. J. (2019). Strategies to detect mitochondrial oxidants. *Redox Biology*, 21(December 2018), 101065. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101065>
- Kwiatkowski, S., Kiersztan, A., & Drozak, J. (2018). Biosynthesis of Carnosine and Related Dipeptides in Vertebrates. *Current Protein & Peptide Science*, 19(8), 771–789. <https://doi.org/10.2174/1389203719666180226155657>
- Linares, E., Seixas, L. V., dos Prazeres, J. N., Ladd, F. V. L., Ladd, A. A. B. L., Coppi, A. A., & Augusto, O. (2013). Tempol Moderately Extends Survival in a hSOD1G93A ALS Rat Model by Inhibiting Neuronal Cell Loss, Oxidative Damage and Levels of Non-Native hSOD1G93A Forms. *PLoS ONE*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055868>
- Lodovici, M., Bigagli, E., Luceri, C., Manni, E. M., & Zaid, M. (2011). Protective Effect of Resveratrol against Oxidation Stress Induced by 2-Nitropropane in Rat Liver. *Pharmacology & Pharmacy*, 02(03), 127–135. <https://doi.org/10.4236/pp.2011.23017>

- Long, E. K., & Picklo, M. J. (2010). Trans-4-hydroxy-2-hexenal, a product of n-3 fatty acid peroxidation: Make some room HNE... *Free Radical Biology and Medicine*, 49(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.03.015>
- Long, E. K., Rosenberger, T. A., & Picklo, M. J. (2010). Ethanol withdrawal increases glutathione adducts of 4-hydroxy-2-hexenal but not 4-hydroxyl-2-nonenal in the rat cerebral cortex. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(3), 384–390. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.10.048>
- LoPachin, R. M., & Gavin, T. (2014). Molecular mechanisms of aldehyde toxicity: A chemical perspective. *Chemical Research in Toxicology*, 27(7), 1081–1091. <https://doi.org/10.1021/tx5001046>
- Loureiro, A. P. M., De Arruda Campos, I. P., Gomes, O. F., Di Mascio, P., & Medeiros, M. H. G. (2004). Structural characterization of diastereoisomeric ethano adducts derived from the reaction of 2'-deoxyguanosine with trans,trans-2,4-decadienal. *Chemical Research in Toxicology*, 17(5), 641–649. <https://doi.org/10.1021/tx034225+>
- Loureiro, A. P. M., Di Mascio, P., Gomes, O. F., & Medeiros, M. H. G. (2000). trans,trans-2,4-Decadienal-induced 1,N2-etheno-2'-deoxyguanosine adduct formation. *Chemical Research in Toxicology*, 13(7), 601–609. <https://doi.org/10.1021/tx000004h>
- Loureiro, A. P. M., Mascio, P. Di, & Medeiros, M. H. G. (2002). Formação de Adutos Exocíclicos com Bases de Dna: Implicações em Mutagênese e Carcinogênese. *Mutagenesis*, 25(5), 777–793.
- Luna, J., Logroscino, G., Couratier, P., & Marin, B. (2017). Current issues in ALS epidemiology: Variation of ALS occurrence between populations and physical activity as a risk factor. *Revue Neurologique*, 173(5), 244–253. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2017.03.035>
- Manual de Garantia da Qualidade Analítica* (1ª edição). (2011). Brasília: Ministério da

Agricultura, Pecuária e Abastecimento (SDA), Secretaria de Defesa Agropecuária.

- Martinez, G. R. (2003). *Geração química de oxigênio-18 molecular no estado singlete, 18O2 (1Δg), e estudos de lesões em DNA* (Universidade de São Paulo).
<https://doi.org/10.11606/T.46.2016.tde-23022016-104924>
- Matsumoto, A., Okada, Y., Nakamichi, M., Nakamura, M., Toyama, Y., Sobue, G., ... Okano, H. (2006). Disease Progression of Human SOD1 (G93A) Transgenic ALS Model Rats. *Journal of Neuroscience Research*, 83, 119–133. <https://doi.org/10.1002/jnr>
- McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide Dismutase: AN ENZYMIC FUNCTION FOR ERYTHROCUPREIN (HEMOCUPREIN). *The Journal of Biological Chemistry*, 244(25), 6049–1969. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415760-6.00001-5>
- Medeiros, M. (2019). DNA Damage by Endogenous and Exogenous Aldehydes. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 00(00), 1–10. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190056>
- Medinas, D. B., Cerchiaro, G., Trindade, D. F., & Augusto, O. (2007). The carbonate radical and related oxidants derived from bicarbonate buffer. *IUBMB Life*, 59(4–5), 255–262. <https://doi.org/10.1080/15216540701230511>
- Moghe, A., Ghare, S., Lamoreau, B., Mohammad, M., Barve, S., McClain, C., & Joshi-Barve, S. (2015). Molecular mechanisms of acrolein toxicity: Relevance to human disease. *Toxicological Sciences*, 143(2), 242–255. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu233>
- Moriya, M. (1993). Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-Oxoguanine in DNA induces targeted G·C → T·A transversions in simian kidney cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(3), 1122–1126. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.3.1122>
- Moura, M. C., Casulari, L. A., & Novaes, M. R. C. G. (2016). Ethnic and demographic incidence of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in Brazil: A population based study. *Amyotrophic*

- Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration*, 17(3–4), 275–281.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3109/21678421.2016.1140210>
- Nyström, T. (2005). Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO Journal*, 24(7), 1311–1317. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600599>
- O'Brien, P., Siraki, A., & Shangari, N. (2005). Aldehyde sources, metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health. *Critical Reviews in Toxicology*, 35(7), 609–662. <https://doi.org/10.1080/10408440591002183>
- Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G., & Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327, 524–526. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/327524a0>
- Sanchez, Angélica B., Garcia, C. C. M., Freitas, F. P., Batista, G. L., Lopes, F. S., Carvalho, V. H., ... Medeiros, M. H. G. (2018). DNA Adduct Formation in the Lungs and Brain of Rats Exposed to Low Concentrations of [13 C 2]-Acetaldehyde. *Chemical Research in Toxicology*, 31(5), 332–339. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00016>
- Sanchez, Angélica Bianchini. (2017). *Mapeamento de adutos de DNA e investigação de possíveis biomarcadores de poluição urbana*. Universidade de São Paulo.
- Schmitt, N. D., & Agar, J. N. (2017). Parsing disease-relevant protein modifications from epiphenomena: perspective on the structural basis of SOD1-mediated ALS. *Journal of Mass Spectrometry*, 52(7), 480–491. <https://doi.org/10.1002/jms.3953>
- Shibata, N., Yamada, S., Uchida, K., Hirano, A., Sakoda, S., Fujimura, H., ... Kobayashi, M. (2004). Accumulation of protein-bound 4-hydroxy-2-hexenal in spinal cords from patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Research*, 1019(1–2), 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.05.110>
- Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative Stress. *Annu. Rev. Biochem*, 86, 715–748.

<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem>

- Sies, H., & Cadenas, E. (1985). Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, *311*(1152), 617–631. <https://doi.org/https://doi.org/10.1098/rstb.1985.0168>
- Spickett, C. M. (2013). The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal: Advances in chemistry and analysis. *Redox Biology*, *1*(1), 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.01.007>
- Stuerenburg, H. J., & Kunze, K. (1999). Concentrations of free carnosine (a putative membrane-protective antioxidant) in human muscle biopsies and rat muscles. *29*, 107–113.
- Taylor, J. P., Brown, R. H., & Cleveland, D. W. (2016). Decoding ALS: From genes to mechanism. *Nature*, *539*(7628), 197–206. <https://doi.org/10.1038/nature20413>
- Teufel, M., Saudek, V., Ledig, J. P., Bernhardt, A., Boularand, S., Carreau, A., ... Smirnova, T. (2003). Sequence identification and characterization of human carnosinase and a closely related non-specific dipeptidase. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(8), 6521–6531. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209764200>
- Traube, F. R., Schiffers, S., Iwan, K., Kellner, S., Spada, F., Müller, M., & Carell, T. (2019). Isotope-dilution mass spectrometry for exact quantification of noncanonical DNA nucleosides. *Nature Protocols*, *14*, 283–312. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0094-6>
- Tretyakova, N., Villalta, P. W., & Kotapati, S. (2013). Mass Spectrometry of Structurally Modified DNA. *Chemical Reviews*, *113*(4), 2395–2436. <https://doi.org/10.1021/cr300391r>
- Valentine, J. S., Doucette, P. A., & Potter, S. Z. (2005). Copper-Zinc Superoxide Dismutase and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Annu. Rev. Biochem.*, *74*, 563–593. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161647>
- Williams, T. I., Lynn, B. C., Markesbery, W. R., & Lovell, M. A. (2006). Increased levels of 4-

- hydroxynonenal and acrolein, neurotoxic markers of lipid peroxidation, in the brain in Mild Cognitive Impairment and early Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 27, 1094–1099. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.06.004>
- Winterbourn, C. C. (2008). Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature Chemical Biology*, 4(5), 278–286. <https://doi.org/10.1038/nchembio.85>
- Winterbourn, C. C., Vissers, M. C. M., & Kettle, A. J. (2000). Myeloperoxidase. *Current Opinion in Hematology*, 7(1), 53–58. <https://doi.org/10.1097/00062752-200001000-00010>
- Xie, Z., Baba, S. P., Sweeney, B. R., & Barski, O. A. (2013). Detoxification of aldehydes by histidine-containing dipeptides: From chemistry to clinical implications. *Chemico-Biological Interactions*, 202(1–3), 288–297. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.12.017>
- Yin, H., Xu, L., & Porter, N. A. (2011). Free Radical Lipid Peroxidation: Mechanisms and Analysis. *Chemical Reviews*, 111(10), 5944–5972. <https://doi.org/10.1021/cr200084z>
- Yu, R., Lai, Y., Hartwell, H. J., Moeller, B. C., Doyle-Eisele, M., Kracko, D., ... Swenberg, J. A. (2015). Formation, accumulation, and hydrolysis of endogenous and exogenous formaldehyde-induced DNA damage. *Toxicological Sciences*, 146(1), 170–182. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv079>
- Zelko, I. N., Mariani, T. J., & Folz, R. J. (2002). Superoxide Dismutase Multigene Family: a Comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) Gene Structures, Evolution, and Expression. *Free Radical Biology & Medicine*, 33(3), 337–349. <https://doi.org/10.1179/lan.2001.2.2.112>

ANEXO

Súmula Curricular

DADOS PESSOAIS

Nome: Mariane Leichsenring Schulz

Nascimento: São Paulo, 22 de março de 1994

EDUCAÇÃO

Instituto Adventista São Paulo, Hortolândia – SP Brasil, 2001-2008

Gottlieb-Daimler Realschule, Ludwigsburg – BW Alemanha, 2009-2010

Instituto Adventista São Paulo, Hortolândia – SP Brasil, 2011

Universidade de São Paulo, São Paulo – SP Brasil, 2013-2016

Bacharelado em Química com ênfase em Bioquímica e Biologia Molecular

Universidade de São Paulo, São Paulo – SP Brasil, 2014-Atual

Licenciatura em Química

Universidade de São Paulo, São Paulo – SP Brasil, 2017- Atual

Mestrado em Ciências Biológicas (Bioquímica)

Título: Investigação dos processos biológicos associados à produção endógena de aldeídos reativos

Orientadora: Marisa Helena Gennari de Medeiros

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

HPLC – Teoria Básica e Prática, Universidade de São Paulo, São Paulo – SP Brasil, 2018

OCUPAÇÃO

Bolsista de Mestrado, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES),

Abril de 2017 – Março de 2019

Publicações

Artigos Completos

Leaden, Laura; Silva, Larissa G.; Ribeiro, Rodolfo A.; dos Santos, Naara M.; Lorenzetti, Alan P. R.; Alegria, Thiago G. P.; Schulz, Mariane L.; Medeiros, Marisa H. G.; Koide, Tie; Marques, Marilis V. **Iron Deficiency Generates Oxidative Stress and Activation of the SOS Response in *Caulobacter crescentus***. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 1-14, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02014>

Frank S. Fernández-Silva, Mariane L. Schulz, Ingrid Reale Alves, Rubia R. Freitas, Raquel Paes da Rocha, Carina O. Lopes-Kulishev, Marisa H. G. Medeiros e Rodrigo S. Galhardo. **Contribution of GO system glycosylases to mutation prevention in *Caulobacter crescentus***. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, SUBMETIDO.

Resumo em Congressos

SCHULZ, M.L., OLIVEIRA, A.H.S., SANCHEZ, A.B., DI MASCIO, P., MEDEIROS, M.H.G. Development of Ultra-Sensitive HPLC-MS/MS Methodology for Quantitative Determination of DNS Lesions and its Application as a Tool for Detecting Redox Stress. 48ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Águas de Lindóia, 2019.