

Universidade Federal do Rio de Janeiro

GABRIEL FREITAS DE SOUZA

IMPACTO DA GLICAÇÃO NA FORMAÇÃO DE AGREGADOS DA COBRE/ZINCO
SUPERÓXIDO DISMUTASE 1 E SUA RELAÇÃO COM A ESCLEROSE LATERAL
AMIOTRÓFICA

Rio de Janeiro

2024

Gabriel Freitas de Souza

IMPACTO DA GLICAÇÃO NA FORMAÇÃO DE AGREGADOS DA COBRE/ZINCO
SUPERÓXIDO DISMUTASE 1 E SUA RELAÇÃO COM A ESCLEROSE LATERAL
AMIOTRÓFICA

Trabalho de conclusão de Curso submetido ao
Corpo Docente do Instituto de Química, como
parte dos requisitos necessários à obtenção do
grau de químico com atribuições tecnológicas.

Orientadora: Prof. Elis Cristina Araújo Eleutherio

Co-Orientador: Prof. Cristian Follmer

Rio de Janeiro

2024

Agradecimentos

Gostaria inicialmente de agradecer aos órgãos de fomento, CNPq e FAPERJ, pela ajuda financeira que permitiu o desenvolvimento do projeto de iniciação científica.

Agradecer aos meus pais, por me criarem e me apoiarem durante todos os anos de graduação, me incentivando sempre a me dedicar aos estudos e ser alguém melhor.

Agradecer à minha namorada, por todos os conselhos e incentivos, trazendo alegria para minha vida nos momentos difíceis e sempre apoiando minhas decisões.

Agradecer aos meus colegas de laboratório, Gabi, Luan, Vanessa, Carol e Roberta, e ex-colegas de laboratório, Rayne e Raphael, por toda ajuda durante minha iniciação científica e por tornarem o laboratório um lugar tão agradável e amigável.

Agradecer aos amigos que fiz durante a graduação, Gustavo, Pedro e Jonatan, por tornarem essa jornada menos solitária.

Agradecer ao professor Cristian, por aceitar ser meu co-orientador e por todos os ensinamentos passados durante esse ano, sempre me apoiando durante os experimentos e ajudando a entender os problemas que ocorreram.

Agradecer à minha orientadora, professora Elis, por todos os ensinamentos que me passou durante todos esses anos, me apoiando e incentivando a ser um aluno melhor, dando dicas e conselhos, sendo a principal responsável pelo meu desenvolvimento acadêmico.

Resumo do projeto final apresentado ao Instituto de Química como parte dos requisitos necessários para conclusão do curso de Química com Atribuições Tecnológicas.

IMPACTO DA GLICAÇÃO NA FORMAÇÃO DE AGREGADOS DA COBRE/ZINCO SUPERÓXIDO DISMUTASE 1 E SUA RELAÇÃO COM A ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA

Gabriel Freitas de Souza

Orientadora: Prof. Elis Cristina Araújo Eleutherio

Co-orientador: Prof. Cristian Follmer

A esclerose lateral amiotrófica (ELA) é uma doença agressiva, progressiva e fatal que afeta os neurônios motores. A proteopatia da enzima Cu/Zn superóxido dismutase 1 (SOD1) é comum a todos os tipos de ELA (familiar ou esporádica, ligadas ou não a mutações, respectivamente), sendo encontrada mal enovelada em regiões que apresentam degeneração nos pacientes. Além de ser uma enzima antioxidante, SOD1 regula outros processos que são importantes para o funcionamento do sistema nervoso central, como a resposta ao estresse oxidativo, a produção de espécies reativas de oxigênio pela cadeia respiratória, a expressão de genes de defesa antioxidante, o processamento de RNA e a glicólise aeróbica. Portanto, danos irreversíveis à SOD1, como oxidação e glicação, afetariam a estabilidade estrutural da SOD1, levando ao acúmulo de SOD1 mal enovelada e à consequente perda de função. Tendo em vista que o agente glicante metilglioxal (MGO), subproduto tóxico do metabolismo de carboidratos, é capaz de induzir a formação de agregados de proteínas ligadas às doenças neurodegenerativas, neste trabalho buscou-se avaliar o efeito do MGO na agregação da SOD1 humana WT e A4V, uma mutação agressiva para casos de ELA familiar, e verificar se o açúcar trealose apresenta capacidade de inibir a agregação e proteger a proteína contra danos. Foi possível verificar que a trealose se mostrou eficaz na diminuição dos níveis de oligômeros de SOD1WT, realizando proteção contra danos mediados pelo MGO. Os resultados obtidos para a SOD1A4V mostraram a formação de espécies de alta massa molecular, maiores que os oligômeros de SOD1WT, formados durante a cinética de agregação, podendo ser a presença da mutação

um fator essencial para a desestabilização da proteína e o desenvolvimento de espécies distintas das formadas para a SOD1WT. Além disso, o tratamento da SOD1A4V com trealose se mostrou eficaz para a diminuição da formação de espécies de alta massa molecular, mostrando a capacidade protetora deste açúcar contra a agregação.

Índice

1. Introdução.....	15
1.1. Esclerose lateral amiotrófica (ELA)	15
1.2. Cu/Zn superóxido dismutase 1	16
1.2.1. Estrutura	16
1.2.2. Funções da SOD1	18
1.2.3. Mutações de SOD1	19
1.3. Modificações pós-traducionais	21
1.3.1. Glicação.....	23
1.4. Tratamentos para ELA	26
1.4.1. Trealose.....	27
2. Objetivo.....	29
3. Materiais e métodos.....	30
3.1. Transformação de bactéria.....	30
3.2. Purificação de SOD1 recombinante	31
3.3. Cinética de agregação in vitro de SOD1	32
3.4. Nível de agregados de SOD1.....	32
3.5. Nível de SOD1 por dot blot.....	33
3.6. Cromatografia de exclusão por tamanho	34
3.7. Espalhamento dinâmico de luz.....	34
3.8. Atividade de SOD1 in situ	34
3.9. Análises estatísticas.....	35
4. Resultados.....	36
4.1. Transformação E.coli e teste de expressão de SOD1	36
4.2. Purificação de SOD1 recombinante	36
4.3. Cinética de agregação	37
4.4. Nível de formação de agregados solúveis de SOD1	38
4.5. Nível de dano MGO durante incubação	40
4.6. Nível de SOD1 mutante por dot blot.....	42
4.7. Cromatografia de exclusão por tamanho	43
4.8. Espalhamento dinâmico de luz.....	44

4.9. Atividade de SOD1	46
5. Discussão	48
6. Conclusões	53
7. Referências.....	54

Lista de figuras

- Figura 1.** Representações estruturais da SOD1. (A) Sequência primária de aminoácidos da SOD1 com as regiões das fitas- β em destaque. Alguns resíduos foram destacados: em verde, resíduos localizados na interface dimérica; em azul e vermelho, resíduos importantes para a ligação com metais; e em amarelo, resíduos de cisteína ligados pela ligação dissulfídica. (B) Estrutura terciária da SOD1 mostrando as oito fitas- β formando a conformação de chave grega barril- β . (C-D) Representação das ligações e interações entre os resíduos de histidina e o íon Cu^{2+} (esfera laranja) no loop eletrostático. Os bastões vermelhos representam moléculas de água. Retirado de Eleutherio et. al., Arch. Biochem. Biophys., 2021 (ELEUTHERIO et al., 2021). 17
- Figura 2.** Reação enzimática de dismutação do radical superóxido. (1) Reação de oxidação do superóxido em oxigênio molecular, reduzindo o íon de cobre. (2) Reação de redução do radical em peróxido de hidrogênio, restaurando o íon Cu^{2+} . (3) Reação global de dismutação do radical superóxido. 18
- Figura 3.** Exemplos de mutações em diferentes regiões ao longo da SOD1. (A) Resíduos modificados na região de interface dimérica. (B) Resíduos modificados na região de loop da proteína. (C) Resíduos modificados na região de barril beta. (D) Resíduos modificados na região de formação de ligação com cobre e zinco. Adaptado de Wright et al., Quat. Rev. Bioph., 2019 (WRIGHT et al., 2019). 20
- Figura 4.** (A) Representação do transporte da SOD1 para o núcleo quando fosforilada em Ser59 e Ser98, ativando genes de resposta contra o estresse oxidativo. (B) Representação da modulação da acetilação em Lys122 e a capacidade de interação entre SOD1 e complexo I da cadeia transportadora de elétrons. Adaptado de Eleutherio et. al., Arch. Biochem. Biophys., 2021 (ELEUTHERIO et al., 2021). 22
- Figura 5.** Formação de metilglioxal a partir de intermediários da via glicolítica e via de degradação do metilglioxal pela via das glioxalases em célula neural (GAFFNEY et al, 2020). 24

Figura 6. Danos em cadeias laterais de resíduos de proteínas ocasionados pelo MGO. (A) Reação do MGO com resíduo de arginina formando o intermediário metilglioxal hidroimidazolona, que se desenvolve para os três isômeros MG-H1, MG-H2 e MG-H3, sendo o MG-H3 sofrendo hidrólise e formando o N^ε-carboxietil arginina (CEA). (B) Reação do MGO com resíduo de lisina formando o N-ε-(carboxietil)lisina. (C) Reação do MGO com resíduo de cisteína levando a formação do hemimercaptal, que pode formar adutos inter e intramoleculares ao reagir com grupo amino de outras moléculas (D). Adaptado de Polykretis et al., Redox Biol., 2020 (POLYKRETIS et al., 2020)..... 25

Figura 7. Estrutura da trealose (PUPYSHEV et al, 2022)..... 27

Figura 8. Esquema resumido do plasmídeo pET-15b expressando hSOD1WT ou hSOD1A4V, apresentando um promotor T7 que conduz a transcrição da proteína recombinante em resposta à indução por IPTG, a sequência da proteína de interesse fusionada a uma sequência de seis histidinas ligadas à SOD1, importante para a etapa de purificação por afinidade, e uma região contendo gene que confere resistência à ampicilina. 30

Figura 9. Avaliação de indução temporal da SOD1: Realizado em duplicata biológica, utilizando 1 mM de IPTG durante 0h ou 4h, onde as amostras de lisado foram analisadas em 15% SDS-PAGE. O retângulo vermelho marca a região da altura da SOD1. Primeira linha referente ao marcador de peso molecular..... 36

Figura 10. Perfil de purificação por afinidade: Foto representativa do perfil de purificação para a SOD1. Primeira linha referente ao marcador de peso molecular. A linha “não retido” representa todas proteínas que não apresentaram ligação com a resina de níquel e as linhas “lavagem 1” e “lavagem 2” representam proteínas com fraca ligação à resina quando passado o tampão de limpeza contendo 30 mM de imidazol. As eluições realizadas com tampão contendo 500 mM de imidazol, coletadas de 2 em 2 mL, apresentaram maior concentração de proteína nas três primeiras frações. O retângulo vermelho marca as frações unidas e dialisadas.. 37

Figura 11. Acompanhamento da formação de fibras amiloides: Gráfico dos níveis de fluorescência da sonda ThT durante o ensaio de agregação, não sendo verificada para nenhuma condição de incubação o aumento da fluorescência, indicando que não houve a formação de fibras amilóides. Figura (A) representando ensaio para a hSOD1WT e figura (B) representando ensaio para a hSOD1A4V. 38

Figura 12. Avaliação da formação de trimeros de SOD1: (A) Aplicação de 10 μ M de proteína em cada poço. Imagem representativa do perfil de fracionamento das amostras após a agregação, realizando marcação com anti-SOD1, evidenciando a formação de trimeros de SOD1 estáveis em condições desnaturantes. Foram realizados três fracionamentos independentes. (B) Nível de trimeros de SOD1 formados após a cinética de agregação, observados por SDS-PAGE. Os níveis foram obtidos pelas quantificações das bandas no software ImageJ. Os valores foram expressos como Média \pm desvio padrão. As diferenças estatísticas foram calculadas usando o one-way ANOVA com correção de Sidak para comparações múltiplas, com significância de ****P < 0,0001 39

Figura 13. Danos mediados por metilglioxal em trimeros de SOD1 (A) Aplicação de 10 μ M de proteína em cada poço Imagem representativa do perfil de marcação de danos mediados por MGO nas amostras após a agregação. Foram realizados três fracionamentos independentes. (B) Nível de dano de MGO em trimeros de SOD1 formados após a cinética de agregação, observados por SDS-PAGE. Os níveis foram obtidos pelas quantificações das bandas no software ImageJ. Os valores foram expressos como Média \pm desvio padrão. As diferenças estatísticas foram calculadas usando o one-way ANOVA com correção de Sidak para comparações múltiplas, com significância de ***P < 0,001 e ****P < 0,0001. 41

Figura 14. Avaliação dos níveis de SOD1A4V por dotblot: (A) Imagem representativa do dot blot. (B) Comparação entre os níveis de SOD1 obtidos a partir das técnicas de dot blot para as amostras da A4V após a cinética de agregação. Os níveis foram obtidos pelas quantificações das bandas no software ImageJ. As diferenças estatísticas foram calculadas usando o one-way ANOVA com correção de Sidak para comparações múltiplas, com significância de **P < 0,01. Análise realizada três vezes..... 43

Figura 15. Cromatografia de exclusão por tamanho realizada para hSOD1A4V:

Perfil do cromatograma da cromatografia de exclusão por tamanho realizada para as amostras de SOD1A4V. A variação da intensidade das bandas é proporcional à variação das formações de espécies de alta massa molecular associadas ao volume de eluição próximo de 7,5 mL. 44

Figura 16. Quantificação da atividade de hSOD1WT (A) Aplicação de 10 µM de

proteína em cada poço. Imagem representativa do perfil do gel de corrida não desnaturante das amostras após a agregação. (1) WT; (2) WT + trealose 10%; (3) WT + 5 mM MGO; (4) WT + 5 mM MGO + trealose 10%; (5) WT + 10 mM MGO; (6) WT + 10 mM MGO + trealose 10%. (B) Quantificação da atividade de SOD1 para as diferentes condições após a cinética de agregação. Os níveis foram obtidos pelas quantificações das bandas de SOD1 em gel nativo utilizando o software ImageJ. Os valores foram expressos como Média ± desvio padrão. As diferenças estatísticas foram calculadas usando o one-way ANOVA com correção de Sidak para comparações múltiplas, com significância de *P < 0,05 e **P < 0,01..... 47

Lista de tabelas

Tabela 1. Dados do espalhamento de luz dinâmico (DLS) das amostras após a cinética de agregação. “%intensidade” indica a intensidade da luz é espalhada a partir da espécie encontrada e “%Pd” é relacionado à distribuição normal para cada espécie, obtida a partir das 10 aquisições totais realizadas durante o experimento.
..... 45

Tabela 2. Dados do espalhamento de luz dinâmico (DLS) das amostras após a cinética de agregação. “%intensidade” indica a intensidade da luz é espalhada a partir da espécie encontrada e “%Pd” é relacionado à distribuição normal para cada espécie, obtida a partir das 10 aquisições totais realizadas durante o experimento.
..... 46

Lista de abreviações

AGEs – do inglês, *advanced glycation end products*

Ala – Alanina

Arg – Arginina

Asp – Ácido aspártico

BSA – do inglês, *bovine serum albumin*

CK1 γ – Gama caseína quinase 1

Cys – Cisteína

DHAP – Dihidroxiacetona fosfato

DNA – do inglês, *Deoxyribonucleic Acid*

EDTA – Ácido etilenodiamina tetra-acético

ELA – Esclerose Lateral Amiotrófica

ELAe – Esclerose Lateral Amiotrófica esporádica

ELAf – Esclerose Lateral Amiotrófica familiar

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

FDA – do inglês, *Food and Drugs Administration*

GLO1 – Glioxalase 1

GLO2 – Glioxalase 2

GSH – Glutathiona reduzida

Gly – Glicina

His – Histidina

Ile – Isoleucina

IPTG – do inglês, *Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside*

LB – do inglês, *Luria-Bertani broth*

Lys – Lisina

MGO – Metilglioxal

MG-H1 – Metilglioxal Hidroimidazolona 1

MG-H2 – Metilglioxal Hidroimidazolona 2

MG-H3 – Metilglioxal Hidroimidazolona 3

MPTs – Modificações Pós-Traducionais

mTORC1 – do inglês, *mammalian Target of Rapamycin Complex 1*

NBT – do inglês, *Nitroblue Tetrazolium*

OD – do inglês, *optical density*

PBS – do inglês, *Phosphate Buffer Saline*

PSA – Persulfato de Amônio

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfanila

RAGE – do inglês, *receptor of advanced glycation end products*

RPM – Rotação por minuto

SDS – do inglês, *sodium dodecyl sulfate*

Ser – Serina

SIRT5 – Sirtuina 5

SOD1 – Cu/Zn superóxido dismutase 1

TDP 43 – do inglês, *transactive DNA-binding protein 43*

TEMED – Tetrametiletilenodiamina

Thr – Treonina

ThT – Tioflavina-T

Trp – Triptofano

1. Introdução

1.1. Esclerose lateral amiotrófica (ELA)

A ELA é uma doença neurodegenerativa progressiva e rara, capaz de afetar os neurônios motores superiores, localizados no córtex cerebral, e os neurônios motores inferiores, localizados na medula espinhal. Apresenta o desenvolvimento de sintomas como fraqueza muscular, atrofia e, eventualmente, paralisia, que frequentemente causa morte devido à insuficiência respiratória neuromuscular (FIRSTENFELD et al., 2023). Devido à rápida progressão dos sintomas, é caracterizada como uma doença agressiva, apresentando uma expectativa de vida média dos pacientes em torno de 3 a 5 anos após o início dos sintomas, tendo um alto grau de variabilidade na idade de início dos sintomas, na região e na progressão da doença (MASRORI; VAN DAMME, 2020).

A ELA pode ser dividida entre casos do tipo esporádico (ELAe), onde os pacientes não apresentam quadros da doença na família, compondo 90-95% dos casos, e familiar (ELAf), onde os pacientes apresentam quadro da doença na família, compondo 5-10% dos casos. A incidência da doença atinge cerca de 5 por 100.000 pessoas mundialmente por ano na faixa etária com maior risco de desenvolver ELA (45–75 anos), com a idade média no início dos sintomas variável: 58–63 anos para ELAe e 40–60 anos para ELAf (TALBOTT et al., 2016; AL-KHAYRI et al, 2024).

É possível verificar uma conexão entre o desenvolvimento da doença e a idade avançada dos pacientes, correlacionando a ELA com o processo de envelhecimento celular e o aumento do estresse oxidativo presente nas células. O envelhecimento é o principal fator de muitas doenças, incluindo câncer, doenças metabólicas, cardíacas e neurodegenerativas, estando ligado a uma perda de homeostase, envolvendo degradação de componentes estruturais, manutenção celular reduzida e uma diminuição na função fisiológica e metabolismo geral (SIES, 2015). Atualmente, as duas principais teorias existentes para explicar o estresse oxidativo: i) a teoria dos radicais livres de Harman, 1956, que relaciona alterações na função metabólica e mitocondrial normais induzidas pela produção de radicais livres, que causam danos e desenvolvem o envelhecimento (HARMAN, 1956); ii) a teoria mitocondrial do envelhecimento de Miquel e colaboradores, 1980, que

postula que o desequilíbrio entre a produção de radicais livres e os mecanismos de proteção é o principal responsável pelo envelhecimento (MIQUEL et al., 1980).

Em geral, as doenças neurodegenerativas podem apresentar como marca neuropatológica a presença de agregados e inclusões como, por exemplo, a agregação de alfa-sinucleína e beta-amiloide/tau em doença de Parkinson e Alzheimer, respectivamente (DUGGER; DICKSON, 2017). A agregação pode ocorrer como resultado da associação entre conformações proteicas não nativas, através de contatos intermoleculares, promovendo a formação de oligômeros, agregados amorfos ou agregados fibrilares altamente ordenados, chamados agregados amiloides. A ELA também é caracterizada pela agregação e acúmulo de proteínas mal-enoveladas em neurônios motores que podem levar a toxicidade e degeneração (HARDIMAN, 2017).

Uma proteína que apresenta destaque na patologia de agregação envolvida na ELA, presente nos casos esporádico e familiar, é a Cu/Zn superóxido dismutase 1 (SOD1). Na ELAf, essa proteína foi relacionada com a doença através da presença de mutações, onde está presente em 20% dos casos relacionados com ELAf e, para a ELAe, foi relacionada a partir da presença da proteína mal enovelamento (SRINIVASAN e RAJASEKARAN, 2020).

1.2. Cu/Zn superóxido dismutase 1

1.2.1. Estrutura

A SOD1 é uma metaloenzima homodimérica de 32kDa, composta por uma subunidade monomérica de 153 aminoácidos. Apresentando uma estrutura subdividida em 3 segmentos principais: N-terminal (resíduos 1–37), que contém os 3 primeiros domínios de fita β ; resíduos 38–90, que compreende o *loop* de zinco e dois domínios de fita β ; C-terminal (resíduos 91–153), onde se encontram os outros 3 domínios da fita β e um *loop* eletrostático, que tem importância catalítica e estrutural (**figura 1A-B**) (ELEUTHERIO et al., 2021).

Cada subunidade contém cofatores metálicos de Cu^{2+} e Zn^{2+} que apresentam funções catalítica e estrutural, respectivamente. A região de ligação com o íon Cu^{2+} é caracterizada como região de *loop* eletrostático, apresentando aminoácidos carregados positivamente e polares como Lys136, Thr137 e Arg143,

metais; e em amarelo, resíduos de cisteína ligados pela ligação dissulfídica. (B) Estrutura terciária da SOD1 mostrando as oito fitas- β formando a conformação de chave grega barril- β . (C-D) Representação das ligações e interações entre os resíduos de histidina e o íon Cu^{2+} (esfera laranja) no *loop* eletrostático. Os bastões vermelhos representam moléculas de água. Retirado de Eleutherio et. al., Arch. Biochem. Biophys., 2021 (ELEUTHERIO et al., 2021).

A SOD1 pode ser classificada como uma proteína intrinsecamente desordenada, não possuindo uma estrutura secundária/terciária estável em condições fisiológicas, apresentando elementos de estrutura conformacional transiente. Por possuir essa característica, apresenta grande capacidade de se ligar a diferentes alvos moleculares, desempenhando diferentes funções como regulação, sinalização e controle (ELEUTHERIO et al., 2021).

1.2.2. Funções da SOD1

A SOD1 foi descrita inicialmente por sua função catalítica, realizando a dismutação de radicais superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (FRIDOVICH, 1995). Esse processo é dividido em duas etapas, sendo a primeira uma oxidação do radical superóxido a oxigênio molecular, realizando a redução do Cu^{2+} para Cu^+ no sítio catalítico e, posteriormente, o metal é reoxidado à Cu^{2+} a partir da redução do radical à peróxido de hidrogênio (**Figura 2**).

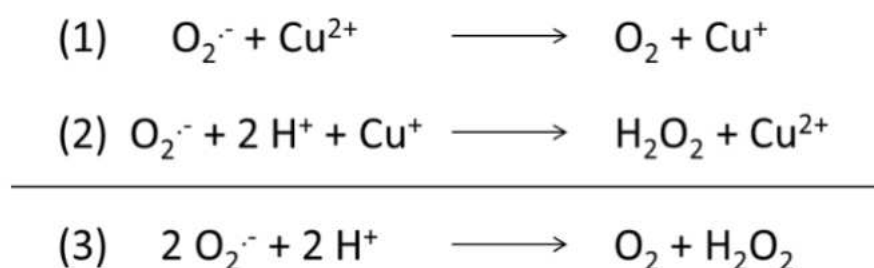


Figura 2. Reação enzimática de dismutação do radical superóxido. (1) Reação de oxidação do superóxido em oxigênio molecular, reduzindo o íon de cobre. (2) Reação de redução do radical em peróxido de hidrogênio, restaurando o íon Cu^{2+} . (3) Reação global de dismutação do radical superóxido.

Além de sua função catalítica, a SOD1 apresenta outras atribuições já identificadas. Em resposta ao estresse oxidativo e ao aumento de peróxido de hidrogênio nas células, a SOD1 pode funcionar como um fator de transcrição

nuclear, migrando para o núcleo e ativando promotores de defesa da célula como genes envolvidos na resposta ao estresse, dano ao DNA e na defesa antioxidante (TSANG et al., 2014). Em estudos com leveduras, os genes-alvo da SOD1 incluíram aspectos relacionados à resistência ao estresse oxidativo, reparo de danos ao DNA e à manutenção da estabilidade do genoma (INOUE et al., 2010). Esse mecanismo de proteção da SOD1 está intimamente associado à modificação pós-traducional via fosforilação dos resíduos de Ser59 e Ser98, que servem como um sinal para direcionar a proteína ao núcleo (TSANG et al., 2014).

A SOD1 pode também interagir com o complexo I da cadeia respiratória na mitocôndria para regular a taxa respiratória e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo esta função modulada pela SIRT5, capaz de reverter a succinilação da SOD1 na Lys122 permitindo a interação da proteína com o complexo I, uma vez que isso não ocorreria com a enzima na forma succinilada (LIN et al., 2013; BANKS et al., 2017).

No citoplasma, onde está presente em maior quantidade, a SOD1 consegue se ligar à gama-caseína quinase 1 (CK1 γ), estabilizando-a. Essa estabilização sinaliza um aumento na absorção de glicose pelas células e favorece a glicólise aeróbica (ELEUTHERIO et al., 2021). Esse processo ocorre devido à atividade enzimática da SOD1, que, ao se ligar à CK1 γ , promove a formação de H₂O₂. Este, por sua vez, reage com a quinase, oxidando os resíduos de Lys383, Lys386 e Lys390, o que impede que a CK1 γ seja ubiquitinada e levada à degradação (REDDI; CULOTTA, 2013). Além disso, outra forma de regulação desta via ocorre pelo complexo mTORC1, que controla a atividade da SOD1 por meio da fosforilação da proteína em Thr39 (TSANG et al., 2018).

Além da proteção antioxidante da célula, estas diversas funções da SOD1 evidenciam sua importância, na manutenção de um ambiente celular saudável e equilibrado, sugerindo que sua disfunção pode prejudicar de forma severa a viabilidade e a manutenção celular.

1.2.3. Mutações na SOD1

Mais de 200 mutações já foram identificadas na SOD1 estando relacionadas com a ELA familiar (KALIA et al., 2023). A maioria dessas mutações levam à

substituição em um aminoácido específico, mas outras podem levar a deleções, inserções, truncamentos ou alteração na sequência de leitura no momento de sua tradução (VALENTINE et al., 2005; WANG et al, 2024).

Dependendo da localização em que ocorre a substituição do aminoácido na mutação, temos um efeito específico na estabilidade, conformação e enovelamento da proteína. A mutante Ala4Val causa repulsão eletrostática em torno do local da mutação, enquanto Ile113Thr e Ile149Thr interrompem as interações de Van der Waals na interface do dímero e no interior da proteína, respectivamente (**figura 3A**). Nas conformações de *loop* da proteína, mutações como Gly93Ala e Gly37Arg, causam repulsão entre o *loop* III e *loop* V e entre o *loop* II e *loop* III, respectivamente (**figura 3B**). Mutantes em resíduos de barril- β como Leu38Val interrompem as interações de Van der Waals no interior da SOD1 e His43Arg quebram uma rede de ligações de hidrogênio estabilizadoras (**figura 3C**). Mutantes da região de ligação metálica como Gly85Arg causa repulsão e desestabiliza a ligação com zinco, enquanto His46Arg evita a ligação do cobre e desestabiliza o circuito eletrostático (**figura 3D**). (WRIGHT et al., 2019).

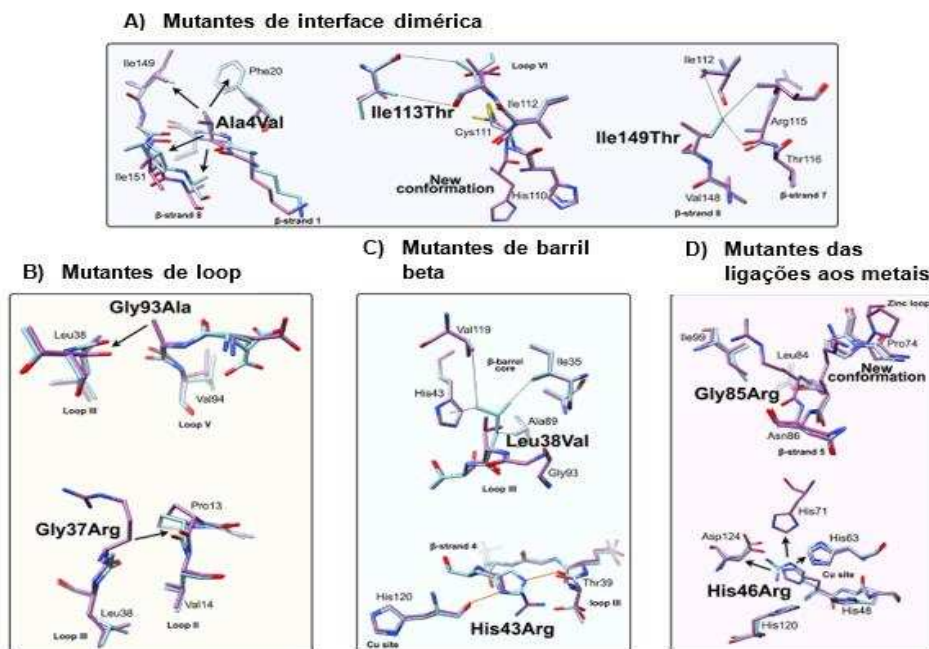


Figura 3. Exemplos de mutações em diferentes regiões ao longo da SOD1. (A) Resíduos modificados na região de interface dimérica. (B) Resíduos modificados na região de *loop* da proteína. (C) Resíduos modificados na região de barril beta. (D) Resíduos modificados na região de formação de ligação com cobre e zinco. Adaptado de Wright et al., Quat. Rev. Bioph., 2019 (WRIGHT et al., 2019).

A mutação A4V é a mais frequentemente associada à ELA nos Estados Unidos, presente em cerca de 50% dos pacientes com ELA associados à SOD1 (GIANNAKOU et al, 2024). Indivíduos com a mutação A4V podem desenvolver a doença em qualquer idade, com uma sobrevida média de apenas 1,4 anos após os primeiros sintomas, mostrando ser uma forma muito agressiva da doença. Fenotipicamente, a mutação A4V é marcada por um início repentino e acentuado dos sintomas, com uma progressão da doença bastante rápida, geralmente manifestando-se como fraqueza muscular nos membros ou nos músculos bulbares (KAUR et al., 2016).

Foi demonstrado em um estudo realizado por Brasil e colaboradores, utilizando modelos de *Saccharomyces cerevisiae* e célula animal H4, que a mutação SOD1-A4V apresentou uma menor atividade enzimática, prejudicando a conversão de EROs, levando ao acúmulo e causando danos às proteínas e lipídios, uma maior formação de inclusões citoplasmáticas e um aumento na toxicidade, em comparação com a SOD1 selvagem (BRASIL et al., 2019).

1.3. Modificações pós-traducionais

Modificações pós-traducionais (MPTs) são ligações covalentes que podem ocorrer nas proteínas de forma enzimática ou não enzimática, inserindo grupos químicos específicos nas cadeias laterais dos aminoácidos constituintes das proteínas. As MPTs podem afetar aspectos das proteínas como, por exemplo, localização, função e enovelamento, sendo fundamental para a estabilidade proteolítica de uma proteína. Em geral, as MPTs mais estudadas nas proteínas são fosforilação, acetilação, metilação, glicosilação, palmitoilação, glicação e nitrosilação (LEE et al., 2023).

A SOD1 pode sofrer diferentes MPTs reversíveis que são fundamentais para o papel que a proteína desenvolve na célula, modulando sua função e localização. Como exemplo, fosforilações nos resíduos de Ser59 e Ser98, promovem a localização nuclear da SOD1 na presença de estresse oxidativo, ativando promotores de defesa contra o estresse e dano ao DNA e na defesa antioxidante (**figura 4^a**) (TSANG et al., 2014); além de acetilações na Lys122, modulada pela SIRT5, que altera a capacidade de interação entre a SOD1 e o complexo I da cadeia

transportadora de elétrons, modulando a respiração e a formação de EROs (**figura 4B**) (BANKS et al., 2017).

Além disso, MPTs irreversíveis podem ocorrer na SOD1 de forma a prejudicar a sua estabilidade e enovelamento, propiciando processos de agregação da proteína (BANKS et al., 2017). Devido ao seu papel na dismutação do radical superóxido, a SOD1 tem uma grande propensão a sofrer danos oxidativos, como a introdução de grupos carbonila nos resíduos de histidina, lisina, arginina, treonina, prolina e cisteína (ELEUTHERIO et al., 2021). Além disso, o processo de envelhecimento celular e o aumento do estresse oxidativo levam a uma maior propensão de ocorrência destas alterações nas células (BAEK et al, 2022).

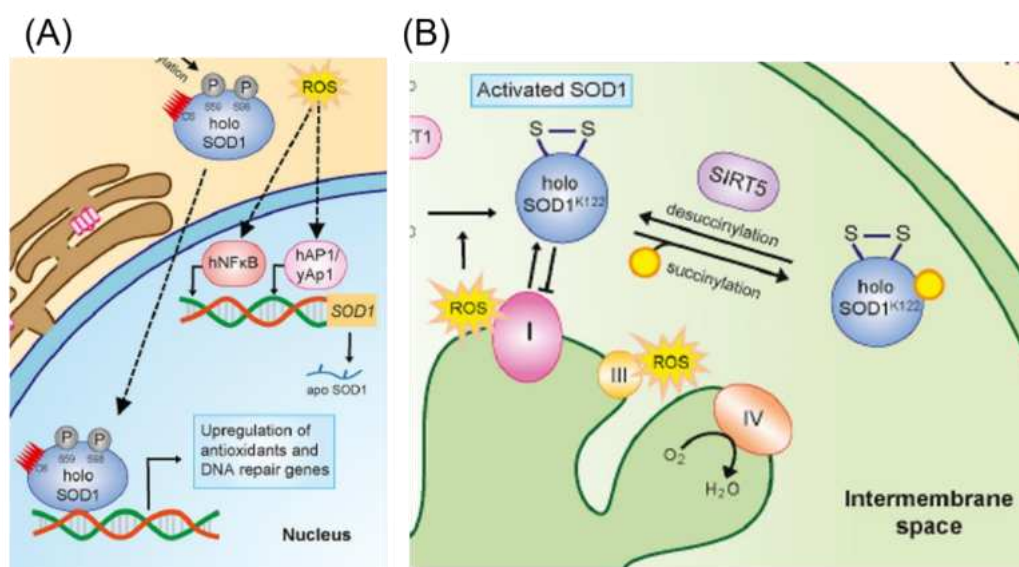


Figura 4. (A) Representação do transporte da SOD1 para o núcleo quando fosforilada em Ser59 e Ser98, ativando genes de resposta contra o estresse oxidativo. (B) Representação da modulação da acetilação em Lys122 e a capacidade de interação entre SOD1 e complexo I da cadeia transportadora de elétrons. Adaptado de Eleutherio et. al., Arch. Biochem. Biophys., 2021 (ELEUTHERIO et al., 2021).

Guareschi e colaboradores demonstraram que a SOD1 do tipo selvagem apresenta hiperagregação quando oxidada, tendo uma forte correlação entre os danos oxidativos e o processo de desenvolvimento da patologia ligada à SOD1 em casos de ELAe (GUARESCHI et al., 2012). Além disso, pacientes com ELA que apresentam SOD1 com deficiência de Zn^{2+} mostram um aumento significativo de oxidações nos resíduos de His48 e His63 na SOD1 localizada na medula espinhal ventral (TRIST et al., 2022b). Oxidações nos resíduos de Trp32 levam à formação

de ligações covalentes de ditriptofano entre os triptofanos dos monômeros, resultando no mal enovelamento da SOD1, oligomerização e agregação não amiloide da proteína (COELHO et al., 2014; FIGUEROA et al., 2020). Em adição, mutantes de SOD1, característicos de ELAf, como as mutações G93A, A4V e L38V, apresentam níveis mais altos de carbonilação do que SOD1WT, em neuroglioma (BRASIL et al., 2018).

Mesmo com a grande ênfase nos estudos de oxidação da SOD1, sua relação com o processo de envelhecimento e desenvolvimento da patologia de ELA, outra modificação irreversível que pode ser abordada e relacionada com doenças neurodegenerativas é a glicação, muito correlacionada com doenças de Parkinson e Alzheimer (LI et al., 2013; VICENTE MIRANDA et al., 2017; FARZADFARD et al., 2022).

1.3.1. Glicação

A glicação é uma MPTs irreversível não enzimática que pode ocorrer em resíduos de lisina e arginina a partir de açúcares redutores (D-Ribose e D-Glicose) ou derivados do metabolismo de glicídios (Glioxal e Metilglioxal) (SIRANGELO et al., 2016). A modificação de glicação leva a produção de agentes de glicação avançada (AGEs – *Advanced Glycation End-products*) que são criados por meio de condensação entre grupos carbonila e grupos amina livres de ácidos nucleicos, proteínas ou lipídios, seguida por rearranjos adicionais produzindo produtos finais estáveis e irreversíveis (TWARDA-CLAPA et al., 2022). Os AGEs são capazes de interagir com a proteína receptora de agentes de glicação avançada (RAGE) promovendo o estresse oxidativo e levando à produção de citocinas pró-inflamatórias e reações inflamatórias (SHEN et al., 2020). Além disso, foi demonstrando que o acúmulo de agregados de proteínas nas células pode ser favorecido pelo de glicação (HAQUE et al., 2019).

O metilglioxal (MGO) pode ser formado nas células majoritariamente como um subproduto da via glicolítica, a partir dos intermediários gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona-fosfato, por ação da metilglioxal sintase (KALAPOUS, 1999). Alternativamente, o MGO pode ser produzido de forma espontânea a partir da dihidroxiacetona fosfato (DHAP) via perda do grupamento fosfato. (POLYKRETIS

et al, 2020). Por se tratar de uma molécula dicarbonil reativa, o MGO pode ser um agente que leva a formação de AGEs, contribuindo para disfunção celular e tecidual. As células apresentam como via principal de degradação do MGO a via das glioxalases, onde a glioxalase 1 (GLO1) e a glioxalase 2 (GLO2), junto com o GSH reduzido, transformam o MGO em D-lactato, protegendo a célula desse composto (**figura 5**) (ALHUJAILY, 2024).

Estudos demonstraram que há uma forte correlação entre a queda da síntese da GLO1 e o processo de envelhecimento, apresentando uma diminuição progressiva dessa enzima nos neurônios e comprometendo a proteção contra o agente glicante (KUHILA et al., 2006; YANG et al, 2022). Juntamente com essa queda, há um aumento de formação de AGEs durante o envelhecimento, mostrando uma maior suscetibilidade de danos de glicação de proteínas e outras biomoléculas (LÜTH et al., 2005; YANG et al, 2022).

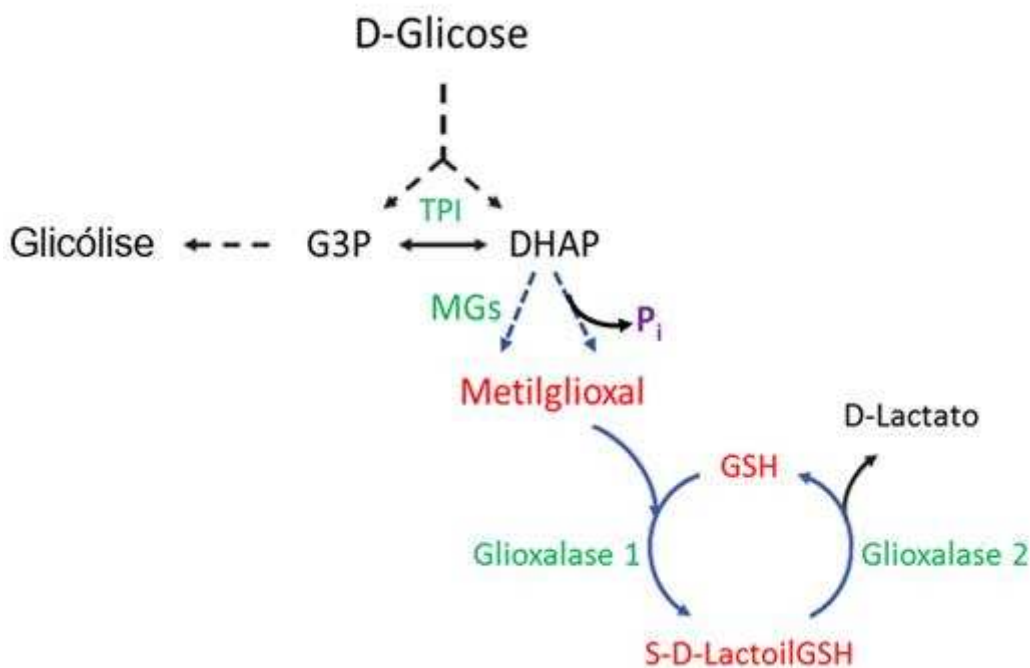


Figura 5. Formação de metilglioxal a partir de intermediários da via glicolítica e via de degradação do metilglioxal pela via das glioxalases em célula neural (GAFFNEY et al, 2020).

Os danos mediados por MGO em SOD1 podem ocorrer em resíduos de lisina, arginina e cisteínas, que podem levar à alteração das cadeias laterais destes

aminoácidos e instabilidade e perda de conformação da SOD1 (POLYKRETIS et al., 2020). Essas modificações nas cadeias laterais podem ser observadas na **figura 6**, mostrando mudança de carga, polaridade e formação de adutos que podem ajudar no processo de agregação de proteínas.

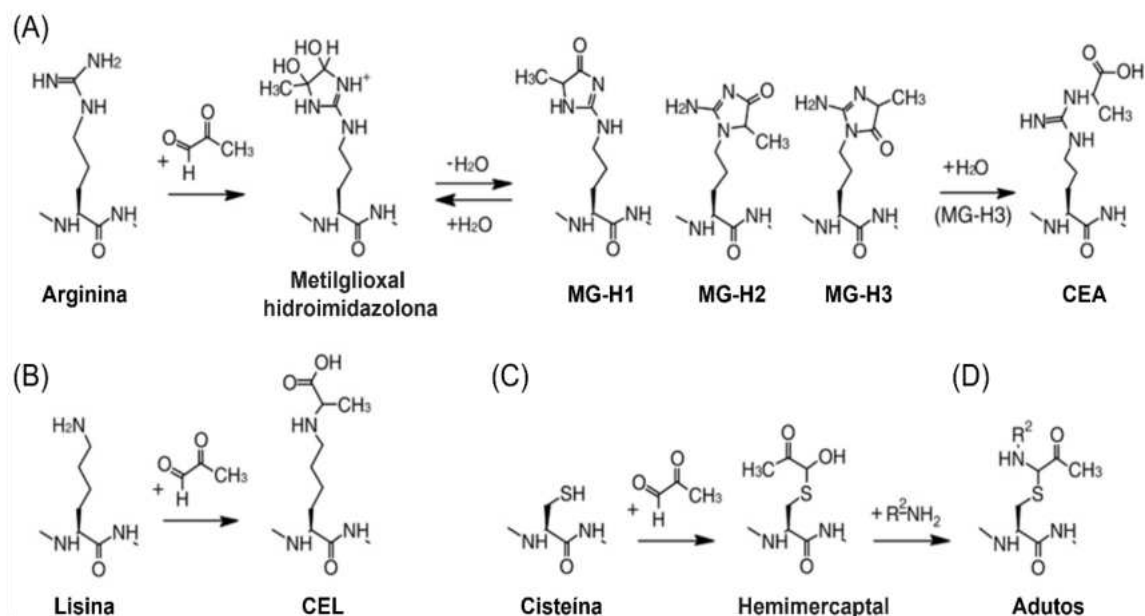


Figura 6. Danos em cadeias laterais de resíduos de proteínas ocasionados pelo MGO. (A) Reação do MGO com resíduo de arginina formando o intermediário metilgloxal hidroimidazolona, que se desenvolve para os três isômeros MG-H1, MG-H2 e MG-H3, sendo o MG-H3 sofrendo hidrólise e formando o N⁷-carboxietil arginina (CEA). (B) Reação do MGO com resíduo de lisina formando o N-ε-(carboxietil)lisina. (C) Reação do MGO com resíduo de cisteína levando a formação do hemimercaptal, que pode formar adutos inter e intramoleculares ao reagir com grupo amino de outras moléculas (D). Adaptado de Polykretis et al., Redox Biol., 2020 (POLYKRETIS et al., 2020)

Sirangelo e colaboradores foram capazes de demonstrar que a SOD1 sofre glicação mediada por MGO *in vitro*, induzindo o desenovelamento e perda da estrutura secundária da proteína, podendo levar ao processo de agregação da proteína (SIRANGELO et al., 2016). Além disso, estudo realizado por Trist e colaboradores, utilizando tecido *post-mortem* de pacientes com ELA^f demonstrou níveis de AGEs aumentados nos resíduos de Lys122 e Lys128 do *loop* eletrostático da SOD1 mutante isolada da medula espinhal ventral, onde a alteração de carga líquida desses resíduos afetados por MTPs pode prejudicar o endereçamento do radical superóxido no sítio ativo da SOD1 e alterar as ligações estabilizadoras entre

o *loop* eletrostático e ligação dissulfeto, promovendo desenovelamento e agregação da proteína (TRIST et al., 2022b).

Um estudo recente realizado por Monteiro Neto e colaboradores demonstrou um aumento de aglomerados de SOD1 humana selvagem em *Saccharomyces cerevisiae*, contendo deleção no gene que expressa a GLO1 e submetida a um processo de envelhecimento, correlacionando assim a perturbação na via das glioxalases e o desenvolvimento da patologia de ELAe (MONTEIRO NETO et al., 2023).

1.4. Tratamentos para ELA

A ELA é uma doença ainda sem cura, sendo necessária a busca de tratamentos que aumentem a expectativa e qualidade de vida dos pacientes. Atualmente, não há tratamento eficaz disponível para pacientes com ELA, apenas medicamentos paliativos que aumentam a sobrevida dos pacientes, retardando o desenvolvimento dos sintomas (SHOESMITH, 2023). Dentre os medicamentos já aprovados pela *FDA (food and drug administration)*, o Riluzol, o Edaravone e o Tofersen são os mais conhecidos para o tratamento da ELA (JAISWAL, 2019; EVERETT; BUCELLI, 2024).

O Riluzol atua inibindo a liberação do glutamato cuja liberação excessiva em neurônios ou em células gliais causa danos e morte celular. Esse medicamento atua prolongando a sobrevivência do paciente com ELA em cerca de três meses, mas não apresentando uma melhora na sua qualidade de vida (ELMANSY et al, 2023). O Edaravone atua como um eliminador de radicais livres reduzindo o estresse oxidativo nos neurônios motores, protegendo de danos adicionais, apresentando um efeito retardante da progressão da doença em estágios iniciais (YOSHINO, 2019). O Tofersen atua reduzindo a produção de SOD1 a partir de um oligonucleotídeo antisense, impedindo a tradução da proteína, sendo um medicamento indicado para casos de ELAf, ligados a mutações na SOD1 (EVERETT; BUCELLI, 2024; MILLER et al., 2022).

No entanto, junto com os efeitos benéficos para o prolongamento da sobrevida dos pacientes, os tratamentos presentes no mercado até o momento apresentam desvantagens que variam desde seus efeitos adversos relatados em

ensaios clínicos até o alto custo para manter o tratamento durante todo o curso da doença, além da baixa eficiência no prolongamento da sobrevivência (MILLER et al., 2022; GENGE et al., 2023). Portanto, a busca por um tratamento robusto e com maior eficácia para casos de ELA se mostra de suma importância.

1.4.1. Trealose

A trealose é um dissacarídeo natural não redutor contendo duas frações de glicose ligadas por uma ligação α -1,1-glicosídica (**figura 7**), apresentando fortes propriedades hidrofílicas e resistência a condições ácidas, sendo amplamente distribuída na natureza e encontrada em várias espécies de plantas, algas, fungos, leveduras, bactérias e insetos (ZHANG; DEBOSCH, 2019). A capacidade de interação com grupamentos polares das proteínas confere à trealose fortes propriedades protetoras, apresentando a habilidade de estabilizar a estrutura de proteínas e membranas celulares durante condições extremas, atuar na síntese da parede celular de bactérias, funcionar como fonte de energia para o voo em insetos, regular o metabolismo em fungos e plantas, bem como atuar como fonte de energia em situações de estresse (PUPYSHEV et al., 2022; RIBEIRO et al., 2024).

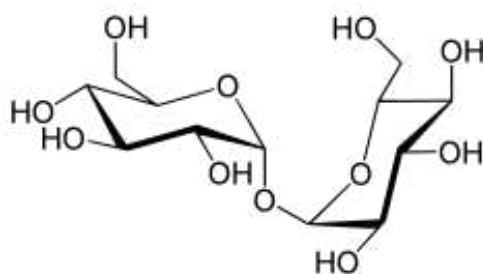


Figura 7. Estrutura da trealose (PUPYSHEV et al, 2022).

Em relação com doenças neurodegenerativas, foi demonstrado que a trealose pode atuar estabilizando a proteína Huntingtina parcialmente mal enovelada e inibir a agregação do peptídeo β -amiloide em modelos celulares da doença de Huntington e de Alzheimer, respectivamente (LEE et al., 2018; SEVRIEV et al, 2024). Além disso, estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que a trealose é capaz de proteger biomoléculas durante condições adversas, como o estresse oxidativo

(RIBEIRO et al., 2024), tendo essa uma forte relação com o desenvolvimento de patologia de ELA.

Estudo realizado por Magalhães e colaboradores, utilizando modelo de levedura *Saccharomyces cerevisiae* expressando SOD1 selvagem e mutante A4V demonstrou que a trealose é capaz de proteger a célula contra a proteopatia da SOD1, em condições de estresse oxidativo, diminuindo inclusões e marcadores de estresse, e aumentando a atividade de SOD1 e a viabilidade da levedura, revelando um caminho positivo para utilização da trealose como uma forma de tratamento para casos de ELAe e ELAf ligados à SOD1 (MAGALHÃES et al., 2024).

2. Objetivo

Avaliar o efeito do metilgloxal na glicação, na formação de agregados e danos à função antioxidante de SOD1 humana selvagem e mutante A4V, e verificar a ação da trealose como possível forma de proteção.

3. Materiais e métodos

3.1. Transformação de bactéria

A cepa de *Escherichia Coli* BL21(DE3) foi transformada com os plasmídeos de interesse pET-15b expressando a hSOD1 WT ou hSOD1 A4V (**figura 8**).

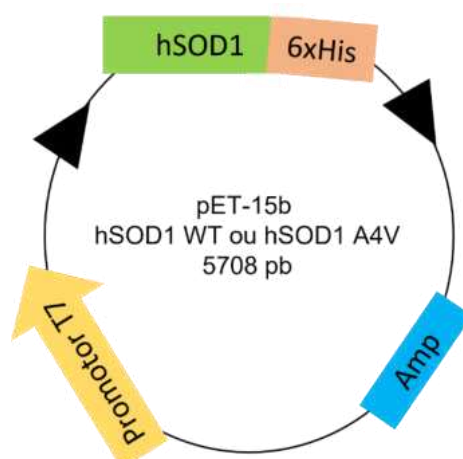


Figura 8. Esquema resumido do plasmídeo pET-15b expressando hSOD1WT ou hSOD1A4V, apresentando um promotor T7 que conduz a transcrição da proteína recombinante em resposta à indução por IPTG, a sequência da proteína de interesse fusionada a uma sequência de seis histidinas ligadas à SOD1, importante para a etapa de purificação por afinidade, e uma região contendo gene que confere resistência à ampicilina.

A transformação foi realizada pelo método de choque térmico. A partir de 100 μ L de suspensão celular, de um estoque retirado do freezer -80°C , foram adicionados 2 μ L do plasmídeo e deixado 30 minutos em gelo. Posteriormente, as células foram incubadas por 30 segundos a 42°C e colocadas durante 2 minutos em gelo e, em seguida, foram adicionados 900 μ L de meio SOC (10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 2% triptona, 0,5% extrato de levedo e 20 mM glicose). A suspensão foi incubada por 1 hora a $37^{\circ}\text{C}/200$ rpm e centrifugada em uma microcentrífuga por 1 minuto a 13000 rpm. O *pellet* foi ressuspendido em 100 μ L de água destilada e plaqueado em meio sólido *Luria-Bertani-Broth* (LB) contendo 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina para seleção das células transformadas.

Após a seleção das colônias, foi realizado um teste de expressão onde uma colônia foi inoculada em 5 mL de meio LB durante 5 horas e, em seguida, foi realizada a indução da expressão da proteína utilizando 1 mM isopropil- β -D-1-

tiogalato piranósido (IPTG) durante 4 horas. Para verificar a indução foi retirada uma alíquota de 1 mL no tempo inicial (0h) e final (4h), centrifugado a 15000 xg por 5 minutos e o pellet ressuspendido em 20 µL de água destilada e 10 µL tampão de lise (125 mM de tampão Tris-HCl 1 M pH: 6,8, 4% de SDS, 0,5% de azul de bromofenol, 4 mM de EDTA, 20% de glicerol e 10% de β-mercaptoetanol). Foi realizado um fracionamento por SDS-PAGE (15% poliacrilamida) e comparados os pontos de retirada do início (0h) e o término da indução (4h) corando o gel com azul de coomassie (0,1% m/v de azul de coomassie, 45% v/v de metanol, 5% v/v de ácido acético glacial) (MONTEIRO NETO et al., 2023).

3.2. Purificação de SOD1 recombinante

As células transformadas foram cultivadas overnight a 37 °C e 180 rpm em 10 mL de meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina. A cultura de 10 mL foi usada para inocular 1L de meio LB com 100 µg/mL de ampicilina e as células foram cultivadas a 37°C e 180 rpm até OD₆₀₀ = 0,6 – 0,7. A expressão da proteína foi induzida com 1 mM de IPTG e a cultura suplementada com 1500 µM CuSO₄ e 60 µM ZnSO₄ por 4 h a 37 °C e 180 rpm. As células foram então coletadas por centrifugação (5000 xg, 5 min) e o pellet armazenado para posterior purificação.

O *pellet* foi ressuspendido em 25 mL de tampão de lise (50 mM fosfato de sódio monobásico, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8,0) contendo 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfanila (PMSF) e lisado por um equipamento de ultrassom (UNIQUE) configurado para 1 min ON, 1 min OFF, a 60% de amplitude por 10 ciclos em banho de gelo. O lisado celular foi limpo por centrifugação (13000 xg, 20 min) e incubado 20 mL do sobrenadante com 2 mL de resina de níquel Ni-NTA agarose (QUIAGEN – Alemanha) durante 1 hora a 4°C, em agitação. Em seguida, a suspensão foi transferida para uma coluna e realizada duas lavagens com tampão de limpeza (50 mM fosfato de sódio monobásico, 300 mM NaCl, 30 mM imidazol, pH 8,0) e realizada a eluição da proteína com tampão de eluição (50 mM fosfato de sódio monobásico, 300 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH 8,0). As frações coletadas foram analisadas por SDS-PAGE (15% acrilamida), aplicando uma alíquota de 20 µL de cada eluição no gel, corando o gel com azul de coomassie, e as frações que continham SOD1 foram unidas e dialisadas contra tampão PBS pH 7,4 durante 24 horas utilizando uma membrana de celulose de 25 mm (MERCK). A concentração

de proteína foi determinada a 280 nm usando $11000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ como o coeficiente de extinção molar do dímero SOD1WT (MONTEIRO NETO et al., 2023).

3.3. Cinética de agregação *in vitro* da SOD1

Dímeros de SOD1WT e SOD1A4V a uma concentração de 60 μM foram incubados em tampão PBS pH 7,4 na presença e ausência de 5 mM e 10 mM de MGO e trealose 10% (m/v), em microplacas de 96 poços a 37°C e 400 rpm num equipamento Thermomixer (Eppendorf). Adicionou-se à mistura reacional 5 μM de Tioflavina-T (ThT), uma sonda fluorescente para detecção de fibras amiloides, sendo esta monitorada em função do tempo via excitação a 446 nm e emissão 485 nm (MONTEIRO NETO et al., 2023).

Após a agregação, foi realizada uma diálise contra tampão PBS pH 7,4 para a retirada do MGO e da trealose adicionados durante o processo.

3.4. Nível de agregados de SOD1

Amostras de proteína após a cinética de agregação foram fracionadas por SDS/PAGE, usando géis de poli-acrilamida a 15%. O gel foi preparado em duas partes, a região de corrida, contendo 2,85 mL de água destilada, 6,25 mL de acrilamida 30%, 3,15 mL de tampão Tris-HCl 2 M pH: 8,85, 125 μL de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 10%, 12,5 μL de TEMED e 125 μL de PSA 10%, e de empilhamento, contendo 1,7 mL de água destilada, 415 μL de acrilamida 30%, 315 μL de tampão Tris-HCl 1 M pH: 6,8; 25 μL de SDS, 2,5 μL de TEMED e 25 μL de PSA 10%.

No gel foram aplicados volumes equivalentes à 10 μM de proteína com 10 μL de tampão de amostra desnaturante (125 mM de tampão Tris-HCl 1 M pH: 6,8, 4% de SDS, 0,5% de azul de bromofenol, 4 mM de EDTA, 20% de glicerol e 10% de β -mercaptoetanol). As amostras foram fervidas durante 10 minutos e aplicadas no gel que operou em uma voltagem fixa de 135V durante duas horas.

A proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Protran Premium 0,45 μm – GE healthcare) durante duas horas em uma corrente fixa 0,35^a, em gelo. As membranas foram incubadas durante a noite

em solução de bloqueio (BSA 3% em PBS-TWEEN) à temperatura ambiente, depois incubadas com anticorpo primário anti-SOD1 em coelho 1:2000 (SIGMA) por 1 h. As membranas foram lavadas três vezes com PBS-TWEEN para remover o anticorpo primário e depois incubadas por 1h, com anticorpos secundários anticoelho 1:10000 conjugados com peroxidase de raiz-forte a 1:6000 (SIGMA). Para detecção das bandas, a membrana foi tratada com reagente luminol e kit de solução de peróxido (western blotting ECL-Promega) e então escaneada no sistema de imagem Fusion Solo 6S (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallee, França). A intensidade dos pixels da banda foi quantificada usando o software Fiji ImageJ.

A membrana foi lavada com uma solução de limpeza (200 mM de glicina, TWEEN 20%, SDS 0,1%, pH: 2,2) para retirada do anticorpo utilizado anteriormente. Em seguida, foi realizado novamente o bloqueio com solução de bloqueio à temperatura ambiente, depois incubado com anticorpo primário anti-MGO em rato 1:1000 (SIGMA) por 1h. As membranas foram lavadas três vezes para remover o anticorpo primário e depois incubadas por 1h, com anticorpos secundários anti-rato 1:10000 conjugados com peroxidase de raiz-forte a 1:6000 (SIGMA). Para detecção da banda foi realizado o mesmo processo anterior.

3.5. Nível de SOD1 por dot blot

A marcação por dot blot é realizada sem a necessidade do fracionamento das proteínas em gel de poliacrilamida. Basicamente, 100 µL de amostra contendo 10 µM de proteína em água foram aplicados em um sistema de sucção contendo uma membrana de nitrocelulose (Amersham Protran Premium 0,45 µm – GE healthcare) que realiza a retenção das proteínas. Após o processo, as membranas foram incubadas durante a noite em solução de bloqueio (BSA 3% em PBS-TWEEN) à temperatura ambiente, depois incubado com anticorpo primário anti-SOD1 de coelho 1:2000 (SIGMA) por 1h. As membranas foram lavadas três vezes para remover o anticorpo primário e depois incubadas por 1h, com anticorpos secundários anticoelho 1:10000 conjugados com peroxidase de raiz-forte a 1:6000 (SIGMA). Para detecção das bandas, a membrana foi tratada com reagente luminol e kit de solução de peróxido (western blotting ECL-Promega) e então escaneados

no sistema de imagem Fusion Solo 6S (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallee, França). A intensidade da banda foi quantificada usando o software Fiji ImageJ.

3.6. Cromatografia de exclusão por tamanho

A cromatografia de exclusão por tamanho foi operada em uma AKTA purifier (GE – Healthcare) utilizando uma coluna superdex 200 increase 10/300 GL (30 cm × 10 mm, 8.6 µm, tamanho de partícula – Cytiva). Foram aplicados 150 µL de proteína, após a cinética de agregação, e o processo operou de modo isocrático, em um fluxo de 0.5 mL/min utilizando como fase móvel um tampão Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM com pH 8,5, sendo a eluição monitorada por uma lâmpada de UV com comprimento de onda de 280 nm.

3.7. Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

A análise foi performada utilizando um equipamento DynaPro NanoStar (Wyatt Technology) com um laser em $\lambda = 658$ nm e intensidade de 100 mW. Foram realizadas 10 aquisições de leitura a uma temperatura de 25°C. Foram utilizadas amostras pós ensaio de cinética de agregação dialisadas em tampão PBS pH 7,5.

3.8. Atividade de SOD1 *in situ* (zimograma)

Amostras de proteína após a cinética de agregação foram fracionadas usando géis nativos de poliacrilamida a 15%, não desnaturantes. O gel foi preparado em duas partes, a região de corrida, contendo 6,6 mL de água destilada, 3 mL de acrilamida 30%, 2,25 mL de tampão Tris-HCl 2 M pH 8,9, 12 µL tetrametiletilenodiamina (TEMED) e 40 µL de Persulfato de Amônia (PSA) 10%, e empilhamento, contendo 2,92 mL de água destilada, 543 µL de acrilamida 30%, 500 µL de tampão Tris-HCl 1 M pH 6,8, 4 µL de TEMED e 40 µL de PSA 10%.

No gel foram aplicados volumes equivalentes à 10 µM de proteína com 10 µL de tampão de amostra (125 mM Tris-HCl 1 M pH 6,8, 80% glicerol, 0,002% azul

de bromofenol). O gel que operou em uma voltagem fixa de 135 V durante duas horas.

Ao término da corrida, foi realizado o tratamento para revelação da atividade. O gel foi tratado com uma solução de NBT (60 mg de NBT em 30 mL de água destilada) por 20 minutos, seguido de tratamento com solução aquosa de riboflavina e 200 µL de TEMED por 15 minutos. O gel submerso na solução foi exposto a luz até o surgimento das bandas e escaneado no sistema de imagem Fusion Solo 6S (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallee, França) com as bandas sendo quantificadas no software ImageJ (BRASIL et al., 2019).

3.9. Análises estatísticas

Os dados foram analisados usando o software GraphPad Prism 8 e expressos como Média \pm desvio padrão. As diferenças estatísticas foram calculadas usando o one-way ANOVA utilizando a correção de Sidak para comparações múltiplas. Os níveis de significância foram expressos como: *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 e **** P < 0,0001.

4. Resultados

4.1. Transformação da *E.coli* e avaliação da expressão de SOD1

Realizou-se um teste para avaliar o melhor tempo de indução por IPTG que leva a expressão significativa da proteína de interesse. Quando comparados os tempos de 0h e 4h de indução (**figura 9**), foi observado um aumento satisfatório na banda na região entre 15 e 20kDa, onde se espera que a SOD1 se encontre (~16kDa). Assim, optou-se por 4h de indução para a expressão da SOD1 de forma satisfatória.

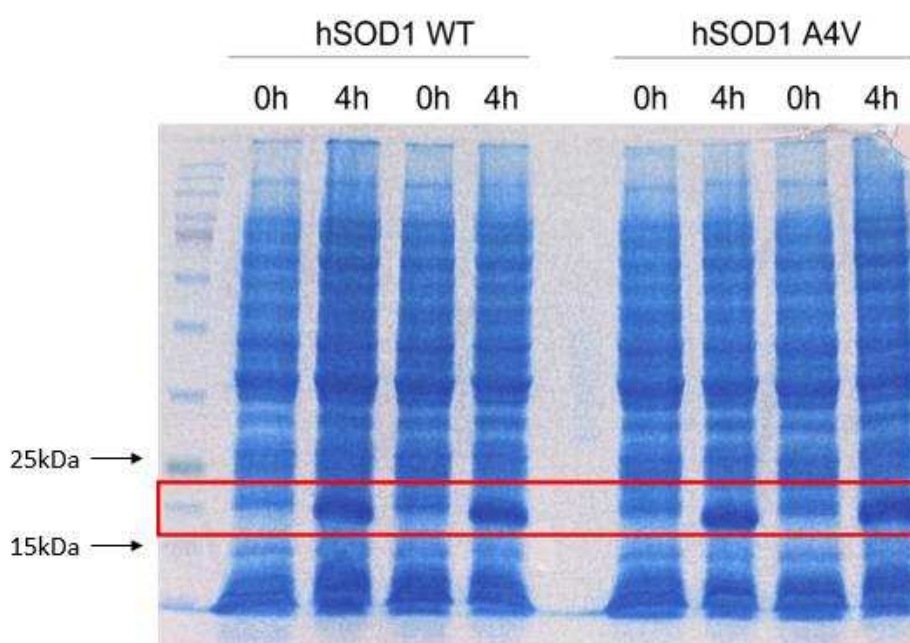


Figura 9. Avaliação de indução temporal da SOD1: Realizado em duplicata biológica, utilizando 1 mM de IPTG durante 0h ou 4h, onde as amostras de lisado foram analisadas em 15% SDS-PAGE. O retângulo vermelho marca a região da altura da SOD1. Primeira linha referente ao marcador de peso molecular.

4.2. Purificação de SOD1 recombinante

A SOD1 recombinante contendo uma cauda de seis histidinas foi purificada por cromatografia de afinidade utilizando a resina de níquel Ni-NTA agarose. O anel imidazol, presente na cadeia lateral da histidina, confere uma alta afinidade da proteína por íon Ni^{2+} . Após a lavagem da coluna com uma concentração de imidazol a 30 mM, retirando contaminantes, a SOD1 foi eluída com 500 mM de imidazol, sendo encontrada majoritariamente nas três primeiras frações de 2 mL durante a

eluição (**figura 10**). Essas frações foram dialisadas contra tampão PBS pH 7,4 para retirada do imidazol.

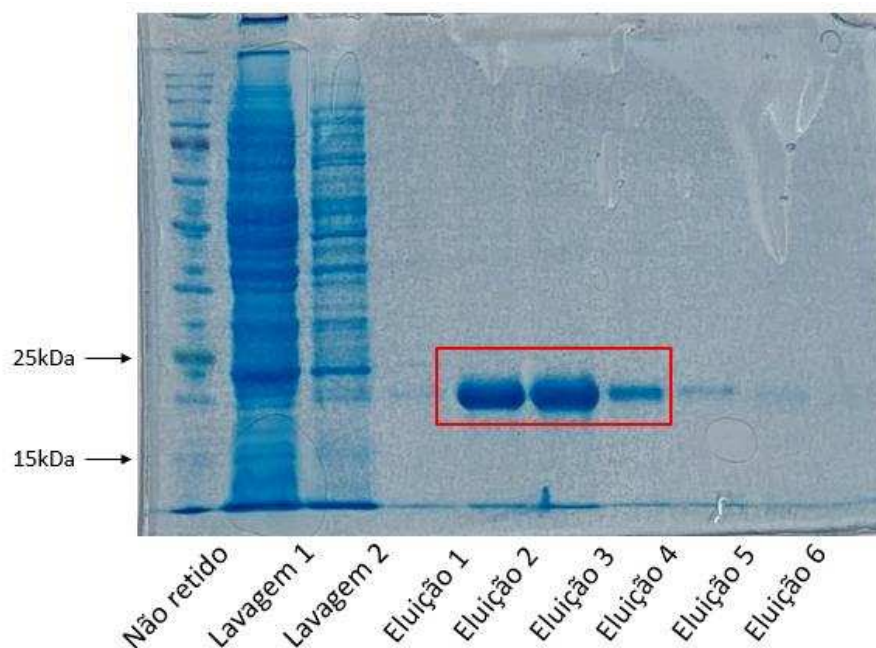


Figura 10. Perfil de purificação por afinidade: Foto representativa do perfil de purificação para a SOD1. Primeira linha referente ao marcador de peso molecular. A linha “não retido” representa todas proteínas que não apresentaram ligação com a resina de níquel e as linhas “lavagem 1” e “lavagem 2” representam proteínas com fraca ligação à resina quando passado o tampão de limpeza contendo 30 mM de imidazol. As eluições realizadas com tampão contendo 500 mM de imidazol, coletadas de 2 em 2 mL, apresentaram maior concentração de proteína nas três primeiras frações. O retângulo vermelho marca as frações unidas e dialisadas.

4.3. Cinética de agregação

Quando acompanhada a cinética de agregação da formação de fibras amilóides da SOD1, foi possível observar que a fluorescência da sonda de ThT, uma sonda específica para a formação dessas estruturas, não apresentou variações de intensidade durante a incubação da proteína, indicando que não houve a formação de agregado fibrilar da SOD1. Todas as amostras, com e sem MGO e trealose, SOD1 WT e SOD1 A4V, não apresentaram aumento na fluorescência, indicando que o agente glicante não causou a formação de fibras amiloides (**figura 11**). Assim, avaliou-se a formação de outros tipos de agregados da SOD1, como oligômeros solúveis ou agregados amorfos.

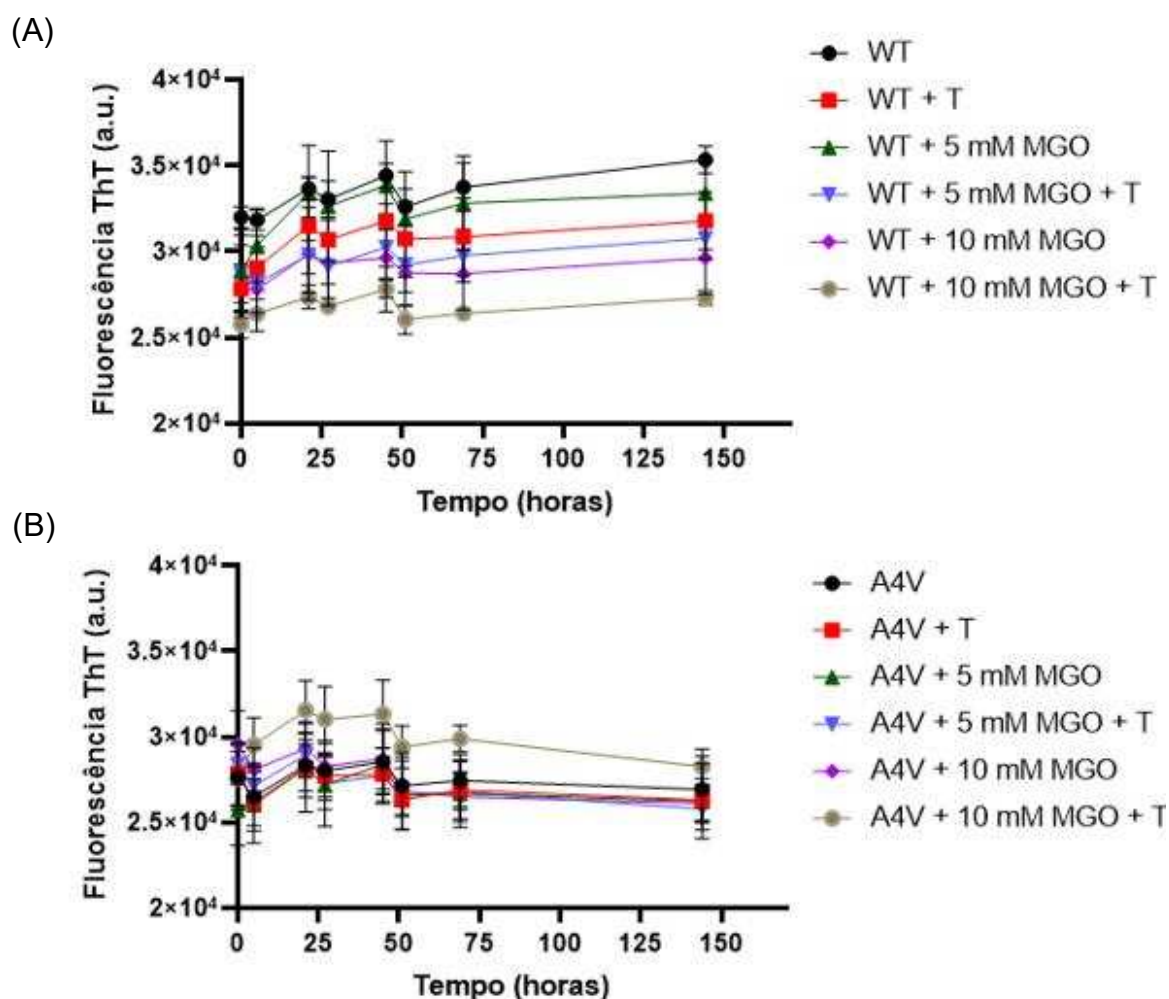


Figura 11. Acompanhamento da formação de fibras amiloides: Gráfico dos níveis de fluorescência da sonda ThT durante o ensaio de agregação, não sendo verificada para nenhuma condição de incubação o aumento da fluorescência, indicando que não houve a formação de fibras amiloides. Figura (A) representando ensaio para a hSOD1WT e figura (B) representando ensaio para a hSOD1A4V.

4.4. Formação de agregados solúveis de SOD1

Analisou-se a formação de agregados da SOD1 em gel 15% SDS-PAGE. Os resultados indicam que a incubação da SOD1 durante 168h foi capaz de induzir a formação de agregados estáveis em condições desnaturantes, identificados por Western-blot utilizando anticorpo anti-SOD1 (**figura 12A**). Essas espécies apresentaram massa molecular próxima de 55kDa, podendo ser associados à formação de trímeros de SOD1, já descritos na literatura como espécies tóxicas do processo de agregação da proteína (HNATH; DOKHOLYAN, 2022).

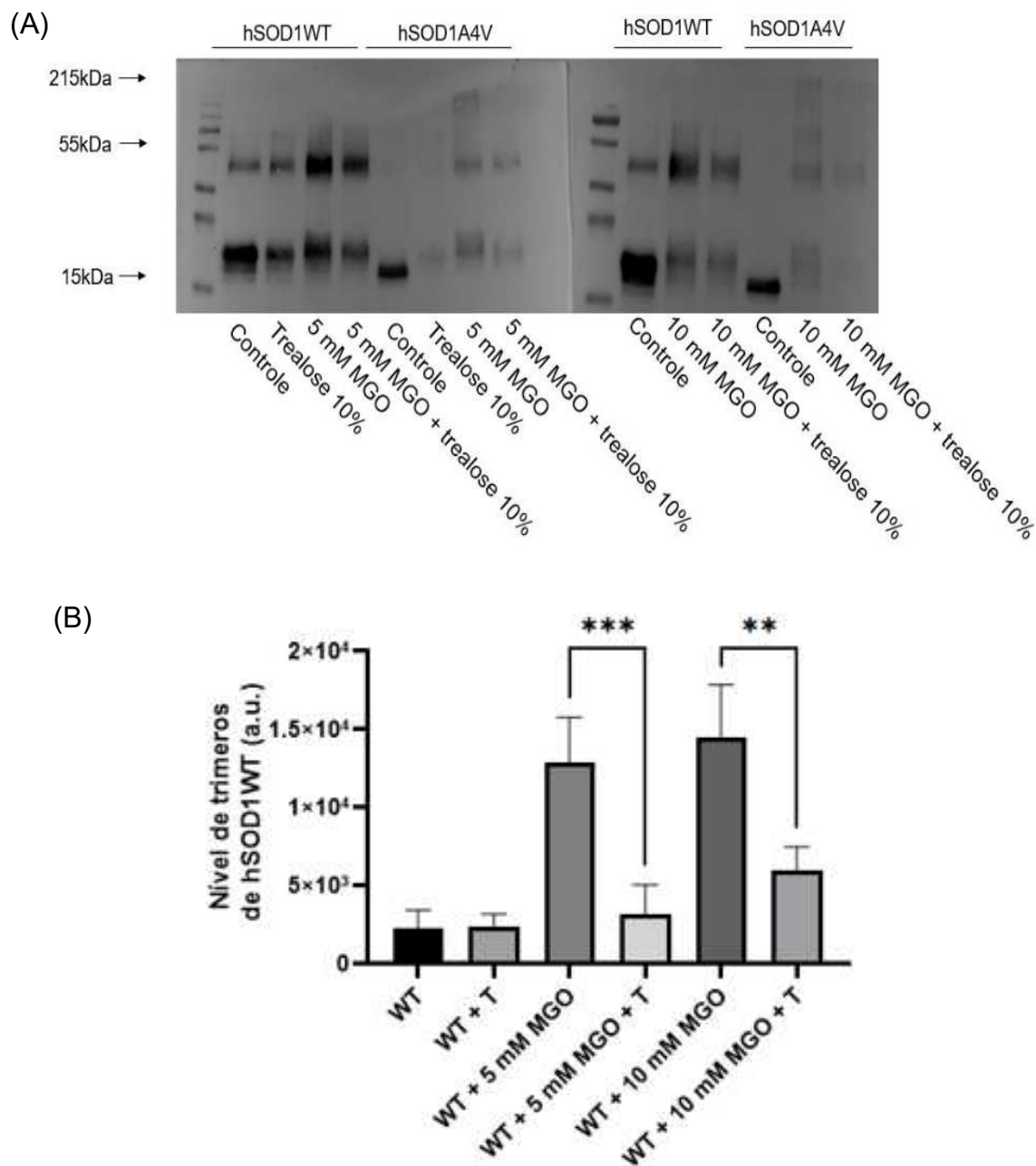


Figura 12. Avaliação da formação de trimeros de SOD1: (A) Aplicação de 10 μ M de proteína em cada poço. Imagem representativa do perfil de fracionamento das amostras após a agregação, realizando marcação com anti-SOD1, evidenciando a formação de trimeros de SOD1 estáveis em condições desnaturantes. Foram realizados três fracionamentos independentes. (B) Nível de trimeros de SOD1 formados após a cinética de agregação, observados por SDS-PAGE. Os níveis foram obtidos pelas quantificações das bandas no software ImageJ. Os valores foram expressos como Média \pm desvio padrão. As diferenças estatísticas foram calculadas usando o one-way ANOVA com correção de Sidak para comparações múltiplas, com significância de **** $P < 0,0001$

É possível observar que há a formação dos trímeros de SOD1WT na amostra controle (sem aditivos), mostrando que a proteína selvagem já apresenta a propensão à agregação sem a presença do MGO. Na presença do tratamento com trealose sem MGO, não foi possível observar diminuição dos níveis de trímeros quando comparado com o controle sem MGO e sem trealose.

Nas amostras tratadas com o agente glicante, é possível observar que o MGO intensificou significativamente a formação de trímeros, apresentando níveis próximos nas condições de 5 mM e 10 mM de MGO. Em comparação com essas condições, a utilização da trealose se mostrou significativa para a diminuição da formação dos trímeros de SOD1WT, retornando para valores próximos da condição controle (**figura 12B**).

A SOD1A4V apresentou uma baixa revelação contra anticorpo anti-SOD1. A princípio, a SOD1A4V não apresentou a formação de trímeros para a condição controle e nem para o tratamento com trealose. Foi possível verificar também a formação de trímeros para a SOD1A4V nos tratamentos com MGO, mas com revelação menos intensa no Western-blot. Além disso, verificou-se a formação de arraste desde a parte superior do gel para a amostra da A4V, indicando que o processo de agregação da A4V pode levar a formação de agregados com alta massa molecular, superior a 215 kDa.

Portanto, os dados obtidos não foram conclusivos no caso da A4V, de modo que as condições de tratamento não apresentaram diferenças significativas para inferir qualquer efeito da trealose durante a agregação da mutante.

4.5. Nível de dano de glicação durante incubação

Para entender melhor como o tratamento com trealose leva a uma diminuição na concentração de trímeros de SOD1WT induzidos pelo MGO, realizou-se um Western-blot com anticorpo anti-MGO, específico para identificar danos provenientes do agente glicante (**figura 13A**).

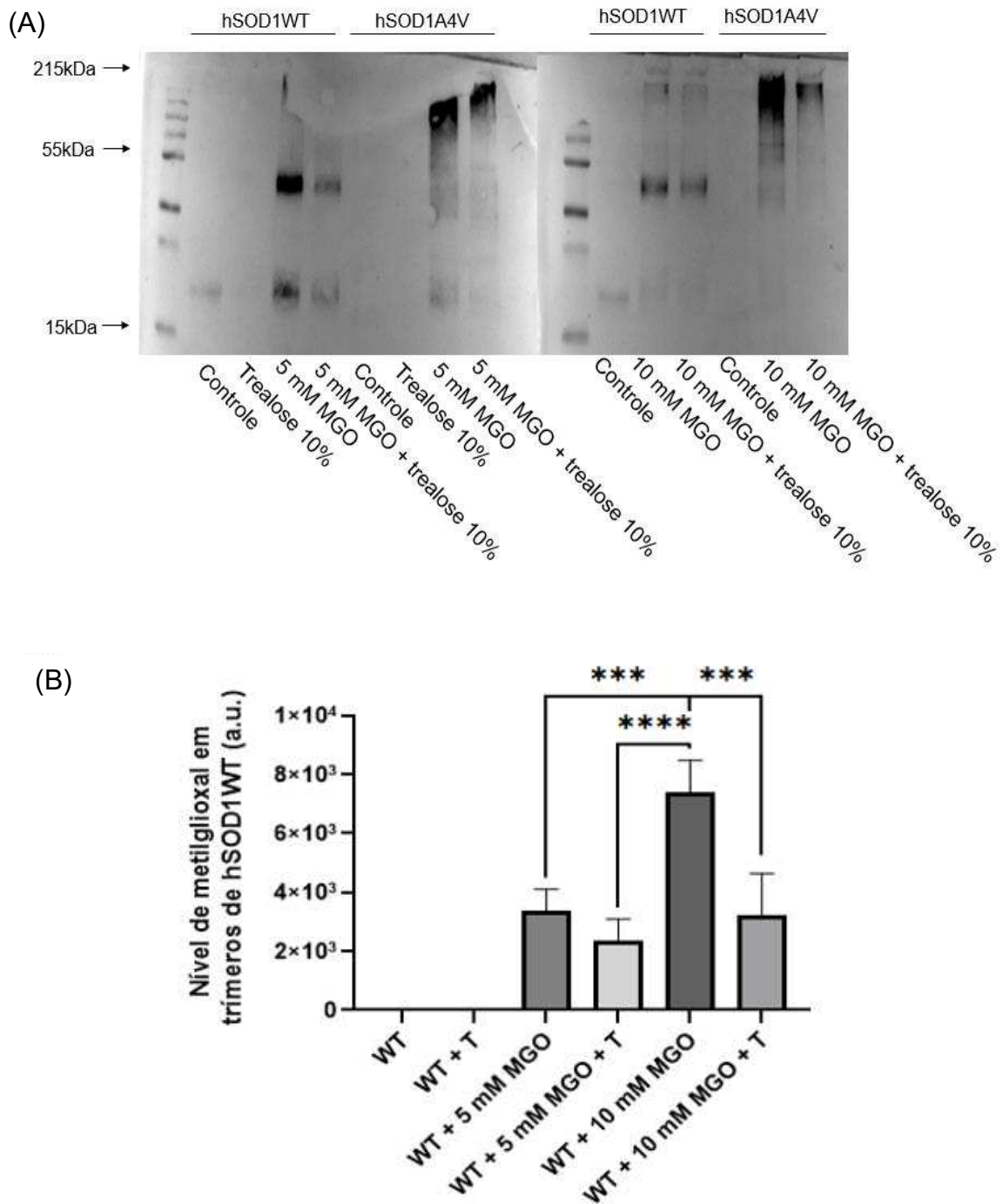


Figura 13. Danos mediados por metilglioxal em trimeros de SOD1 (A) Aplicação de 10 μ M de proteína em cada poço Imagem representativa do perfil de marcação de danos mediados por MGO nas amostras após a agregação. Foram realizados três fracionamentos independentes. (B) Nível de dano de MGO em trimeros de SOD1 formados após a cinética de agregação, observados por SDS-PAGE. Os níveis foram obtidos pelas quantificações das bandas no software ImageJ. Os valores foram expressos como Média \pm desvio padrão. As diferenças estatísticas foram calculadas usando o one-way ANOVA com correção de Sidak para comparações múltiplas, com significância de *** P < 0,001 e **** P < 0,0001.

Após as quantificações, foi possível observar que, à medida que aumentamos a concentração de MGO no tratamento das amostras, há um aumento de glicação na posição correspondente aos trímeros. Foi possível verificar que a trealose atuou diminuindo a formação das espécies induzidas por MGO, sendo mais significativo o efeito no tratamento com 10 mM de MGO (**figura 13B**). Portanto, a queda dos níveis de danos mediados pelo MGO, junto à queda dos níveis de trímeros de SOD1WT formados, durante o tratamento com trealose, evidenciam a capacidade da trealose de proteger a SOD1WT dos efeitos do MGO, o qual causa um aumento na formação de agregados da proteína.

É interessante observar na figura 13B que, na marcação com anti-MGO, as amostras de SOD1A4V não apresentaram banda na região de trímeros, apenas uma forte marcação na parte superior do gel, assim como discutido para os níveis de SOD1A4V. Esse resultado possibilitou correlacionar a baixa intensidade de marcação das amostras da A4V, quando utilizado o anti-SOD1, com o tratamento com o MGO, mostrando que o mesmo pode induzir na mutante a formação de agregados de maior massa molecular comparando com a proteína selvagem. Portanto, se torna inviável a realização da quantificação de níveis de MGO nos agregados da mutante visto as dificuldades encontradas durante a análise das amostras no gel.

4.6. Nível de SOD1 mutante por dot-blot

Devido à dificuldade de identificação das bancas no SDS-PAGE para a A4V, foi realizada uma análise por dot-blot utilizando o anticorpo anti-SOD1. De forma comparativa com os resultados obtidos para a A4V anteriormente, foi possível observar que a marcação obtida a partir do dot-blot são superiores, mostrando um indicativo da formação de espécies de alta massa molecular durante a agregação da SOD1 e que não foram capazes de permear o gel, dificultando a quantificação (**figura 14**).

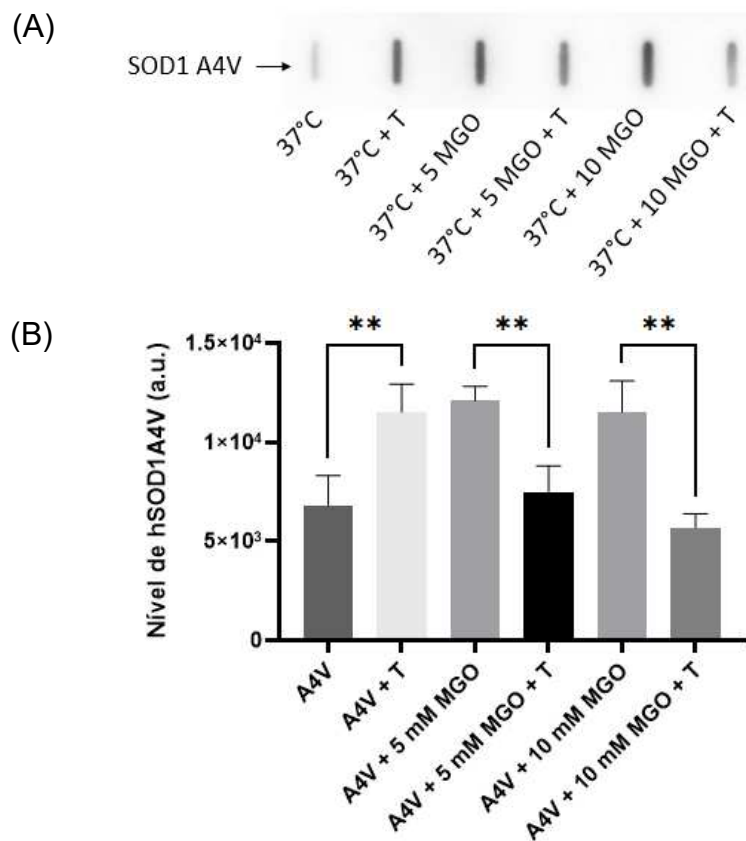


Figura 14. Avaliação dos níveis de SOD1A4V por dot blot: (A) Imagem representativa do dot blot. (B) Comparação entre os níveis de SOD1 obtidos a partir das técnicas de dot blot para as amostras da A4V após a cinética de agregação. Os níveis foram obtidos pelas quantificações das bandas no software ImageJ. As diferenças estatísticas foram calculadas usando o one-way ANOVA com correção de Sidak para comparações múltiplas, com significância de $**P < 0,01$. Análise realizada três vezes.

4.7. Cromatografia de exclusão por tamanho (SEC-HPLC)

Utilizou-se o método de cromatografia de exclusão por tamanho (SEC-HPLC) na análise das espécies formadas durante a cinética de agregação da SOD1A4V, principalmente daquelas com alta massa molecular. Foi possível verificar no perfil do cromatograma a existência de três picos de proteínas eluindo em 7,5 mL, 15 mL e 18,5 mL (**figura 15**).

Estudo realizado em *Saccharomyces cerevisiae*, com indução de condições de estresse oxidativo, foi capaz de mostrar a formação de agregados de alta massa molecular da SOD1 (com ~300 kDa), identificados por cromatografia de exclusão por tamanho, onde essas espécies eluíram em torno de 5 mL da fase móvel (MARTINS; ENGLISH, 2014). A presença de uma população eluindo em torno de

7,5 mL pode ser correlacionada com possíveis espécies de alta massa molecular, sendo interessante avaliar o efeito da trealose nessa região para a A4V.

É possível observar uma maior intensidade dos picos de eluição para os tratamentos com 5 e 10 mM de MGO no volume de eluição de 7,5 mL no cromatograma, podendo estar correlacionados a um aumento na formação de espécies com alta massa molecular. Além disso, a trealose mostrou-se eficaz para a diminuição dos picos nessa mesma região de eluição de 7,5 mL em comparação com as condições sem tratamento com trealose, indicando sua capacidade em diminuir a formação de espécies de alta massa molecular para a mutante.

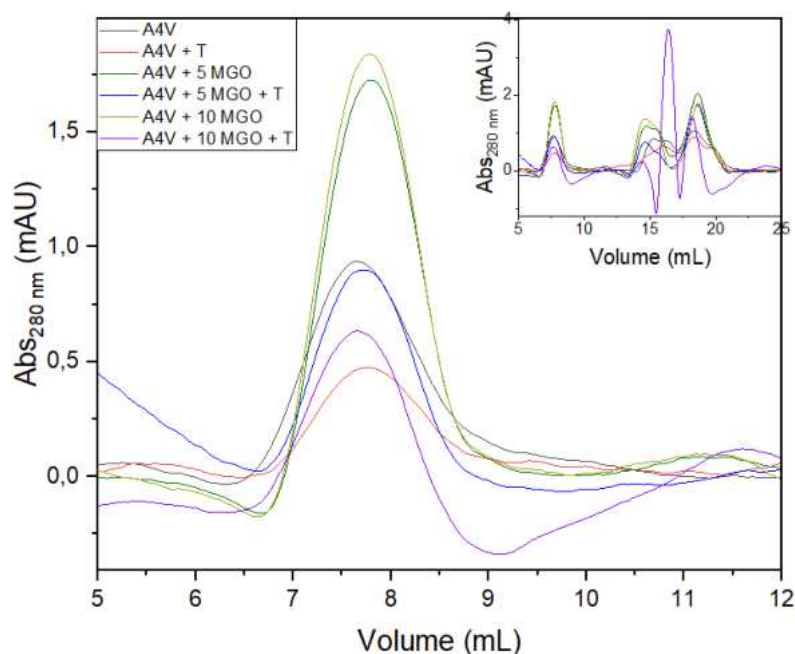


Figura 15. Cromatografia de exclusão por tamanho realizada para hSOD1A4V: Perfil do cromatograma da cromatografia de exclusão por tamanho realizada para as amostras de SOD1A4V. A variação da intensidade das bandas é proporcional à variação das formações de espécies de alta massa molecular associadas ao volume de eluição próximo de 7,5 mL.

4.8. Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

Para avaliar a distribuição de tamanhos (raios hidrodinâmicos) das espécies provenientes da cinética de agregação, utilizou-se a técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS).

A **tabela 1** mostra as diferentes populações encontradas para a SOD1WT submetida a diferentes tratamentos. É possível observar que a agregação da

proteína sem trealose resulta na formação de uma maior quantidade de espécies com diferentes raios em solução, mostrando uma maior polidispersão da amostra. No entanto, na presença da trealose ocorre uma mudança no perfil de espécies observadas, indicando que a trealose promove uma diminuição da polidispersão das diferentes espécies de SOD1. Além disso, também é possível identificar uma diminuição do raio hidrodinâmico das espécies presentes em solução na presença da trealose.

Tabela 1. Dados do espalhamento de luz dinâmico (DLS) das amostras após a cinética de agregação. “%intensidade” indica a intensidade da luz é espalhada a partir da espécie encontrada e “%Pd” é relacionado à distribuição normal para cada espécie, obtida a partir das 10 aquisições totais realizadas durante o experimento.

Amostra	Raio (nm)	%Intensidade	%Pd
WT			
	1.3	0.9	0.7
	4.7	4.4	2.2
	34.5	58.2	4.6
	123.7	36.5	4.2
	3300	4.2	2.7
WT + T			
	2.1	6.6	1.7
	72.8	93.4	4.6
WT + 5 mM MGO			
	3	5.7	1.6
	43	33.9	3.5
	117.7	53	4.0
	4155.5	7.5	4.5
WT + 5 mM MGO + T			
	84.2	100	3.3
WT + 10 mM MGO			
	2.7	4	4.3
	74.1	85.9	4.1
	1674.3	10.1	4.6
WT + 10 mM MGO + T			
	104.9	100	4.2

Analisando os resultados de DLS para a mutante A4V (**tabela 2**), é possível verificar que ocorre o mesmo perfil observado para a SOD1WT, isto é, uma maior polidispersão sem o tratamento com trealose e uma tendência de formação de espécies mais homogêneas na agregação da proteína na presença da trealose. Juntamente, uma diminuição do raio hidrodinâmico das espécies presentes em solução na presença da trealose.

Tabela 2. Dados do espalhamento de luz dinâmico (DLS) das amostras após a cinética de agregação. “%intensidade” indica a intensidade da luz é espalhada a partir da espécie encontrada e “%Pd” é relacionado à distribuição normal para cada espécie, obtida a partir das 10 aquisições totais realizadas durante o experimento.

Amostra	Raio (nm)	%Intensidade	%Pd
A4V			
	2.2	5.9	4.3
	44.6	39.7	5.6
	134.7	35.4	5.5
	922.4	10.6	6.9
	7522.8	8.5	13.7
A4V + T			
	5.4	2.4	4.3
	56.3	97.6	4.1
A4V + 5 mM MGO			
	3.8	1.5	4.6
	17.4	14	6.6
	57.2	84.4	9.1
	1594.8	0.2	0.0
A4V + 5 mM MGO + T			
	0.9	0.3	3.9
	9.1	4.8	2.4
	58.1	94.2	2.6
	7029.8	0.7	2.6
A4V + 10 mM MGO			
	0.6	0.1	3.8
	6.7	2.7	4.3
	38.6	44.4	5.7
	75.2	51.5	6.4
	1454.1	1.3	0.0
A4V + 10 mM MGO + T			
	1.4	0.7	0.0
	58.6	99.3	3.6

4.9. Atividade de SOD1

Tendo em vista os problemas verificados para a mutante durante o fracionamento e a metodologia aplicada para quantificação da atividade de SOD1 *in situ*, as quantificações de atividade só foram realizadas para a hSOD1WT.

A atividade da SOD1 foi avaliada para identificar se o processo de agregação induzido pelo MGO afeta a função catalítica de dismutação de radicais superóxido e se a trealose é capaz de reverter o efeito do MGO. Os valores quantificados pela atividade *in situ* foram normalizados pela atividade da condição de agregação controle (**figura 16**).

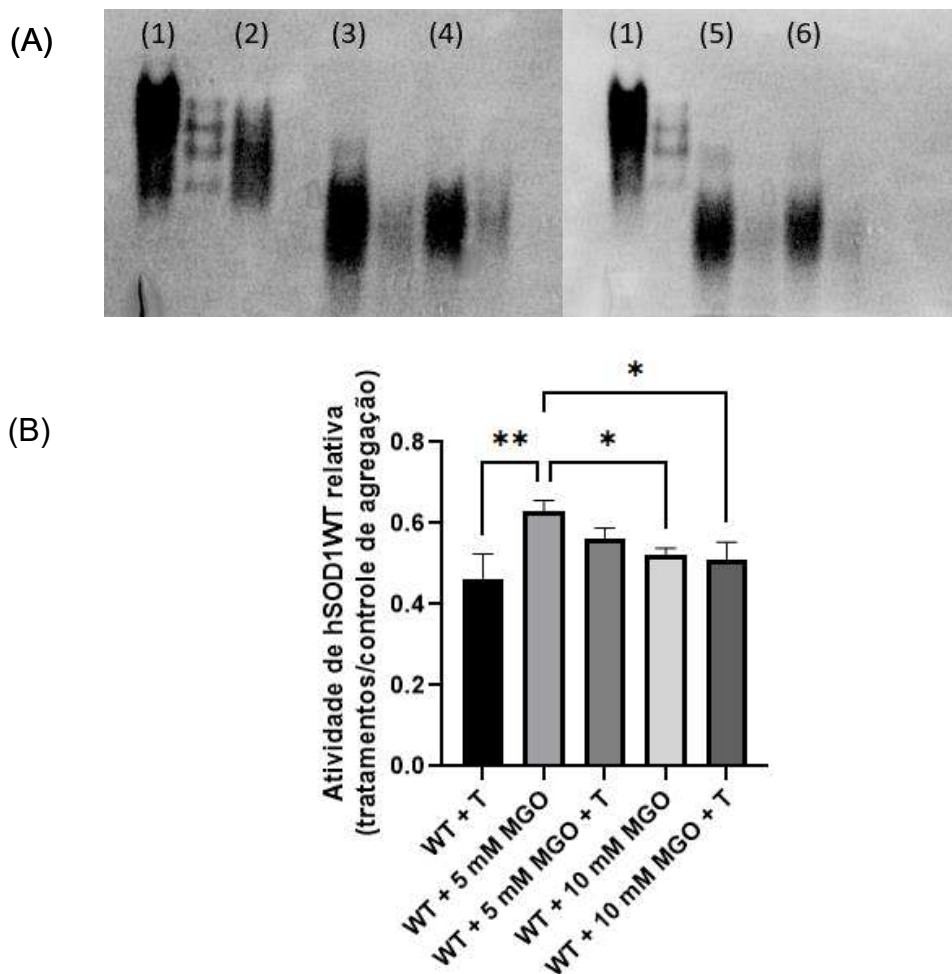


Figura 16. Quantificação da atividade de hSOD1WT (A) Aplicação de 10 μ M de proteína em cada poço. Imagem representativa do perfil do gel de corrida não desnaturante das amostras após a agregação. (1) WT; (2) WT + trealose 10%; (3) WT + 5 mM MGO; (4) WT + 5 mM MGO + trealose 10%; (5) WT + 10 mM MGO; (6) WT + 10 mM MGO + trealose 10%. (B) Quantificação da atividade de SOD1 para as diferentes condições após a cinética de agregação. Os níveis foram obtidos pelas quantificações das bandas de SOD1 em gel nativo utilizando o software ImageJ. Os valores foram expressos como Média \pm desvio padrão. As diferenças estatísticas foram calculadas usando o one-way ANOVA com correção de Sidak para comparações múltiplas, com significância de * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

Foi possível observar que os tratamentos realizados, quando comparado com a situação controle (sem aditivos), levaram a uma diminuição da atividade, sem diferenças significativas entre os tratamentos 5 mM MGO / 5 mM MGO + trealose 10% e 10 mM MGO / 10 mM MGO + trealose 10%.

5. Discussão

A ELA é uma doença caracterizada pelo acúmulo de proteínas mal enoveladas nos neurônios motores, o que leva à formação de agregados tóxicos (HARDIMAN, 2017). A agregação é um resultado da associação entre conformações proteicas não nativas, através de contatos intermoleculares, capaz de promover a formação de diferentes estruturas de agregados, dentre eles oligômeros, agregados amorfos ou agregados amilóides, sendo esses últimos muito encontrados em outros tipos de doenças neurodegenerativas como as doenças de Alzheimer e de Parkinson (DUGGER; DICKSON, 2017). A proteopatia da SOD1 é comum a todas as formas de ELA (esporádica e familiar, ligada ou não a mutações em SOD1), onde a presença de agregados em tecidos de pacientes já foi amplamente identificada e caracterizada (TRIST et al., 2022a).

A glicação é uma MPT que as proteínas podem sofrer e que tem sido associada à formação de agregados de proteínas envolvidas com doenças neurodegenerativas (VICENTE MIRANDA et al., 2017; FARZADFARD et al., 2022). Danos de glicação mediado pelo metilglioxal, um subproduto da via glicolítica, tem sido correlacionado com doenças neurodegenerativas devido a problemas na via de degradação deste composto durante o processo de envelhecimento celular, onde a enzima GLO1, etapa limitante do processo de degradação, sofre uma diminuição da expressão nas células durante o processo de envelhecimento celular (ALLAMAN et al., 2015). Considerando-se a ligação entre o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e o processo de envelhecimento, o metilglioxal poderia estar envolvido na glicação de proteínas presentes nesses tipos de doenças.

A ligação da ELAe, a suscetibilidade genética e o ambiente, pode ser uma forma de entender a relação entre o desenvolvimento da doença de forma esporádica (AJROUD-DRISS; SIDDIQUE, 2015). Além disso, uma hipótese seria a alimentação rica em carboidratos podendo ser um fator de grande risco para SOD1, devido o possível desenvolvimento do intermediário da via glicolítica, metilglioxal, que pode induzir um maior risco da formação de agentes de glicação avançado. Já foi identificado níveis do produto final de glicação avançada elevados nos resíduos do *loop* eletrostática Lys122 e Lys128 na proteína SOD1 isolada da medula

espinhal ventral a partir de amostras *post-mortem* obtidas de regiões mostrando neurodegeneração de pacientes com ELA de casos esporádicos e familiar (TRIST et al., 2022b).

O estudo da trealose como um inibidor da formação de agregados proteicos e sua associação com doenças neurodegenerativas já foi amplamente discutido na literatura, onde tem sido demonstrado que a trealose pode atuar na estabilização da proteína Huntingtina parcialmente mal enovelada e inibição da agregação do peptídeo β -amilóide em modelos celulares das doenças de Huntington e Alzheimer, respectivamente (LEE et al., 2018; SEVRIEV et al, 2024). No entanto, nada ainda foi verificado sobre a atuação da trealose na inibição da formação de agregados formados a partir de processos de glicação das proteínas, podendo ser um caminho de estudo promissor.

No presente trabalho, buscou-se a utilização da SOD1 humana selvagem e mutante para realizar uma alusão a casos de ELAe e ELAf, respectivamente, e entender como os tratamentos com MGO e trealose afetam o processo de agregação dessas proteínas. Um estudo proposto por Siragelo e colaboradores foi capaz de mostrar que a incubação de 5 mM de MGO com SOD1 purificada, contendo ou não os íons de cobre e zinco, em condições fisiológicas e não redutoras, apresenta um significativo aumento na intensidade de fluorescência da sonda de tioflavina-T (ThT), mostrando que nessa condição há um aumento de formação de fibras amilóides de SOD1 (SIRAGELO et al, 2016). Monteiro Neto e colaboradores também mostraram que o processo de incubação com 5 mM de MGO leva a formação de fibras positivas para ThT (MONTEIRO NETO et al., 2023). Além disso, ambos os trabalhos mostraram que, além da formação de estruturas do tipo amilóide, ocorre a formação de estruturas menores, similares a trímeros de SOD1. Curiosamente, no presente trabalho, para todos os tratamentos realizados, com/sem MGO e trealose, com incubação durante 1 semana, as proteínas não apresentaram a formação de fibras amilóides (**figura 11**), indicando um resultado diferente daquele descrito na literatura, sendo necessário buscar entender em que ponto as alterações no tempo de incubação ou as condições propostas resultaram nessa divergência.

Devido ao fato de não ter sido observado fibras amiloides nos nossos ensaios, foi necessário buscar outros tipos de investigações para verificar se os tratamentos estavam produzindo diferentes tipos de agregados. Ao realizar a investigação do perfil em SDS-PAGE, foi possível observar a presença de estruturas oligoméricas da SOD1 estáveis em condições desnaturantes, provavelmente trímeros da proteína devido a sua proximidade do padrão de massa molecular de 55 kDa (**figura 12A**). Estruturas triméricas já foram descritas por Hnath e Dokholyan como sendo espécies tóxicas do processo de agregação, estruturalmente diferentes dos agregados maiores, sendo encontrados em frações solúveis (HNATH; DOKHOLYAN, 2022). Além disso, o aumento da citotoxicidade já foi atribuído à formação dessas espécies, onde observou-se toxicidade em células da medula espinhal de neuroblastoma (ZHU et al, 2018).

A partir dos resultados obtidos, foi possível observar a formação de trímeros de SOD1 em todas condições, com concentrações relativas diferentes dependendo do tipo de tratamento realizado (**figura 12B**). A trealose se mostrou efetiva em proteger contra o processo de agregação da SOD1WT induzida por MGO, diminuindo os níveis de trímeros, com valores próximos da condição controle. Já é amplamente discutido na literatura que a trealose é capaz realizar a proteção da conformação de proteínas contra o mal enovelamento e pode atuar na inibição de agregação (SEVRIEV et al, 2024), no entanto sem resultados que mostrem a capacidade da trealose de proteger proteínas contra danos induzidos por MGO. Logo, o resultado do presente trabalho mostrou que, além das atribuições já discutidas na literatura, a trealose apresenta também a capacidade de proteção contra danos provenientes de agentes externos, como é o caso dos danos de glicação na SOD1WT mediados por MGO.

Os experimentos de DLS (**tabela 1**) indicam uma diminuição da polidispersão nas amostras de SOD1 na presença de trealose, resultado da formação de uma população de partículas mais homogêneas. Além disso, a diminuição do raio hidrodinâmico das partículas na presença da trealose indica uma queda da formação de oligômeros em solução.

Um estudo conduzido por Mercado-Uribe e colaboradores mostrou que, em condições de incubação com 0,01, 0,1 e 1 mM de MGO, ocorre a formação de espécies triméricas de SOD1 apenas para a concentração de 1 mM do agente glicante (MERCADO-URIBE et al, 2020). O uso de 5 e 10 mM de MGO proposto pelo presente trabalho mostrou que o aumento da concentração de MGO intensifica a formação de trímeros, sendo ambas concentrações suficientes para a formação de níveis similares dessas espécies.

Problemas na quantificação dos níveis de agregados e bandas de arraste no perfil em SDS-PAGE para a SOD1A4V (**figura 12A**) sugerem que esta mutante agrega de forma diferente quando comparada a SOD1WT, podendo ocorrer a formação de agregados de alta massa molecular na amostra SOD1A4V que não são capazes de permear o gel.

A correlação entre os tratamentos com MGO e a formação dos agregados observados foi realizada a partir da quantificação de dano de MGO presente nos trímeros e se a trealose é capaz de proteger a proteína contra esses danos. A literatura mostra que o tratamento com MGO é capaz de produzir um aumento dos danos em proteínas concentração-dependente (MERCADO-URIBE et al, 2020), de modo que a proteção contra esse composto pode apresentar benefícios para a estabilidade da proteína. Foi possível verificar no nosso trabalho que o aumento da concentração de MGO causou proporcionalmente danos na SOD1WT, os quais são revertidos pelo tratamento com trealose, principalmente para 10 mM de MGO, onde os efeitos protetores da trealose são mais evidentes.

Problemas nas quantificações em gel SDS-PAGE levaram à uma investigação se o método de fracionamento não estava sendo eficaz para o estudo dos aglomerados da mutante (**figura 14**). A partir da marcação da SOD1 pelo anticorpo anti-SOD1 visualizado no dot-blot, foi possível verificar que a marcação de SOD1A4V se mostrou superior à marcação obtida durante o SDS-PAGE, indicando que durante a agregação houve a formação de agregados de alta massa molecular que não permeiam no gel, o que resulta na dificuldade de quantificá-los. Logo, a comparação do tratamento com a trealose na SOD1 mutante, nas condições de agregação propostas, foi realizada por cromatografia de exclusão por tamanho (**figura 15**).

Estudo realizado por Martins e English, a partir de danos oxidativo em SOD1, em *Saccharomyces cerevisiae*, mostrou a formação de estruturas de alta massa molecular maiores que 300 kDa (MARTINS; ENGLISH, 2014). Comportamento similar foi observado para a mutante SOD1A4V no presente estudo. Dessa forma, foi possível observar que a trealose foi efetiva para a diminuição da formação destes oligômeros, visualizados no trabalho apenas para a proteína mutante. É amplamente descrito na literatura a perda de estabilidade conformacional da SOD1 devido à mutação A4V (GIANNAKOU et al, 2024). Tendo em vista isso, a formação de agregados de alta massa molecular, não encontrados para a SOD1WT, pode ser associada à perda de estabilidade da proteína. A diminuição da formação dessas espécies na presença de trealose ressalta sua capacidade de proteção e estabilização.

Complementando aos resultados obtidos por cromatografia, a partir do experimento de espalhamento de luz dinâmico (**tabela 2**) foi possível verificar que a trealose tem a capacidade de aumentar a homogeneidade das amostras de SOD1 com a queda da polidispersão, mostrando que além de diminuir a formação de oligômeros, a trealose leva a uma queda da população de espécies de alta massa molecular.

A alteração na atividade da SOD1 se torna um fator importante no processo de agregação, tendo em vista seu importante papel na proteção contra espécies reativas de oxigênio nas células. A queda de atividade da SOD1WT tratada com MGO já foi evidenciado, mostrando que com o aumento do tempo do tratamento, ocorre a queda progressiva da atividade, que pode ser associada a uma perda da conformação nativa da proteína (MONTEIRO NETO et al., 2023). Como observado nos resultados do nosso trabalho, nas condições de tratamento com a trealose, tanto na presença de 5 mM de MGO quanto 10 mM de MGO (**figura 16**), não foi possível observar aumento na atividade, mostrando que a trealose, durante o processo de incubação *in vitro* não teve atuação na manutenção da atividade enzimática da proteína.

6. Conclusões

Foi possível observar que o MGO apresentou um aumento nos danos de glicação na SOD1WT junto com o aumento da formação de agregados enquanto que a trealose se mostrou eficaz na proteção da proteína contra esses danos e a formação de agregados. Além disso, foi possível observar que, para a SOD1A4V, o MGO levou a formação de espécies de alta massa molecular e que a trealose é capaz de diminuir a formação dessas espécies.

7. Referências

AJROUD-DRISS, S.; SIDDIQUE, T. Esclerose lateral amiotrófica (ELA) esporádica e hereditária. **Biochimica et biophysica acta. Base molecular da doença**, v. 1852, n. 4, pág. 679–684, 2015.

AL-KHAYRI, J. M. et al. Amyotrophic Lateral Sclerosis: Insights and new prospects in disease pathophysiology, biomarkers and therapies. **Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)**, v. 17, n. 10, p. 1391, 2024.

ALHUJAILY, M. Molecular Assessment of Methylglyoxal-Induced Toxicity and Therapeutic Approaches in Various Diseases: Exploring the Interplay with the Glyoxalase System. **Life (Basel)**, v. 14, n. 2, p. 263, 2024.

ALLAMAN, I.; BÉLANGER, M.; MAGISTRETTI, P. J. Methylglyoxal, the dark side of glycolysis. **Frontiers in neuroscience**, v. 9, n. 23, 2015.

BAEK, Y. et al. Structural analysis of the overoxidized Cu/Zn-superoxide dismutase in ROS-induced ALS filament formation. **Communications biology**, v. 5, n. 1, 2022.

BANKS, C. J. Et al. Acylation of Superoxide Dismutase 1 (SOD1) at K122 Governs SOD1-Mediated Inhibition of Mitochondrial Respiration. **Molecular and cellular biology**, v. 37, n. 20, 2017.

BIAN, X. et al. Native mass spectrometry coupled to spectroscopic methods to investigate the effect of soybean isoflavones on structural stability and aggregation of zinc deficient and metal-free superoxide dismutase. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 27, n. 21, p. 7303, 2022.

BRASIL, A. A. et al. Implications of fALS mutations on Sod1 function and oligomerization in cellular models. **Molecular neurobiology**, v. 55, p. 5269–5281, 2018.

BRASIL, A. A. et al. Characterization of the activity, aggregation, and toxicity of heterodimers of WT and ALS-associated mutant Sod1. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v. 116, p. 201902483, 2019.

CHATTOPADHYAY, M.; VALENTINE, J. S. Aggregation of copper-zinc superoxide dismutase in familial and sporadic ALS. **Antioxid Redox Signal**, v. 11, n. 7, p. 1603-14, 2009.

COELHO, F. R. Et al. Oxidation of the tryptophan 32 residue of human superoxide dismutase 1 caused by its bicarbonate-dependent peroxidase activity triggers the non-amyloid aggregation of the enzyme. **Journal of biological chemistry**, v. 289, n. 44, p. 30690-30701, 2014.

DUGGER, B. N.; DICKSON, D. W. Pathology of neurodegenerative diseases. **In Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 9, n. 7, 2017.

ELEUTHERIO, E. C. A. et al. SOD1, more than just an antioxidant. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 697, p. 108701, 2021.

ELMANSY, M. F. et al. Small molecules targeting different cellular pathologies for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. **Medicinal research reviews**, v. 43, n. 6, p. 2260–2302, 2023.

EVERETT, W. H.; BUCELLI, R. C. Tofersen for SOD1 ALS. **Neurodegenerative disease management**, v. 14, n. 5, p. 149-160, 2024.

FARZADFARD, A. et al. Glycation modulates alpha-synuclein fibrillization kinetics: A sweet spot for inhibition. **Journal of biological chemistry**, v. 298, n. 5, p. 101848, 2022.

FIGUEROA, J. D. et al. Formation and characterization of crosslinks, including Tyr–Trp species, on one electron oxidation of free Tyr and Trp residues by carbonate radical anion. **RSC advances**, v. 10, n. 43, p. 25786–25800, 2020.

FIRSTENFELD, A. J. et al. Add-on treatment with Cerebrolysin improves clinical symptoms in patients with ALS: results from a prospective, single-center, placebo-controlled, randomized, double-blind, phase II study. **Journal of Medicine and Life**, v. 16, n. 12, p. 1750–1755, 2023.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutase. **Annual Review of Biochemistry**, v. 64, p. 97-112, 1995.

GAFFNEY, D. O. et al. Non-enzymatic lysine lactoylation of glycolytic enzymes. **Cell chemical biology**, v. 27, n. 2, p. 206- 213.e6, 2020.

GENGE, A. et al. Oral edaravone demonstrated a favorable safety profile in patients with amyotrophic lateral sclerosis after 48 weeks of treatment. **Muscle Nerve**, v. 67, n. 2, p. 124-129, 2023.

GIANNAKOU, M. et al. Discovery of novel inhibitors against ALS-related SOD1(A4V) aggregation through the screening of a chemical library using differential scanning fluorimetry (DSF). **Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)**, v. 17, n. 10, p. 1286, 2024.

GUARESCHI, S. et al. An over-oxidized form of superoxide dismutase found in sporadic amyotrophic lateral sclerosis with bulbar onset shares a toxic mechanism with mutant SOD1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 13, p. 5074-5079, 2012.

HAQUE, E. et al. Advanced glycation end products (AGEs), protein aggregation and their cross talk: new insight in tumorigenesis. **Glycobiology**, v. 30, n. 1, p. 49-57, 2019.

HARDIMAN, O. et al. Amyotrophic lateral sclerosis. **In Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 17071, 2017.

HARMAN, D. Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. **J. Gerontol**, v. 11, n. 3, p. 298–300, 1956.

HNATH, B.; DOKHOLYAN, N. V. Toxic SOD1 trimers are off-pathway in the formation of amyloid-like fibrils in ALS. **Biophysical journal**, v. 121, n. 11, p. 2084-2095, 2022.

HÖRNBERG, A. et al. The coupling between disulphide status, metallation and dimer interface strength in Cu/Zn superoxide dismutase. **Journal of molecular biology**, v. 365, p. 333-342, 2007.

INOUE, E. et al. SOD1 Is Essential for the Viability of DT40 Cells and Nuclear SOD1 Functions as a Guardian of Genomic DNA. *Journal of Nucleic Acids*, v. 5, p. 795946, 2010.

JAISWAL, M. K. Riluzole and edaravone: A tale of two amyotrophic lateral sclerosis drugs. **Medicinal research review**, v. 39, n. 2, p. 733-748, 2019.

KALAPOPOS, M. P. et al. Methylglyoxal in living organisms: chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. **Toxicology letters**, v. 110, n. 3, p. 145-75, 1999.

KALIA, M. et al. Molecular dynamics analysis of superoxide dismutase 1 mutations suggests decoupling between mechanisms underlying ALS onset and progression. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 21, p. 5296–5308, 2023.

KAUR, S. J.; MCKEOWN, S. R.; RASHID S. Mutant SOD1 mediated pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Gene**. V. 577, n. 2, p. 109-118, 2016.

KUHLA, B. et al. Age-dependent changes of glyoxalase I expression in human brain. **Neurobiology of Aging**, v. 27, n. 6, p. 815-822, 2006.

KWONG, L. K. Et al. TDP-43 proteinopathy: the neuropathology underlying major forms of sporadic and familial frontotemporal lobar degeneration and motor neuron disease. **Acta Neuropathol**, v. 114, n. 1, p. 63–70, 2007.

LEE, H. J.; YOON, Y. S.; LEE, S. J. Mechanism of neuroprotection by trehalose: controversy surrounding autophagy induction. **Cell Death and Disease**, v. 9, n. 7, p. 712, 2018.

LEE, J. M. et al. Control of protein stability by post-translational modifications. **Nature communications**, v. 14, n. 1, p. 201, 2023.

LI, X. H. et al. Glycation exacerbates the neuronal toxicity of β -amyloid. **Cell Death and Disease**, v. 4, n. 6, p. e673, 2013.

LIN, Z. F. Et al. SIRT5 desuccinylates and activates SOD1 to eliminate ROS. **Biochemical and biophysical research - communication**, v. 441, n. 1, p. 191-195, 2013.

LÜTH, H. J. et al. Age- and stage-dependent accumulation of advanced glycation end products in intracellular deposits in normal and Alzheimer's disease brains. **Cerebral cortex**, v. 15, n. 2, p. 211-220, 2005.

MAGALHÃES, R. S. S. et al. Trehalose protects against superoxide dismutase 1 proteinopathy in a model of amyotrophic lateral sclerosis. **Antioxidantes**, v. 13, n. 7, p. 807, 2024.

MARTINS, D.; ENGLISH, A. M. SOD1 oxidation and formation of soluble aggregates in yeast: relevance to sporadic ALS development. **Redox Biology**, v. 2, p 632-639, 2014.

MASRORI, P.; VAN DAMME, P. Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review. **In European Journal of Neurology**, v. 27, n. 10, p. 1918–1929, 2020.

MERCADO-URIBE, H. et al. Analyzing structural alterations of mitochondrial intermembrane space superoxide scavengers cytochrome-c and SOD1 after methylglyoxal treatment. **PloS one**, v. 15, n. 4, p. e0232408, 2020.

MILLER, T. M. et al. Trial of Antisense Oligonucleotide Tofersen for SOD1 ALS. **The new England journal of medicine**, v. 387, n. 12, p. 1099-1110, 2022.

MIQUEL, J. et al. Mitochondrial Role in Cell Aging. **Exp. Gerontol**, v. 15, n. 6, p. 575–591, 1980.

MONTEIRO NETO, J. R. et al. Glycation modulates superoxide dismutase 1 aggregation and toxicity in models of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, v. 1869, n. 8, p. 166835, 2023. NEUMANN, M. et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. **Science**, v. 314, p. 130–133, 2006.

POLYKRETIS, P. et al. Methylglyoxal interaction with superoxide dismutase 1. **Redox Biology**, v. 30, p. 101421, 2020.

PUPYSHEV, A. B. et al. Disaccharide trehalose in experimental therapies for neurodegenerative disorders: Molecular targets and translational potential. **Pharmacological research**, v. 183, p. 106373, 2022.

REDDI, A. R.; CULOTTA, V. C. SOD1 integrates signals from oxygen and glucose to repress respiration. *Cell*, v. 152, n. 1–2, p. 224–235, 2013.

RIBEIRO, G. D.; PARANHOS, L. H.; ELEUTHERIO, E. C. Trehalose promotes the biological fitness of fungi. **Fungal biology**, 2024, no prelo.

SEVRIEV, B. et al. Trehalose: Neuroprotective effects and mechanisms—an updated review. **NeuroSci**, v. 5, n. 4, p. 429–444, 2024.

SHEN, C. Y. et al. The Development of Maillard Reaction, and Advanced Glycation End Product (AGE)-Receptor for AGE (RAGE) Signaling Inhibitors as Novel Therapeutic Strategies for Patients with AGE-Related Diseases. **Molecules**, v. 25, n. 23, p. 5591, 2020.

SHOESMITH, CHRISTEN L. Chapter 9 - Palliative care principles in ALS. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 191, p. 139-155, 2023.

SIES, H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. **In Redox Biology**, v. 4, p. 180–183, 2015.

SIRANGELO, I. et al. Glycation in Demetalated Superoxide Dismutase 1 Prevents Amyloid Aggregation and Produces Cytotoxic Ages Adducts. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 3, n. 55, 2016.

SRINIVASAN, E.; RAJASEKARAN, R. A Systematic and Comprehensive Review on Disease-Causing Genes in Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 70, p. 1742-1770, 2020.

TALBOTT, E. O.; MALEK, A. M.; LACOMIS, D. The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis. **In Handbook of Clinical Neurology**, v. 138, p. 225–238, 2016.

TRIST, B. G. et al. Co-deposition of SOD1, TDP-43 and p62 proteinopathies in ALS: evidence for multifaceted pathways underlying neurodegeneration. **Acta Neuropathol Commun**, v. 25, p. 122, 2022a.

TRIST, B. G. et al. Altered SOD1 maturation and post-translational modification in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. **Brain**, v. 14, p. 3108-3130, 2022b.

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

TSANG, C. K. et al. SOD1 phosphorylation by mTORC1 couples nutrient sensing and redox regulation. **Molecular cell**, v. 70, n. 3, p. 502- 515.e8, 2018.

TWARDA-CLAPA, A. et al. Advanced Glycation End-Products (AGEs): Formation, Chemistry, Classification, Receptors, and Diseases Related to AGEs. **Cells**, v. 11, n. 8, p. 1312, 2022.

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

VICENTE MIRANDA, H. et al. Glycation potentiates α -synuclein-associated neurodegeneration in synucleinopathies. **Brain**, v. 140, n. 5, p. 1399-1419, 2017.

WANG, L. Q. et al. Amyloid fibril structures and ferroptosis activation induced by ALS-causing SOD1 mutations. **Science advances**, v. 10, n. 44, 2024

WRIGHT, G. S. A.; ANTONYUK, S. V.; HASNAIN, S. S. The biophysics of superoxide dismutase-1 and amyotrophic lateral sclerosis. **Quarterly reviews of biophysics**, v. 52, p. e12, 2019.

YANG, Z. et al. Methylglyoxal in the brain: From glycolytic metabolite to signalling molecule. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 27, n. 22, p. 7905, 2022.

YOSHINO, H. Edaravone for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. **Expert review of neurotherapeutics**, v. 19, n. 3, p. 185–193, 2019.

ZHANG, Y.; DEBOSCH, B. J. Using trehalose to prevent and treat metabolic function: effectiveness and mechanisms. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 22, n. 4, p. 303-310, 2019.

ZHU, C. et al. Large SOD1 aggregates, unlike trimeric SOD1, do not impact cell viability in a model of amyotrophic lateral sclerosis. **Proceedings of the National**

Academy of Sciences of the United States of America, v. 115, n. 18, p. 4661–4665, 2018.