

CINÉTICA DE AGREGAÇÃO  
DA PROTEÍNA  
TRANSTIRRETINA:

Contribuição Para A Compreensão  
Dos Processos De Formação De Amilóide

Zaida C. Lourenço de Almeida

Mestrado em Química

Departamento de Química

FCTUC

Setembro 2010



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

CINÉTICA DE AGREGAÇÃO  
DA PROTEÍNA  
TRANSTIRRETINA:

Contribuição Para A Compreensão  
Dos Processos De Formação De Amilóide

Zaida C. Lourenço de Almeida

Mestrado em Química

Departamento de Química

FCTUC

Setembro 2010



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

CINÉTICA DE AGREGAÇÃO  
DA PROTEÍNA  
TRANSTIRRETINA:

Contribuição Para A Compreensão  
Dos Processos De Formação De Amilóide

Zaida C. Lourenço de Almeida

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química,  
ramo de Química Avançada

Orientador: Rui M. M. Brito

FCTUC

Setembro 2010



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

# Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao Professor Doutor Rui Brito pela oportunidade de voltar a integrar a sua equipa. Igualmente, não poderia deixar de reconhecer o seu rigor científico na orientação contínua para a realização deste trabalho.

Agradeço aos meus colegas de trabalho, mais especificamente ao '*Grupo de Proteínas do RMBLab*', a entreatajuda e a boa disposição sempre prestada no dia-a-dia de trabalho. Um especial agradecimento para o Tiago, pelo apoio total na realização deste trabalho! Para as senhoras do Grupo: Cândida Susana (*Candy man*), Catarina Sofia (*Cataraines*) e Elsa Fernanda (*Elsaíta*), um grande, mas grande *Obrigado!* Vocês são impecáveis e as 'maiores'! Agradeço também ao Pedro pela sua simpatia constante e ao Carlos por acreditar todos os dias que é sempre possível atingirem-se os objectivos. Um beijinho muito especial à Daniela e ao Nuno.

Agradeço viva e fortemente aos meus amigos: Patrícia, Idália, Nuno, Varão, Lúcia, Joana, Sofia, Salomé... Obrigada por me aturarem, distraírem, ouvirem, aconselharem, ajudarem... enfim, tudo! Adoro-vos!

Agradeço do fundo do meu coração à minha família!

À minha avó Zaida pela experiência de vida, carinho e preocupação; aos meus tios Glória e Tó pela postura lutadora e humilde; à minha prima Isaura pela amizade e cumplicidade; à minha irmã Anabela e cunhado Ricardo pela experiência académica e pela contínua ajuda; ao meu sobrinho Miguel que é o ser mais lindo deste mundo e que me faz sorrir sempre.

Aos meus pais, Rosária e Luís, pelo amor, pela educação e pelo apoio a todos os níveis!



# Índice

Agradecimentos	i
Índice	iii
Índice de Figuras	v
Índice de Tabelas	vii
Resumo	ix
Abstract	xi
Abreviaturas	xiii
<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
1.1 Amiloidogénese	3
1.1.1 Formação e Estrutura de Fibras Amilóides	4
1.1.2 Toxicidade dos Oligómeros	6
1.2 Transtirretina	6
1.2.1 Estrutura	6
1.2.2 Função Biológica	8
1.2.3 Amiloidoses associadas à Transtirretina	10
1.2.4 Modelos Moleculares para a Agregação da Transtirretina	11
1.2.5 Toxicidade na Transtirretina	15
1.2.6 Estruturas Fibrilares na Transtirretina	15
1.2.7 Estratégias Terapêuticas	16
<b>2. Materiais, Métodos e Procedimento Experimental</b>	<b>21</b>
2.1 Materiais	23
2.2 Métodos	25
2.2.1 Dicroísmo Circular	25
2.2.1.1 Dicroísmo Circular no UV-Longínquo	27
2.2.1.2 Dicroísmo Circular no UV-Próximo	29
2.2.2 Fluorescência	30
2.2.2.1 Ensaio com Tioflavina-T	32
2.2.3 Cromatografia de Exclusão Molecular acoplada a um Detector Multiangular de Dispersão de Luz	34
2.2.4 Microscopia Electrónica de Transmissão	37

2.3 Procedimento Experimental .....	39
2.3.1 Preparação das Amostras de TTR-WT .....	39
2.3.2 Ensaio de Dicroísmo Circular .....	40
2.3.2.1 Dicroísmo Circular no UV-Longínquo .....	40
2.3.2.1 Dicroísmo Circular no UV-Próximo .....	41
2.3.3 Ensaio de Fluorescência .....	41
2.3.3.1 Ensaio de Tioflavina-T .....	42
2.3.4 Ensaio de Cromatografia de Exclusão Molecular acoplada a um Detector Multiangular de Dispersão de Luz .....	43
2.3.5 Ensaio de Microscopia Electrónica de Transmissão .....	44
<b>3. Resultados</b>	<b>45</b>
3.1 Análise da Estrutura Secundária da TTR-WT por Dicroísmo Circular no UV-Longínquo .....	47
3.2 Análise da Estrutura Terciária da TTR-WT por Dicroísmo Circular no UV-Próximo e por Fluorescência .....	50
3.3 Análise da Massa Molecular da TTR-WT por Cromatografia de Exclusão Molecular acoplada a um Detector Multiangular de Dispersão de Luz .....	52
3.4 Agregação da TTR-WT seguida por Dicroísmo Circular no UV-Próximo e Fluorescência .....	54
3.5 Agregação da TTR-WT seguida por Dicroísmo Circular no UV-Longínquo .....	57
3.6 Caracterização dos Agregados de TTR-WT .....	60
3.7 Determinação da Massa Molecular Aparente das Espécies formadas no Processo de Agregação da TTR-WT por Cromatografia de Exclusão Molecular acoplada a um Detector Multiangular de Dispersão de Luz .....	62
3.8 Cinética da Fase Inicial do Processo de Agregação da TTR-WT a pH 2,0 e NaCl 100 mM .....	66
3.9 Cinética da Fase Final do Processo de Agregação da TTR-WT a pH 2,0 e NaCl 100 mM .....	75
<b>4. Conclusões</b>	<b>81</b>
<b>5. Anexos</b>	<b>87</b>
<b>6. Bibliografia</b>	<b>95</b>

# Índice de Figuras

## 1. Introdução

<b>Figura 1.1:</b> Representação esquemática de diferentes mecanismos para a formação de fibras amilóides .....	4
<b>Figura 1.2:</b> Representação esquemática da organização estrutural de um protofilamento e de uma fibra amilóide .....	5
<b>Figura 1.3:</b> Representação esquemática das estruturas primária, secundária e tridimensional da proteína transtirretina humana .....	7
<b>Figura 1.4:</b> Representações da estrutura da tiroxina e da estrutura tridimensional da tiroxina ligada à TTR .....	8
<b>Figura 1.5:</b> Representações da estrutura do retinol e da estrutura tridimensional da proteína transportadora do retinol (RBP) ligada à TTR .....	9
<b>Figura 1.6:</b> Modelo proposto para a formação de fibras amilóides de TTR com base no tetrâmero .....	12
<b>Figura 1.7:</b> Modelo proposto para a formação de fibras amilóides de TTR com base no dímero .....	12
<b>Figura 1.8:</b> Modelo proposto para a formação de fibras amilóides da TTR em condições fisiológicas .....	13
<b>Figura 1.9:</b> Modelo proposto para a formação de fibras amilóides de TTR em condições acídicas .....	14
<b>Figura 1.10:</b> Modelo proposto para a formação de fibras amilóides de TTR a pH 2,0 e NaCl 100 mM .....	14
<b>Figura 1.11:</b> Representação esquemática de um protofilamento modelo de TTR .....	16
<b>Figura 1.12:</b> Resumo das diferentes etapas do mecanismo de agregação de TTR e estratégias terapêuticas propostas .....	17

## 2. Materiais, Métodos e Procedimento Experimental

<b>Figura 2.1:</b> A origem do dicroísmo circular .....	26
<b>Figura 2.2:</b> Espectros típicos de CD na zona do UV-longínquo .....	28
<b>Figura 2.3:</b> Diagrama de Jablonski simplificado .....	30
<b>Figura 2.4:</b> Modelo da interacção da Tioflavina-T com fibras amilóides .....	33



### 3. Resultados

<b>Figura 3.1:</b> Espectro de CD no UV-longínquo da TTR-WT a pH 7,2 .....	48
<b>Figura 3.2:</b> Espectro de CD no UV-longínquo da TTR-WT a pH 2,0 .....	49
<b>Figura 3.3:</b> Espectros de CD no UV-próximo da TTR-WT a pH 7,2 e a pH 2,0 .....	50
<b>Figura 3.4:</b> Espectros de fluorescência da TTR-WT a pH 7,2 e a pH 2,0 .....	51
<b>Figura 3.5:</b> Análise de uma amostra de TTR-WT a pH 7,2 por SEC-MALLS .....	53
<b>Figura 3.6:</b> Análise de uma amostra de TTR-WT a pH 2,0 por SEC-MALLS .....	53
<b>Figura 3.7:</b> Espectros de fluorescência de TTR-WT a pH 2,0 para vários tempos de incubação após a adição de NaCl 100 mM .....	54
<b>Figura 3.8:</b> Espectros de CD no UV-próximo da TTR-WT a pH 2,0 para vários tempos de incubação após a adição de NaCl 100 mM .....	56
<b>Figura 3.9:</b> Espectros de CD no UV-longínquo de TTR-WT, a pH 2,0 e após a adição de NaCl 100 mM para diferentes tempos de incubação até 24 horas .....	58
<b>Figura 3.10:</b> Espectros de CD no UV-longínquo de TTR-WT, a pH 2,0 e após a adição de NaCl 100 mM para diferentes tempos de incubação longos .....	59
<b>Figura 3.11:</b> Monitorização do processo de agregação da TTR-WT, a pH 2,0, NaCl 100 mM e 16 $\mu$ M por CD no UV-longínquo .....	59
<b>Figura 3.12:</b> Análise morfológica dos agregados de TTR-WT .....	60
<b>Figura 3.13:</b> Ensaio de Th-T para detecção de fibras amilóides .....	61
<b>Figura 3.14:</b> Cromatogramas de SEC-MALLS de TTR-WT 16 $\mu$ M, a pH 2,0 e após a adição de NaCl 100 mM para diferentes tempos de incubação até 1 hora .....	63
<b>Figura 3.15:</b> Cromatogramas de SEC-MALLS de TTR-WT 16 $\mu$ M, a pH 2,0 e após a adição de NaCl 100 mM para tempos de incubação até 24 horas .....	64
<b>Figura 3.16:</b> Cromatogramas de SEC-MALLS de TTR-WT 2,3 $\mu$ M, a pH 2,0 e após a adição de NaCl 100 mM para tempos de incubação até 24 horas .....	65
<b>Figura 3.17:</b> Cinética da fase inicial do processo de agregação de TTR-WT 16 $\mu$ M, a pH 2,0 e após a adição de NaCl 100 mM, seguida por CD e fluorescência .....	70
<b>Figura 3.18:</b> Variação da fracção molar de monómero, <i>molten globule</i> e pequenos agregados ao longo do tempo de TTR-WT 16 $\mu$ M, pH 2,0 e NaCl 100 mM .....	72
<b>Figura 3.19:</b> Cinética da fase inicial do processo de agregação de TTR-WT 2,3 $\mu$ M, a pH 2,0 e após a adição de NaCl 100 mM, seguida por CD no UV-longínquo .....	73

<b>Figura 3.20:</b> Variação da fracção molar de monómero, <i>molten globule</i> e pequenos agregados ao longo do tempo para TTR-WT 2,3 $\mu\text{M}$ (a vermelho) e 16 $\mu\text{M}$ (a azul), pH 2,0 e NaCl 100 mM .....	74
<b>Figura 3.21:</b> Cinética de agregação de TTR-WT 16 $\mu\text{M}$ , a pH 2,0 e NaCl 100 mM, seguida por CD no UV-longínquo a 217 nm .....	77
<b>Figura 3.22:</b> Variação da fracção molar de pequenos e grandes agregados ao longo do tempo de TTR-WT 16 $\mu\text{M}$ , a pH 2,0 e NaCl 100 mM .....	79

# Índice de Tabelas

## 1. Introdução

<b>Tabela 1.1:</b> Exemplos de Amiloidoses .....	3
--	---

## 2. Materiais, Métodos e Procedimento Experimental

<b>Tabela 2.1:</b> Propriedades de absorvância e fluorescência dos aminoácidos aromáticos em solução aquosa a pH neutro .....	31
---	----

## 3. Resultados

<b>Tabela 3.1:</b> Constantes de velocidade da alteração do estado conformacional do monómero ( $k_1$ ) e da formação dos primeiros oligómeros ( $k_2$ ) de TTR-WT 16 $\mu\text{M}$ , a pH 2,0 e NaCl 100 mM, seguida por CD e Fluorescência .....	71
--	----

<b>Tabela 3.2:</b> Constantes médias de velocidade da alteração do estado conformacional do monómero ( $k_1$ ) e da formação dos primeiros oligómeros ( $k_2$ ) de TTR-WT 16 $\mu\text{M}$ , a pH 2,0 e NaCl 100 mM .....	71
---	----

<b>Tabela 3.3:</b> Constantes médias de velocidade da alteração do estado conformacional do monómero ( $k_1$ ) e da formação dos primeiros oligómeros ( $k_2$ ) de TTR-WT 2,3 $\mu\text{M}$ , pH 2,0 e NaCl 100 mM .....	74
--	----

<b>Tabela 3.4:</b> Constantes de velocidade para a nucleação de agregados intermediários ( $k_3$ ) e para o crescimento de agregados até à formação de fibras amilóides ( $k_4$ ) de TTR-WT 16 $\mu\text{M}$ , pH 2,0 e NaCl 100 mM .....	78
---	----

## **5. Anexos**

**Tabela 5.I:** Doenças humanas associadas à formação de amilóide ..... 89

**Tabela 5.II:** Lista das variantes amiloidogénicas e não-amiloidogénicas  
da proteína transtirretina humana ..... 91

**Tabela 5.III:** Estrutura dos aminoácidos ..... 93

# Resumo

Em patologias amiloidóticas, como a doença de Alzheimer, Encefalopatias Espongiformes e a Polineuropatia Amiloidótica Familiar, proteínas normalmente solúveis sofrem alterações conformacionais e agregam sob a forma de fibras amilóides altamente estáveis, mas insolúveis. Fibras amilóides formadas pela proteína homotetramérica plasmática Transtirretina (TTR) são responsáveis por três doenças amilóides: Polineuropatia Amiloidótica Familiar (PAF), Cardiomiopatia Amiloidótica Familiar (CAF) e Amiloidose Senil Sistémica (ASS). A ASS é causada pela proteína normal (TTR-WT), enquanto que nas outras doenças as fibras amilóides são constituídas maioritariamente por variantes de TTR. O processo de formação de fibras amilóides pela TTR é iniciado pela dissociação da estrutura tetramérica nativa da TTR em intermediários monoméricos não-nativos que agregam até à formação de fibras amilóides.

Este trabalho surge no sentido de caracterizar cineticamente as várias etapas do processo de agregação da TTR-WT, desde a formação do intermediário monomérico amiloidogénico até à formação das fibras amilóides, partindo de monómeros desnaturados a pH 2,0. O processo de agregação de TTR-WT foi iniciado pela adição de NaCl 100 mM aos monómeros desnaturados. Este processo pode ser dividido em duas fases principais. Na fase inicial, os monómeros desnaturados sofrem uma mudança conformacional originando um monómero parcialmente desnaturado e mais compacto (*molten globule*) susceptível a agregar em pequenos oligómeros. A monitorização desta fase inicial foi seguida por dicroísmo circular (CD) no UV-longínquo e próximo, fluorescência e cromatografia de exclusão molecular acoplada a um detector multiangular de dispersão da luz (SEC-MALLS). Os dados experimentais mostram que são necessários dois passos cinéticos para descrever o mecanismo desta fase inicial do processo de agregação da TTR, com a formação de um intermediário (*molten globule*). Assim, o mecanismo cinético mais simples proposto para esta primeira fase no processo de agregação é constituído por três estados:  $U \rightarrow MG \rightarrow SA$ , onde  $U$  representa o monómero desnaturado,  $MG$  o *molten globule* e  $SA$  pequenos agregados solúveis. O ajuste de uma função aos pontos experimentais permitiu a obtenção das constantes de velocidade, em que a formação dos pequenos agregados é o passo determinante deste mecanismo e é dependente da concentração de proteína.

Depois da formação dos primeiros agregados, o progresso da agregação foi seguido por CD no UV-longínquo. Os resultados experimentais obtidos demonstram a existência de um mecanismo de nucleação seguido do crescimento rápido destes núcleos até à formação de fibras amilóides. Nesta fase de agregação, foi usado o modelo cinético de Finke-Watzky de dois passos:  $SA \rightarrow A$ ;  $SA + A \rightarrow 2A$ , onde  $A$  representa agregados de elevado peso molecular. O ajuste de uma função aos pontos experimentais permitiu a obtenção das respectivas constantes de velocidade. A confirmação da formação de fibras amilóides foi feita através de microscopia electrónica de transmissão (TEM) e por recurso a ensaios com Tioflavina-T (Th-T), uma sonda fluorescente tradicionalmente usada para a detecção de fibras amilóides em solução.



# Abstract

In amyloidogenic diseases such as Alzheimer's, Spongiform Encephalopathies, and Familial Amyloid Polyneuropathy, normally soluble proteins undergo conformational changes and aggregate into insoluble and highly stable amyloid fibrils. Amyloid fibrils formed by the homotetrameric plasma protein Transthyretin (TTR) are implicated in three amyloid pathologies: Familial Amyloid Polyneuropathy (FAP), Familial Amyloid Cardiomyopathy (FAC) and Senile Systemic Amyloidosis (SSA). Amyloid fibrils in SSA are derived from *wild-type transthyretin (WT-TTR)*, while in FAP and FAC are mostly constituted by TTR variants. Amyloid fibril formation by TTR is a process initiated by the dissociation of the native tetrameric TTR to non-native monomeric intermediates which are prone to aggregate into amyloid fibrils.

The present work aims at characterizing the kinetics of the aggregation process of WT-TTR, from the formation of the amyloidogenic monomeric intermediate until the formation of amyloid fibrils formation. The aggregation process was triggered by the addition of 100 mM NaCl to the unfolded monomers at pH 2.0. This process can be divided in two stages. In the first stage, the unfolded monomers undergo a conformational change producing partially unfolded compact monomers (molten globule) that assemble into small aggregates. To follow this first stage we have used circular dichroism (CD) in the far and near-UV, fluorescence and size exclusion chromatography coupled to a multi-angle laser light scattering instrument (SEC-MALLS). The experimental data shows that it is necessary two steps to describe the kinetic mechanism of this initial stage of TTR aggregation, with the formation of one intermediate (molten globule). Thus, the simplest kinetic mechanism proposed for this first aggregation stage is constituted by a three-state process:  $U \rightarrow MG \rightarrow SA$ , where  $U$  represents the unfolded monomer,  $MG$  represents the molten globule and  $SA$  represents the soluble small aggregates. Fitting a function to the experimental data allowed the determination of the rate constants of each step, with the formation of the small aggregates being dependent on protein concentration.

After the formation of the first aggregates, the aggregation process was followed by CD in the far-UV. The mechanism derived from the experimental results shows the existence of a nucleation step followed by a rapid growth step yielding amyloid fibrils. In this aggregation stage the Finke-Watzky two-step kinetic model was used:  $SA \rightarrow A$ ;  $SA + A \rightarrow 2A$ , where  $A$  represents high molecular weight aggregates. Fitting a function to the experimental data allowed the determination of the respective rate constants. To confirm the presence of amyloid fibrils, assays were performed by transmission electron microscopy (TEM) and thioflavin-T (Th-T) fluorescence, a dye that is typically used for the detection of amyloid fibrils in solution.



# Abreviaturas

ASS	Amiloidose Senil Sistêmica
BSA	Albumina Sérica Bovina
CAF	Cardiomiopatia Amiloidótica Familiar
CD	Dicroísmo Circular
CSF	Fluído Cérebro-Espinal
DSSP	<i>Definition of Secondary Structure of Proteins</i>
IDOX	4'-desoxi-4'-iododoxorubicina
MALLS	Dispersão de Luz Multiangular
MD	Dinâmica Molecular
MG	<i>Molten Globule</i>
NATA	N-acetil-L-triptofano amida
NSAIDs	Drogas Anti-Inflamatórias Não Esteróides
ORD	Dispersão Óptica Rotatória
PAF	Polineuropatia Amiloidótica Familiar
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
Phe	Fenilalanina
PICUP	<i>Photo Induced Cross-Linking of Unmodified Proteins</i>
RBP	Proteína Transportadora do Retinol
SEC	Cromatografia de Exclusão Molecular
SEC-MALLS	Cromatografia de Exclusão Molecular acoplada a um Detector Multiangular de Dispersão de Luz
SLS	Dispersão da Luz Estática
T <sub>4</sub>	Tiroxina
TEM	Microscopia Electrónica de Transmissão
Trp	Triptofano
TTR	Transtirretina
TTR-WT	Transtirretina na forma normal



TTR-L55P	Variante da Transtirretina com uma Prolina na posição 30 a substituir uma Leucina
TTR-T119M	Variante da Transtirretina com uma Metionina na posição 119 a substituir uma Treonina
TTR-V30M	Variante da Transtirretina com uma Metionina na posição 30 a substituir uma Valina
TTR-V122I	Variante da Transtirretina com uma Isoleucina na posição 122 a substituir uma Valina
Tyr	Tirosina
UV	Ultra-Violeta

## Capítulo 1

# Introdução



## 1.1 Amiloidogénese

O termo amilóide surge em 1854 por Rudolf Virchow ao analisar os depósitos presentes em tecidos de pacientes com determinadas patologias (Virchow, 1854). Estes depósitos tinham a particularidade de apresentarem uma coloração com iodo semelhante ao amido (*amylum* em latim) (Sipe e Cohen, 2000). Hoje em dia, sabe-se que esta substância é maioritariamente formada por agregados de proteínas, no entanto continua a usar-se o termo amilóide por razões históricas (Cohen e Connors, 1987). As patologias associadas à deposição extracelular de amilóide denominam-se por amiloidoses. Nestas doenças, proteínas normalmente solúveis sofrem alterações conformacionais e agregam sob a forma de fibras amilóides insolúveis altamente estáveis (Sunde *et al.*, 1997). Estas patologias podem ser classificadas segundo a localização dos depósitos amilóides no corpo humano por amiloidoses sistémicas, em que os depósitos são encontrados em diversos órgãos, e por amiloidoses localizadas, no caso em que os depósitos são confinados apenas a um órgão ou tecido específico (Chiti e Dobson, 2006).

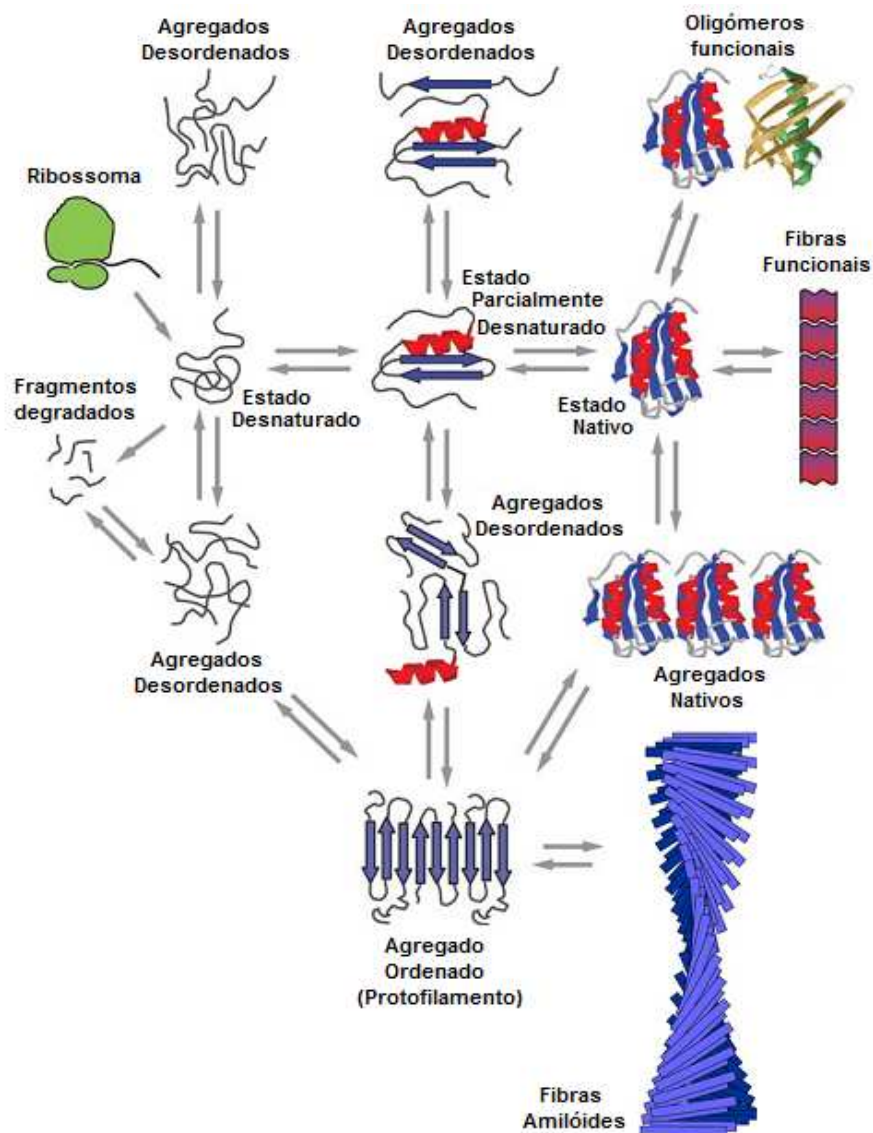
Actualmente, já foram identificadas aproximadamente 30 proteínas humanas diferentes com tendência para formar agregados insolúveis amilóides. Na Tabela 1.1 apresentam-se alguns exemplos de proteínas precursoras e as suas respectivas patologias amiloidóticas associadas e no Anexo I, encontra-se uma lista mais pormenorizada da mesma.

**Tabela 1.1: Exemplos de Amiloidoses.** Alguns exemplos de proteínas precursoras de amilóide e respectivas patologias associadas.

<b>Proteína</b>	<b>Patologia / Sistémica (S) ou Localizada (L)</b>
Transtirretina (TTR)	Polineuropatia Amiloidótica Familiar / (S) Amiloidose Senil Sistémica / (S) Cardiomiopatia Amiloidótica Familiar / (L)
Proteína Percursora de Amilóide- $\beta$ (A $\beta$ PP)	Doença de Alzheimer / (L)
Apolipoproteína Sérica (AA)	Tuberculose / (S) Osteomielite / (S) Artrite Reumatóide / (S)
Proteína Priónica	Encefalopatias Espongiformes / (L)

### 1.1.1 Formação e Estrutura de Fibras Amilóides

As proteínas estão envolvidas na maioria dos processos importantes nos sistemas biológicos exercendo uma diversidade de funções vitais. Após a sua síntese nos ribossomas, cada proteína organiza-se numa estrutura tridimensional específica para ser capaz de desempenhar a sua função biológica. A falha de uma proteína em dobrar correctamente ou de manter a sua estrutura tridimensional nativa está associada a diversas doenças, nomeadamente as amiloidoses (Dobson, 2003; Jahn e Radford, 2008).

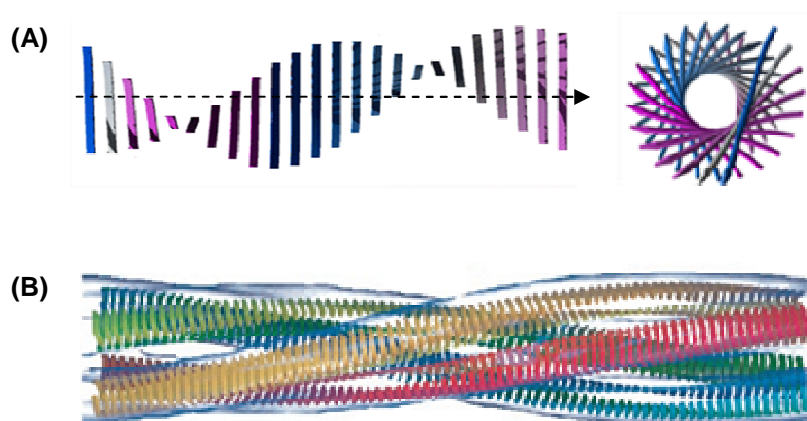


**Figura 1.1: Representação esquemática de diferentes mecanismos para a formação de fibras amilóides.** Após a sua síntese nos ribossomas, a cadeia polipeptídica organiza-se numa estrutura tridimensional nativa que corresponde à forma funcional da proteína. Quando a proteína não se organiza correctamente ou não mantém a estrutura nativa, podem gerar-se agregados que levam à formação de fibras amilóides (Chiti e Dobson, 2006).

Geralmente, a formação de fibras amilóides ocorre segundo um mecanismo de nucleação seguido de um mecanismo de crescimento. A nucleação é traduzida por uma fase inicial (*lag phase*) que corresponde ao tempo necessário para a formação de um intermediário de nucleação amiloidogénico (núcleo). Uma vez que o intermediário de nucleação seja formado, segue-se o crescimento rápido deste até à formação de fibras amilóides por associação de monómeros ou oligómeros com o núcleo (Rochet e Lansbury Jr, 2000; Chi *et al.*, 2003; Chiti e Dobson, 2006).

Análise por microscopia electrónica de fibras amilóides de várias proteínas, associadas a diversas patologias, mostra que as fibras são formadas por 2 ou mais filamentos elementares, designados por protofilamentos, que se associam num arranjo mais ou menos helicoidal formando a fibra madura de estrutura rígida, não ramificada, com 70 a 130 Å de diâmetro e comprimento variável. Cada protofilamento apresenta um diâmetro de 25 a 50 Å (Figura 1.2) (Serpell *et al.*, 1995, 2000). Estudos realizados por difracção de raios-X em fibras amilóides revelaram uma estrutura rica em folha- $\beta$ , na qual as cadeias polipeptídicas formam cadeias- $\beta$  orientadas perpendicularmente ao eixo maior da fibra, resultando numa série de folhas- $\beta$  que se propagam ao longo da fibra. A torção das cadeias- $\beta$  faz com que estas adquiram um arranjo helicoidal (Sunde *et al.*, 1997) (Figura 1.2).

Todas as fibras amilóides têm características tintoriais únicas, resultantes da interacção com corantes como Tioflavina-T (Vassar e Culling, 1959) e Congo Red (Puchtler *et al.*, 1962).



**Figura 1.2: Representação esquemática da organização estrutural de um protofilamento e de uma fibra amilóide.** (A) Modelo estrutural de um protofilamento, onde as folhas- $\beta$  formam um arranjo helicoidal com as cadeias- $\beta$  perpendiculares ao eixo longo do protofilamento (seta tracejada). À direita encontra-se uma secção transversal do protofilamento (Blake e Serpell, 1996). (B) Modelo estrutural de uma fibra amilóide com quatro protofilamentos representados a vermelho, azul, amarelo e verde. O protofilamento constitui a unidade base das fibras amilóides com estrutura em folha- $\beta$  (Jimenez *et al.*, 2002).

## 1.1.2 Toxicidade dos Oligómeros

A estrutura e as propriedades das fibras amilóides têm sido alvo de muito estudo nos últimos anos, pois acreditava-se que eram a causa directa da toxicidade encontrada nas células nas diferentes formas de amiloidose (Cohen e Jones, 1993). Recentemente, tem crescido o interesse em estudar oligómeros solúveis formados na fase inicial do processo de fibrilização. Em muitas amiloidoses estas espécies moleculares de baixo peso molecular, também referidas como agregados solúveis ou protofibrilas, foram consideradas como as mais tóxicas para as células (Behl *et al.*, 1994; Ando *et al.*, 1997; Conway *et al.*, 2000). Nesta perspectiva, sugere-se que as fibras amilóides têm um efeito protector ao removerem os agregados tóxicos das células, uma vez que são não-tóxicas (Andersson *et al.*, 2002).

## 1.2 Transtirretina

A transtirretina (TTR) é uma das mais de vinte proteínas humanas associadas com doenças amilóides. É secretada para o fluído cérebro-espinal (CSF) pelo plexus coróide do cérebro (Dickson *et al.*, 1985) e para o plasma pelos hepatócitos (fígado) (Felding e Fex, 1982).

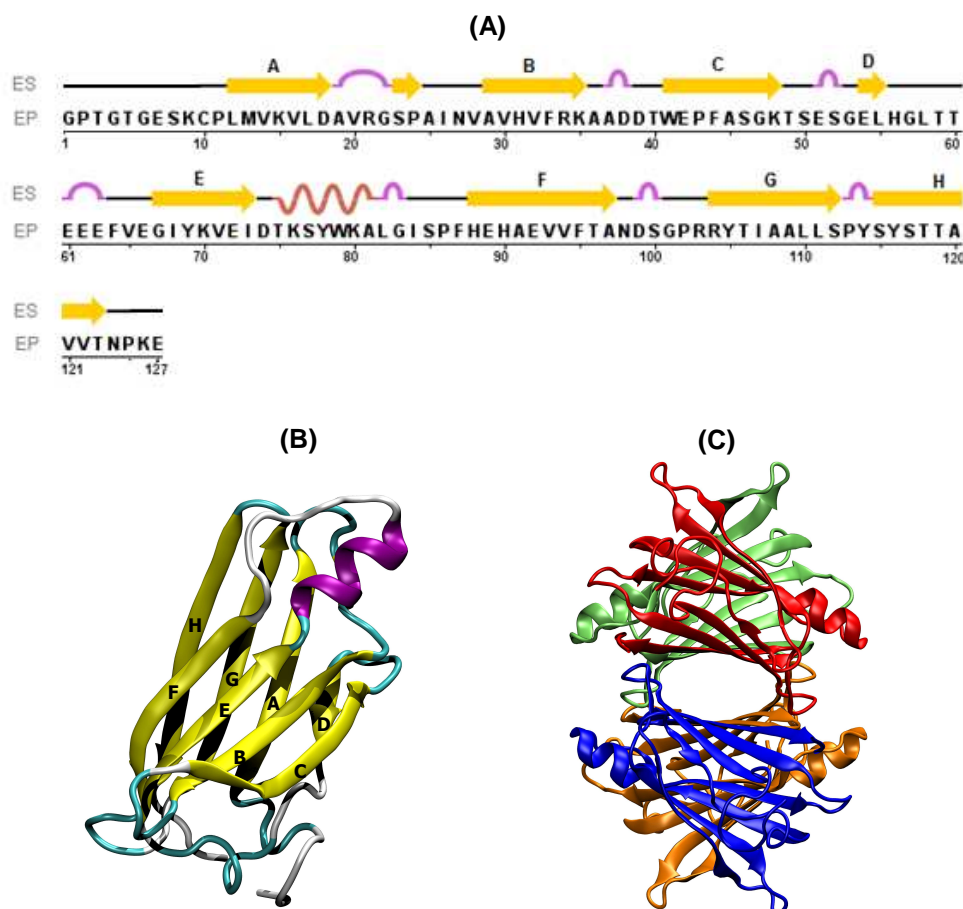
### 1.2.1 Estrutura

A estrutura tridimensional da transtirretina humana foi inicialmente determinada por Colin Blake e seus colaboradores (Blake *et al.*, 1971, 1974, 1978). Com o avançar dos anos, estruturas com maior resolução foram resolvidas, inclusive de variantes da TTR, de diferentes espécies animais e de complexos com ligandos. Actualmente, estão disponíveis na PDB (*Protein Data Bank*) mais de 150 estruturas de TTR.

A transtirretina é uma proteína que, em condições fisiológicas, adopta uma estrutura homotetramérica constituída por 127 aminoácidos em cada uma das suas quatro subunidades (Figura 1.3 (A, B e C)). A sua massa molecular total é de aproximadamente 55 kDa, tendo cada subunidade aproximadamente 13,7 kDa.

Cada uma das suas subunidades, também designadas por unidades monoméricas, tem um arranjo tridimensional maioritariamente em folha- $\beta$ ,

normalmente denominado por *sandwich*- $\beta$ . Esta estrutura é composta por duas folhas- $\beta$  de quatro cadeias- $\beta$ , denominadas DAGH e CBEF (Figura 1.3 (B)) (Blake *et al.*, 1974, 1978; Hamilton *et al.*, 1993). O interior de cada unidade monomérica é constituído maioritariamente por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos constituintes das duas folhas- $\beta$ . Todas as cadeias- $\beta$  têm uma disposição anti-paralela, excepto as cadeias A e G que são paralelas entre si. Cada monómero possui ainda uma pequena hélice- $\alpha$  e sete voltas (*loops*) que interligam as cadeias- $\beta$  (Blake *et al.*, 1978; Hamilton *et al.*, 1993).



**Figura 1.3: Representação esquemática das estruturas primária, secundária e tridimensional da proteína transtirretina humana.** (A) Estrutura primária (EP) e estrutura secundária (ES) do monómero da TTR com a respectiva identificação das cadeias- $\beta$  de A a H a amarelo, da hélice- $\alpha$  a vermelho e das voltas a roxo. A representação (A) foi retirada da PDB, código 2PAB, segundo a estrutura cristalográfica de Blake *et al.* (1978). (B) Representação da estrutura tridimensional da subunidade da TTR com a respectiva identificação das cadeias- $\beta$  de A a H a amarelo, da hélice- $\alpha$  a roxo, das voltas a azul e da estrutura não-organizada a branco. (C) Representação da estrutura tridimensional tetramérica onde cada subunidade está representada a cor diferente. As imagens (B) e (C) foram produzidas com o programa VMD (Humphrey *et al.*, 1996).



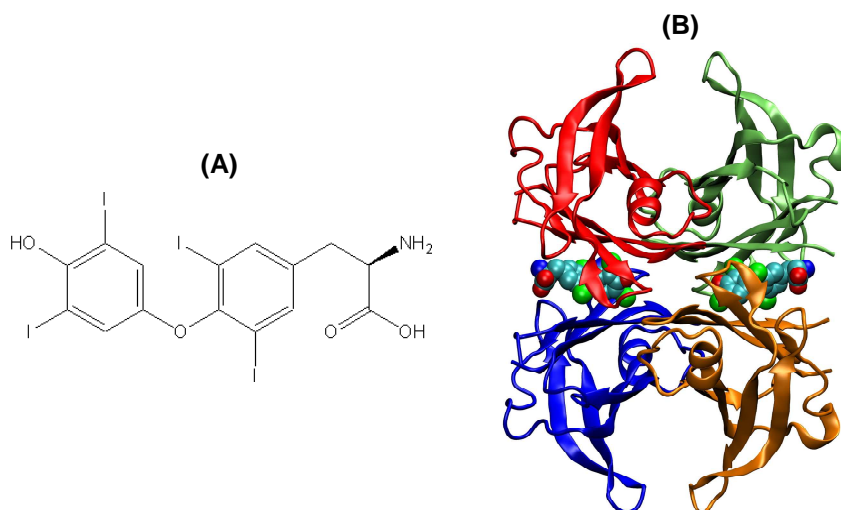
A associação anti-paralela das cadeias- $\beta$  F e H de dois monómeros por meio de ligações de hidrogénio resulta na estrutura dimérica. O dímero de TTR é portanto composto pelas seguintes folhas- $\beta$ : DAGHH'G'A'D' e CBEFF'E'B'C', onde (') corresponde a cadeias- $\beta$  de um monómero diferente (Blake *et al.*, 1978; Hamilton *et al.*, 1993).

A associação de dois dímeros de forma a obter o tetrâmero nativo, ocorre através de contactos hidrofóbicos e ligações de hidrogénio que se estabelecem entre as voltas AB, GH de cada dímero e a cadeia H. A estrutura tetramérica é a forma solúvel e funcional da transtirretina (Figura 1.3 (C)) (Blake *et al.*, 1978).

## 1.2.2 Função Biológica

A **TransTirRetina** é na realidade uma sigla que revela a função da proteína: o **transporte de tiroxina e retinol** no plasma e no fluído cérebro-espinal.

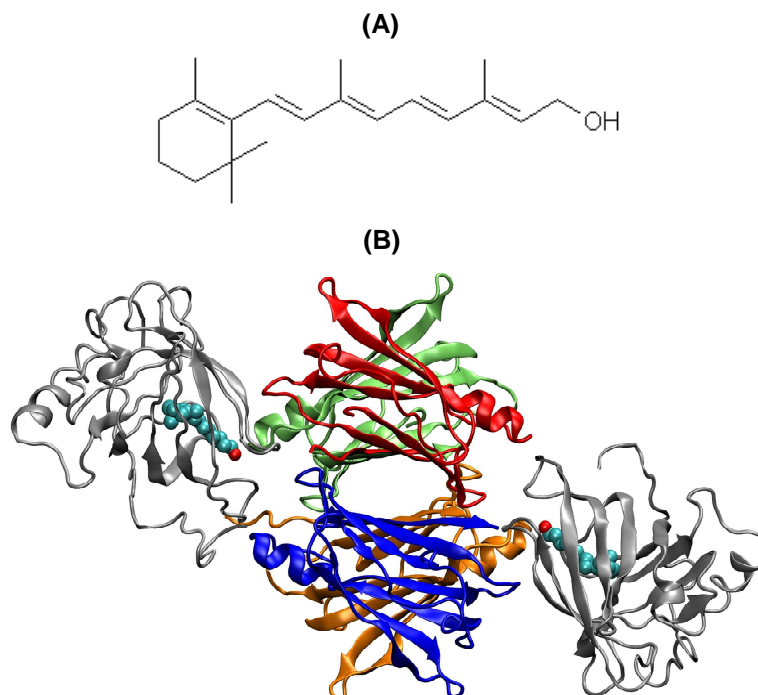
A tiroxina ( $T_4$ ) (Figura 1.4 (A)) é uma hormona produzida pela glândula tiróide e desempenha um papel fundamental no desenvolvimento, no metabolismo e na diferenciação tecidual do organismo.



**Figura 1.4: Representações da estrutura da tiroxina e da estrutura tridimensional da tiroxina ligada à TTR.** (A) Estrutura química da molécula da tiroxina. (B) Estrutura tridimensional da transtirretina com a molécula de tiroxina ligada. Na cavidade hidrofóbica central da transtirretina são visíveis os dois locais de ligação com duas moléculas de tiroxina ligadas, representadas por esferas. A imagem foi produzida com o programa VMD (Humphrey *et al.*, 1996).

A TTR é a principal transportadora da tiroxina no CSF (Herbert *et al.*, 1986). Os dois locais de ligação para a tiroxina localizam-se na cavidade central e hidrofóbica da TTR formada pela interface entre dois dímeros (Figura 1.3 (C) e Figura 1.4 (B)) (Wojtczak *et al.*, 1996). O transporte da T<sub>4</sub> no sangue é facilitado por várias proteínas, incluindo a TTR, que permitem aumentar o seu tempo de meia vida, proporcionar uma entrega controlada aos órgãos alvo e evitar efeitos tóxicos da hormona livre quando está presente em concentrações elevadas na circulação (Schussler, 2000).

O retinol é a forma activa da vitamina A (Figura 1.5 (A)) e é transportado pela proteína transportadora do retinol (RBP) formando um complexo 1:1 (retinol-RBP) (Figura 1.5 (B)) (Peterson, 1971). A ligação do retinol à RBP facilita a sua solubilização, o seu transporte e a sua entrega aos órgãos alvo. A estrutura do complexo TTR-RBP revela uma estequiometria de 2RBP:1TTR (Figura 1.5 (B)). No entanto, a concentração de RBP no plasma é limitada e o complexo formado *in vivo* apresenta maioritariamente uma estequiometria 1:1 (Naylor e Newcomer, 1999). A função da TTR neste caso é estabilizar a ligação do retinol à RBP (Yamamoto *et al.*, 1997).



**Figura 1.5: Representações da estrutura do retinol e da estrutura tridimensional da proteína transportadora do retinol (RBP) ligada à TTR.** (A) Estrutura química da molécula do retinol. (B) Estrutura tridimensional do complexo proteico TTR-RBP, com retinol ligado à RBP representado por esferas. A imagem foi produzida com o programa VMD (Humphrey *et al.*, 1996).

### 1.2.3 Amiloidoses associadas à Transtirretina

Em 1952, o Professor Corino de Andrade observou em vários pacientes do norte de Portugal o que ele descreveu ser “uma forma peculiar de neuropatia periférica, histologicamente caracterizada por amiloidose generalizada” (Andrade, 1952). Esta doença denominada de Polineuropatia Amiloidótica Familiar (PAF), Paramiloidose ou mais habitualmente de Doença dos Pezinhos tem como sintomas adormecimento, formigueiro, falta de sensibilidade à dor e à temperatura nos membros inferiores, dificuldade na marcha, desordens gastro intestinais, entre outros (Andrade, 1952). A manifestação dos sintomas clínicos desta doença começa por volta dos 30 anos (Saraiva *et al.*, 1984). No seguimento do trabalho do Professor Corino de Andrade, Costa e seus colaboradores identificaram a TTR como o principal componente presente nas fibras amilóides depositadas no sistema nervoso periférico nos pacientes portugueses com PAF (Costa *et al.*, 1978).

Actualmente, para além da PAF, existem mais duas patologias conhecidas causadas pela proteína transtirretina: a Amiloidose Senil Sistémica (ASS) e a Cardiomiopatia Amiloidótica Familiar (CAF). No caso da ASS, é a forma normal da proteína transtirretina (TTR-WT) a responsável por esta patologia, visto ser esta forma a encontrada nos depósitos de amilóide. Este tipo de amiloidose afecta cerca de 25% da população acima dos 80 anos sendo portanto uma doença relativamente pouco severa e com poucos sintomas clínicos (Westermarck *et al.*, 1990).

As amiloidoses familiares de TTR são doenças causadas por mutações no gene que codifica a TTR, originando as variantes. A variante amiloidogénica mais comum encontrada em pacientes com PAF é a TTR-V30M, onde uma metionina na posição 30 substitui uma valina. Esta variante tem maior incidência em Portugal, Suécia e Japão (Saraiva *et al.*, 1984).

A variante mais comum associada à CAF é a TTR-V122I, onde uma isoleucina substitui na posição 122 uma valina. Esta variante é maioritariamente encontrada em indivíduos de descendência africana. Na CAF, a deposição de amilóide é encontrada principalmente no coração (Jacobson *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 2001a).

A variante TTR-L55P, onde uma prolina na posição 55 substitui uma leucina, está associada a uma das formas mais agressivas da PAF e, conseqüentemente, apresenta um maior potencial amiloidogénico. Neste caso, a doença manifesta-se mais cedo, entre os 15 e 20 anos de idade, e progride mais rapidamente que no caso da maioria das outras variantes. Como manifestações clínicas desta variante tem-se a neuropatia e a cardiopatia (Jacobson *et al.*, 1992).

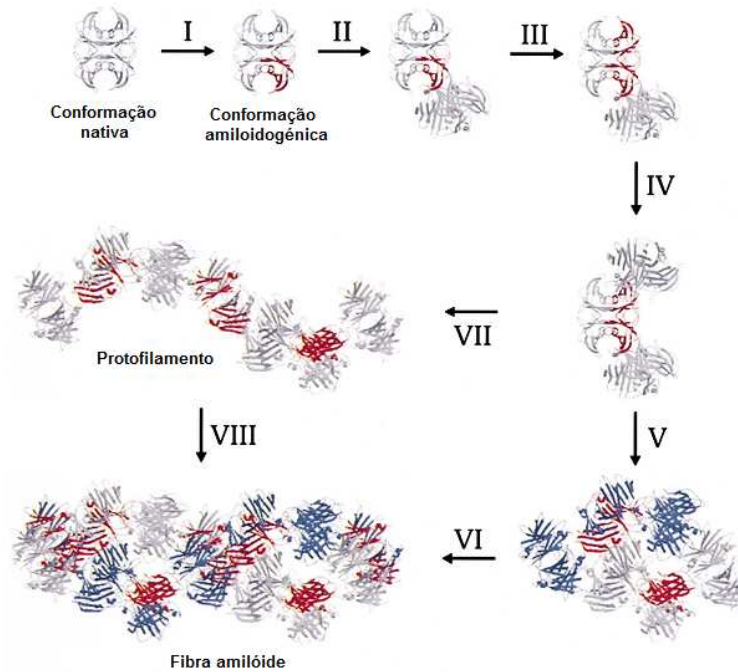
A variante TTR-T119M, onde uma metionina na posição 119 substitui uma treonina, é uma variante não-amiloidogénica, isto é, não está associada a qualquer doença. No entanto, em pacientes com duas mutações em cromossomas alelos, sendo uma amiloidogénica e a outra T119M, verifica-se o aparecimento tardio da doença e a sua evolução é mais lenta (Coelho *et al.*, 1996).

Actualmente, são conhecidas aproximadamente 100 mutações da TTR responsáveis pela formação de variantes com carácter amiloidogénico e não-amiloidogénico (Saraiva, 2001, 2004; Connors *et al.*, 2003). No Anexo II, encontra-se uma lista de todas as mutações da TTR.

### **1.2.4 Modelos Moleculares para a Agregação da Transtirretina**

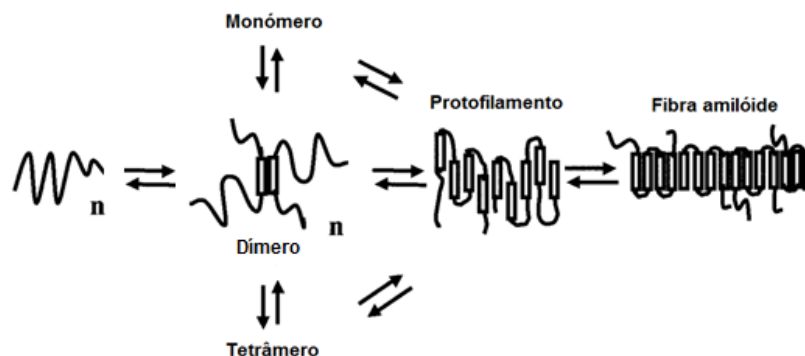
Nos últimos anos, foram propostos diversos modelos para a formação de fibras amilóides da proteína transtirretina. Na maioria dos mecanismos propostos há um aspecto que é comum, a existência de um intermediário amiloidogénico de estrutura instável que ao agregar adquire estrutura secundária e estabilidade conformacional (Uversky *et al.*, 1998; Lindgren *et al.*, 2005). Diferentes intermediários têm sido sugeridos, tais como o tetrâmero (Eneqvist *et al.*, 2000), o dímero (Olofsson *et al.*, 2001) e o monómero (Lai *et al.*, 1996; Quintas *et al.*, 2001; Lindgren *et al.*, 2005).

O modelo proposto por Eneqvist e seus colaboradores considera o tetrâmero a unidade base para a construção das fibras amilóides. Este modelo é baseado na estrutura cristalina de uma variante de TTR altamente amiloidogénica, onde uma alteração na cadeia- $\beta$  D é observada. Esta alteração estrutural forma uma nova volta entre as cadeias C e D gerando um estado dito amiloidogénico da TTR. Esta conformação é instável até que outras moléculas de TTR se associem dando origem a um triplo (3 tetrâmeros) que pode crescer e formar protofilamentos ou associar-se a outro triplo formando fibras amilóides (Figura 1.6) (Eneqvist *et al.*, 2000). Este modelo apresenta contudo um problema fundamental: nem os protofilamentos, nem as fibras apresentam a estrutura  $\beta$ -cruzada característica das estruturas amilóides.



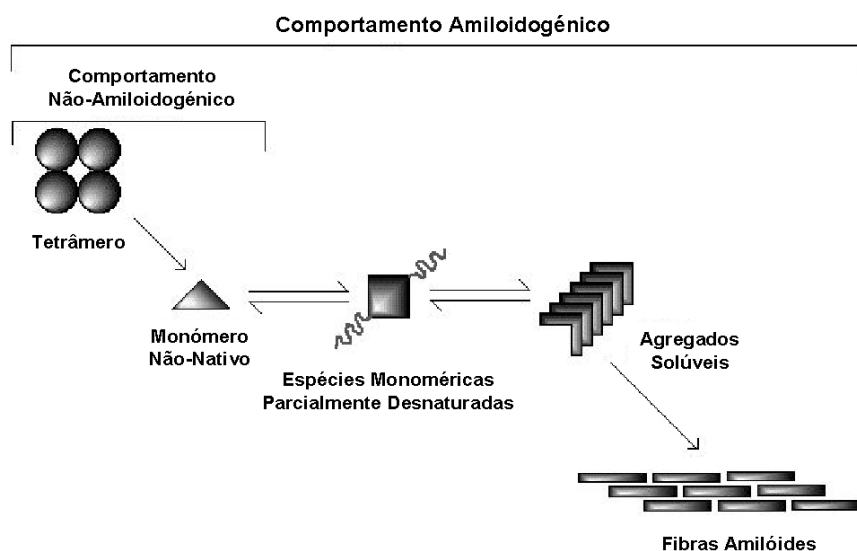
**Figura 1.6: Modelo proposto para a formação de fibras amilóides de TTR com base no tetrâmero.** A cadeia- $\beta$  D é instável e sofre uma alteração conformacional que gera um estado amiloidogénico da TTR (I). Esta conformação amiloidogénica associa-se a outras moléculas de TTR (II e III) formando um triplete (IV). O triplete pode crescer e formar um protofilamento (VII) ou associar-se a outros tripletos (V) e formar a fibra amilóide (VI) (Eneqvist *et al.*, 2000).

Olofsson *et al.* (2001) consideram que é o dímero da TTR a espécie responsável pela formação de amilóide na TTR. Após a desnaturação do tetrâmero, a TTR renatura para formar o tetrâmero nativo mas, dependendo da concentração e da introdução de mutações pontuais, um caminho que gera espécies diméricas é facilitado e capaz de gerar fibras amilóides (Figura 1.7) (Olofsson *et al.*, 2001).



**Figura 1.7: Modelo proposto para a formação de fibras amilóides de TTR com base no dímero.** Após a desnaturação, ocorre renaturação da TTR para formar o tetrâmero nativo, mas dependendo da concentração e da introdução de mutações pontuais, um caminho que gera espécies diméricas é facilitado, gerando fibras amilóides (Olofsson *et al.*, 2001).

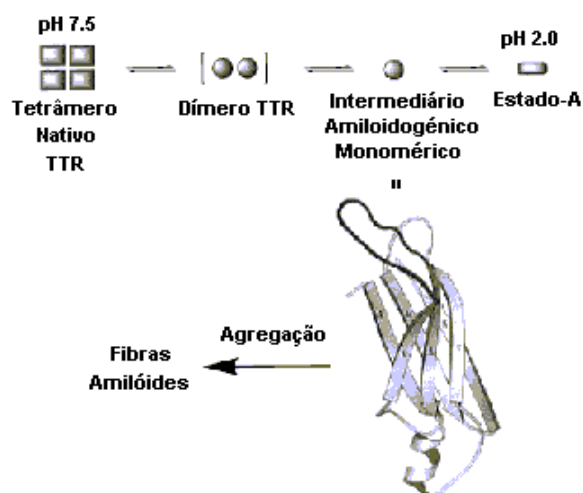
Existem vários autores que consideram que é a espécie monomérica a envolvida na fase inicial de agregação da TTR. Um desses mecanismos foi proposto por Quintas *et al.* (2001) que observaram que o tetrâmero da TTR se dissocia em espécies monoméricas não-nativas em condições próximas das fisiológicas. Estas espécies monoméricas parcialmente desnaturadas de baixa estabilidade conformacional conduzem à formação de agregados e, posteriormente, de fibras maduras (Figura 1.8). Estes autores referem também que a produção de espécies monoméricas não-nativas parcialmente desnaturadas, a partir de variantes amiloidogénicas e não-amiloidogénicas, é dependente da estabilidade conformacional dos monómeros de TTR e directamente responsável pelo potencial amiloidogénico de cada variante (Quintas *et al.*, 1997, 1999, 2001).



**Figura 1.8: Modelo proposto para a formação de fibras amilóides da TTR em condições fisiológicas.** A 37 °C e pH 7,0, o tetrâmero de TTR pode dissociar para um estado monomérico não-nativo. A unidade monomérica, dependendo da sua estabilidade conformacional, pode sofrer desnaturação parcial que conduz à formação de agregados e de fibras amilóides (Quintas *et al.*, 2001).

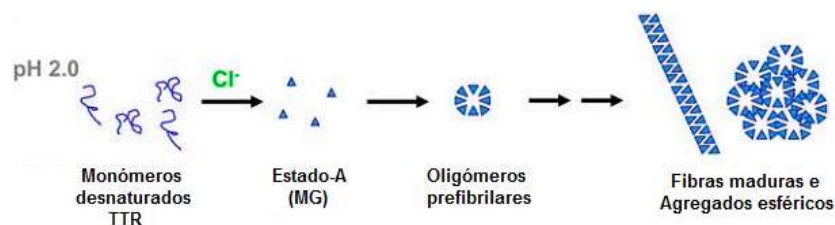
Outro modelo que propõe a existência de um intermediário monomérico amiloidogénico, no caminho de formação de amilóide é o proposto por Lai *et al.* (1996). A pH inferior a 5,0, o tetrâmero de TTR dissocia em unidades monoméricas parcialmente desnaturadas, originando um intermediário monomérico com tendência para agregar (Figura 1.9). Este intermediário encontra-se maioritariamente na estrutura nativa, excepto na zona das cadeias- $\beta$  C e D. Por acidificação adicional, a pH inferior a 3,0, o intermediário monomérico amiloidogénico adopta uma conformação alternativa não-amiloidogénica (*molten globule* ou estado-A), com uma estrutura

terciária não-nativa, sendo incapaz de formar fibras amilóides (Figura 1.9) (Colon e Kelly, 1992; Lai *et al.*, 1996).



**Figura 1.9: Modelo proposto para a formação de fibras amilóides de TTR em condições ácidas.** A pH inferior a 5,0 dá-se a dissociação da TTR tetramérica em intermediários monoméricos amiloidogénicos que, por agregação, formam fibras amilóides. A pH 2,0 o intermediário amiloidogénico monomérico adopta uma conformação não-amiloidogénica (Lai *et al.*, 1996).

Lindgren e os seus colaboradores, em 2005, propuseram outro modelo tendo por base o modelo proposto por Lai *et al* (1996). Após diálise prolongada a uma amostra de TTR a pH 2,0, o tetrâmero dissocia-se em monómeros desnaturados. Ao adicionarem NaCl 100 mM aos monómeros desnaturados, verificaram uma mudança conformacional destes monómeros para o estado-A ou *molten globule* (MG). Segundo estes autores, estes monómeros apresentam uma conformação parcialmente desnaturada do tipo glóbulo fundido compacto com capacidade para agregar ao longo do tempo. Inicialmente, formam-se oligómeros prefibrilares e posteriormente agregados esféricos e fibras maduras (Figura 1.10) (Lindgren *et al.*, 2005; Lindgren e Hammarström, 2010).



**Figura 1.10: Modelo proposto para a formação de fibras amilóides de TTR a pH 2,0 e NaCl 100 mM.** A pH ácido, dá-se a dissociação e desnaturação da TTR tetramérica em monómeros. Após a adição de NaCl, os monómeros desnaturados mudam de conformação para monómeros parcialmente desnaturados e mais compactos (*Molten Globule* (MG) ou estado-A) que, por agregação, formam fibras amilóides e agregados esféricos (Lindgren *et al.*, 2005).

### 1.2.5 Toxicidade na Transtirretina

Estudos realizados em linhas celulares de neuroblastoma humano demonstraram que as fibras amilóides maduras de TTR não são tóxicas para as células (Sousa *et al.*, 2001; Andersson *et al.*, 2002; Sörgjerd *et al.*, 2008). Por outro lado, espécies monoméricas e oligoméricas são as espécies mais tóxicas provocando danos celulares (Sousa *et al.*, 2001; Reixach, *et al.*, 2004; Sörgjerd *et al.*, 2008).

Sousa e seus colaboradores mostraram também que a deposição de pequenos agregados tóxicos não-fibrilares da TTR originados no início do processo de agregação, ocorre localmente em tecidos nervosos muitos anos antes da formação de amilóide e da degeneração do sistema nervoso periférico. Indivíduos com estas espécies tóxicas não-fibrilares depositadas extracelularmente são assintomáticos, ou seja, não apresentam nem são detectados nenhuns sintomas da PAF (Sousa *et al.*, 2001).

### 1.2.6 Estruturas Fibrilares na Transtirretina

Como foi referido na Secção 1.2.4, tudo indica que são os monómeros as espécies intervenientes na fase inicial do processo de agregação da TTR. Estes resultados estão de acordo com padrões de difracção de raios-X para fibras de amilóide da TTR que sugerem que a unidade estrutural da fibra é composta por um par de folhas- $\beta$ . Esta unidade estrutural revela um padrão bastante idêntico ao do monómero da TTR (Blake *et al.*, 1974, 1978). As dimensões da estrutura tridimensional do monómero de TTR mostram que as faces do monómero apresentam tamanhos de aproximadamente 29 Å e o arranjo tridimensional das subunidades nos protofilamentos (unidades elementares das fibras) produz um padrão repetitivo em cada 29 Å. Deste modo, o padrão repetitivo e a concordância das dimensões do monómero, parecem indicar que as protofibras se formam pela adição de monómeros sucessivos. Adicionalmente, os protofilamentos associam-se lateralmente em módulos de quatro, constituindo as fibras amilóides encontradas na PAF (Inouye *et al.*, 1998).

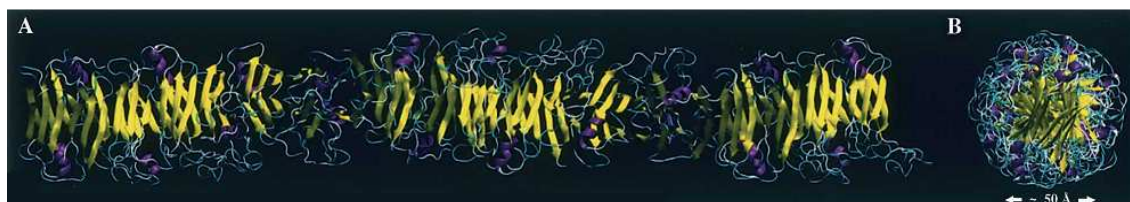
Outros resultados obtidos por raios-X sugeriram que o arranjo helicoidal, verificado em protofilamentos de TTR, apresenta um padrão repetitivo em cada 24 cadeias- $\beta$ . Este arranjo helicoidal gera-se quando a 24ª cadeia- $\beta$  do protofilamento atinge uma rotação de 360° relativamente à primeira cadeia- $\beta$ . Tendo em conta que são 24 as cadeias- $\beta$  que constituem um *twist* helical, de 115 Å de comprimento,



implica que cada cadeia- $\beta$  está rodada cerca de  $15^\circ$  relativamente à cadeia imediatamente anterior (Blake e Serpell, 1996).

Estudos por Microscopia Electrónica revelaram que a fibra de TTR com quatro protofilamentos apresenta um diâmetro de aproximadamente 110 a 130 Å, sendo o diâmetro de cada um dos protofilamentos constituintes entre 40 e 50 Å (Serpell *et al.*, 1995).

Por modelação molecular, também foi construído um modelo de um protofilamento de TTR, como apresentado na Figura 1.11 (Correia *et al.*, 2006). O protofilamento modelo apresenta folhas- $\beta$  formadas por cadeias- $\beta$  orientadas perpendicularmente ao eixo maior do protofilamento. A torção destas cadeias- $\beta$  faz com que as folhas- $\beta$  adquiram um arranjo helicoidal. Outra semelhança deste modelo com os protofilamentos amilóides da TTR é que apresenta um diâmetro de aproximadamente 50 Å.



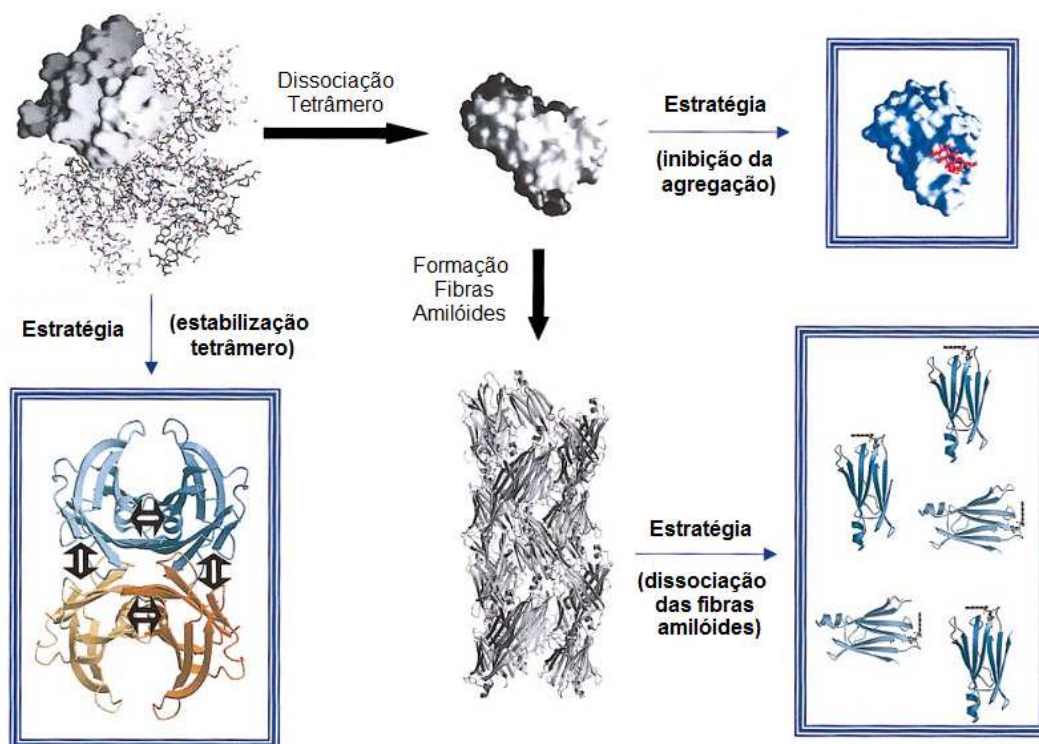
**Figura 1.11: Representação esquemática de um protofilamento modelo de TTR.** O protofilamento é formado por duas folhas- $\beta$  contínuas com as cadeias- $\beta$  perpendiculares ao eixo principal do protofilamento. (A) Secção longitudinal e (B) secção transversal do protofilamento (Correia *et al.*, 2006).

## 1.2.7 Estratégias Terapêuticas

Nenhuma das amiloidoses conhecidas até à data tem cura ou tratamento. Os mecanismos de desenvolvimento destas patologias também ainda não foram totalmente esclarecidos, apesar de diversas hipóteses já terem sido formuladas. No caso particular da TTR, o tratamento pode ser dirigido no sentido de inibir a síntese de TTR mutada, estabilizar o tetrâmero nativo inibindo a sua dissociação, prevenir a formação de intermediários amiloidogénicos, inibir a agregação de intermediários amiloidogénicos ou promover a ruptura das fibras amilóides (Figura 1.12) (Damas e Saraiva, 2000; Saraiva, 2002; Mason *et al.*, 2003).

Actualmente, o transplante hepático continua a ser a única terapia viável para a atenuação dos sintomas da PAF (Benson e Kincaid, 2007; Barreiros *et al.*, 2010), uma

vez que a TTR é produzida essencialmente no fígado (Felding e Fex, 1982). Esta estratégia tem como objectivo corrigir a deficiência através da eliminação da síntese da TTR mutada. Após o transplante, a regressão da PAF a nível dos nervos periféricos é reduzida, observando-se regressão dos depósitos amilóides após um ou dois anos (Holmgren *et al.*, 1991, 1993). Com esta estratégia podem-se obter melhorias em vários aspectos, como a função autónoma, estado nutricional e mesmo o bem-estar geral do paciente, embora a neuropatia periférica pareça recuperar muito lentamente (Holmgren *et al.*, 1993). No entanto, verificou-se que este tratamento é mais eficiente em doentes com a mutação TTR-V30M do que em doentes com outras mutações de TTR. Por exemplo, em muitos destes doentes verificou-se o progresso da CAF (Stangou *et al.*, 1998; Stangou e Hawkins, 2004). Foi sugerido que a aceleração da CAF depende da adição de TTR-WT ao depósito de amilóide já existente (Yazaki *et al.*, 2000, 2006).



**Figura 1.12: Resumo das diferentes etapas do mecanismo de agregação de TTR e estratégias terapêuticas propostas.** Possível via para a agregação da Transtirretina (estruturas a cor cinzenta). Para cada etapa é proposta uma estratégia terapêutica (caixas azuis) (Damas e Saraiva, 2000).

O primeiro transplante hepático relacionado com a PAF foi realizado na Suécia em 1990 (Holmgren *et al.*, 1991). De acordo com *The Familial Amyloidotic Polyneuropathy World Transplant Registry* (<http://www.fapwtr.org>) são feitos

anualmente cerca de 110 transplantes, sendo Portugal o país com maior taxa de transplantes em pacientes com PAF a nível mundial. Contudo, a escassez de órgãos e o custo humano e financeiro de um procedimento tão invasivo como o transplante hepático, leva a que se procure outras terapias para a cura da paramiloidose.

A prevenção da formação de intermediários amiloidogénicos é outra estratégia terapêutica em estudo, uma vez que estes são altamente tóxicos. O objectivo desta terapia é tentar estabilizar a estrutura tetramérica nativa da TTR de modo a impedir a sua dissociação (Figura 1.12). A tiroxina, um dos ligandos naturais da TTR, estabiliza fortemente a TTR na sua forma tetramérica. A investigação é assim baseada na procura de pequenas moléculas que liguem ao canal hidrofóbico central do tetrâmero da TTR, o local de ligação da hormona tiroxina (Peterson *et al.*, 1998; Hammarström *et al.*, 2002). Foram testados NSAIDs (Drogas Anti-Inflamatórias Não Esteróides) neste sentido pois ligam-se à TTR no local de ligação da T<sub>4</sub>. Ácido flufenâmico (derivado do ácido fenâmico), diflunisal (derivado do ácido acetilsalicílico) e diclofenaco são exemplos de alguns NSAIDs testados e capazes de prevenir a dissociação e mudanças conformacionais da TTR que levam à agregação. No entanto, estes NSAIDs ligam-se também a outras proteínas no plasma (Sacchetti e Kelly, 2002; Miller *et al.*, 2004), comprometendo o seu uso terapêutico. Contudo, derivados destes compostos têm-se revelado mais promissores, embora ainda sejam alvo de muito estudo actualmente (Connelly *et al.*, 2010).

Outra estratégia para o tratamento das amiloidoses é a prevenção da associação de espécies amiloidogénicas (Figura 1.12). As fibras amilóides de TTR resultam da associação de espécies intermediárias que consistem em monómeros com estrutura alterada (Quintas *et al.*, 2001; Lindgren *et al.*, 2005). O bloqueio dos locais de interacção pode inviabilizar a associação das unidades amiloidogénicas em estruturas fibrilares. Actualmente, começam a ser conhecidas as interfaces envolvidas na formação de fibras, contudo, ainda não se assistiu a grandes avanços no sentido do desenvolvimento desta estratégia.

Uma outra estratégia é a desagregação das fibras amilóides (Figura 1.12). O IDOX (4'-desoxi-4'-iododoxorubicina) é um composto que degrada as estruturas fibrilares num material amorfo e solúvel (Sebastião *et al.*, 2000; Palha *et al.*, 2000). No entanto, nos testes clínicos efectuados com IDOX nem todos os doentes responderam positivamente a esta droga (Merlini *et al.*, 1995). A dexiciclina é um composto que também degrada as fibras amilóides (Cardoso *et al.*, 2003). Apesar desta droga já ter sido testada num modelo animal em que se verificou a degradação de fibras amilóides em espécies não-tóxicas (Cardoso e Saraiva, 2006), a dexiciclina afecta muitas

funções celulares nos mamíferos como a proliferação, migração e apoptose (Bendeck *et al.*, 2002).

Recentemente, pela primeira vez um medicamento demonstrou ser eficaz a travar a evolução da PAF, durante ensaios clínicos. Estes ensaios foram realizados durante 18 meses a 128 pacientes portadores da mutação V30M, a maioria portugueses. Os resultados destes ensaios clínicos revelaram que, em 60% dos casos, a substância FX-1006A, mais conhecida por tafamidis, desacelerou substancialmente a progressão da doença. Face a estes ensaios e a estes resultados clínicos, é a primeira vez que uma terapêutica farmacológica inverte o curso da PAF (Ratner, 2009).



## Capítulo 2

# Materiais, Métodos e Procedimento Experimental



## 2.1 Materiais

A proteína transtirretina normal (TTR-WT) foi produzida no Laboratório de Biotecnologia Molecular no Biocant, Centro de Inovação em Biotecnologia, Cantanhede, num sistema de expressão em *Escherichia coli*, sendo posteriormente purificada no nosso laboratório.

Nos ensaios de agregação, ácido clorídrico (HCl) a 37% utilizado nas soluções aquosas a pH 2,0 foi adquirido à Merck & Company e cloreto de sódio (NaCl) foi adquirido à Sigma-Aldrich Company. O reagente azida de sódio usado nestas soluções para prevenir o crescimento de microorganismos foi adquirido à Fluka.

A sonda fluorescente Tioflavina-T, utilizada para a detecção de fibras amilóides, foi adquirida à Sigma-Aldrich Company, bem como glicina utilizada para a solução tampão a pH 9,0. NaOH, usado para efectuar o acerto de pH a 9,0, foi adquirido à Fluka.





## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Dicroísmo Circular

O dicroísmo circular (CD) é uma técnica espectroscópica particularmente útil para o estudo de moléculas quirais e macromoléculas, sobretudo proteínas. A caracterização de alterações estruturais de uma proteína e, especialmente, a determinação da sua estrutura secundária, podem ser examinadas através desta técnica relativamente simples e rápida (Bulheller *et al.*, 2007).

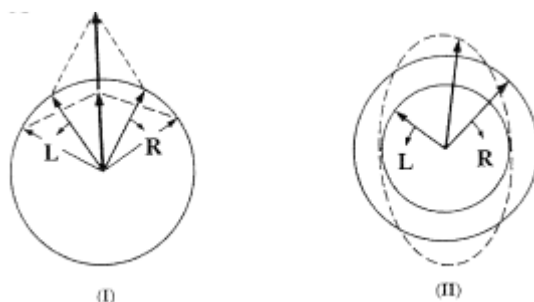
Para se compreender e perceber de uma forma mais clara e pormenorizada os fundamentos desta técnica, é aconselhável evidenciar, primeiramente, algumas características da radiação electromagnética. É sabido que a radiação electromagnética é caracterizada pela propagação, no tempo e no espaço, de duas ondas perpendiculares uma à outra (uma das ondas corresponde à oscilação de um campo eléctrico e a outra corresponde à oscilação de um campo magnético), com uma diferença de fase de  $0^\circ$ . Estas ondas transportam a mesma quantidade de energia e oscilam em planos perpendiculares à direcção de propagação. Uma característica relacionada com o comportamento destes campos é a sua polarização. Por definição, a polarização de uma onda electromagnética é o plano no qual oscila a componente eléctrica desta onda. A radiação diz-se linearmente polarizada quando a oscilação dos campos se dá apenas num determinado plano (a projecção do vector que descreve o campo eléctrico (e magnético) é uma linha). No entanto, a combinação de duas ondas linearmente polarizadas, uma vertical e outra horizontal, com a mesma magnitude, mas com uma diferença de fase de  $90^\circ$ , resulta numa onda circularmente polarizada que pode rodar quer para a direita (sentido horário - R), quer para a esquerda (sentido anti-horário - L) (Bulheller *et al.*, 2007).

A espectroscopia de dicroísmo circular baseia-se na absorção diferencial das componentes circularmente polarizadas para a esquerda e para a direita (Equação 2.1) de radiação polarizada.

$$\Delta A = A_L - A_R \quad (2.1)$$

Se, após a passagem da radiação circularmente polarizada na amostra, as componentes L e R não forem absorvidas ou forem absorvidas na mesma extensão, a sua posterior recombinação irá gerar radiação polarizada no plano (Figura 2.1 (I)).

Mas, se uma das componentes for absorvida em maior extensão que a outra, a radiação resultante vai ser elípticamente polarizada (Figura 2.1 (II)).



**Figura 2.1: A origem do dicroísmo circular.** (I) Se as componentes da radiação circularmente polarizada para a esquerda (L) e para a direita (R) têm a mesma amplitude, quando combinadas geram radiação polarizada no plano. (II) Se as duas componentes têm magnitudes diferentes quando combinadas resultam em luz polarizada elípticamente, representada pela linha a tracejado (Kelly *et al.*, 2005).

Quando  $A_L - A_R$  é medida pelo espectropolarímetro,  $\Delta\varepsilon$  é calculada segundo a Lei de Beer-Lambert (Equação 2.2):

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R = \frac{A_L - A_R}{c \times l} \quad (2.2)$$

onde  $c$  é a concentração em mol/L e  $l$  é o percurso óptico medido em cm. As unidades de  $\Delta\varepsilon$  são  $L \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (Schmid, 1997). No entanto, em regra os instrumentos estão calibrados em termos de elipticidade e a relação da elipticidade observada,  $\theta_{\text{obs}}$ , em graus ou miligráus, com  $\Delta A$  é a seguinte (Equação 2.3):

$$\theta_{\text{obs}} = 32.98 \Delta A \quad (2.3)$$

A fim de normalizar os efeitos da concentração e percurso óptico, a elipticidade molar,  $[\theta]$ , é definida segundo a Equação 2.4 (Woody, 1995):

$$[\theta] = \frac{\theta_{\text{obs}} \times 100}{c \times l} = 3298 \Delta\varepsilon \quad (2.4)$$

Para uma determinada proteína, a partir da medição prévia de  $\theta_{\text{obs}}$ , a elipticidade molar ou a elipticidade do resíduo médio,  $[\theta]_{\text{ERM}}$ , podem ser calculadas através das seguintes equações:

$$[\theta] = \frac{\theta_{\text{obs}} \times 100 \times \text{MM}}{c \times l} \quad (2.5)$$

$$[\theta]_{\text{ERM}} = \frac{\theta_{\text{obs}} \times 100 \times \text{MM}}{c \times l \times n_A} \quad (2.6)$$

onde  $c$  é a concentração da proteína em mg/mL,  $l$  é o percurso óptico em cm, MM é a massa molecular da proteína e  $n_A$  é o número de aminoácidos por proteína. As unidades de  $[\theta]$  e  $[\theta]_{\text{ERM}}$  são  $\text{graus.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$  (Schmid, 1997).

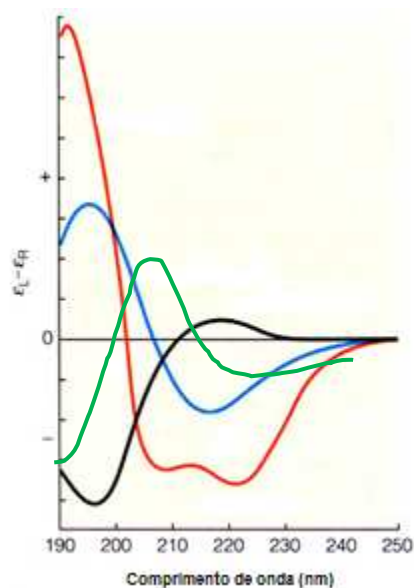
O sinal de CD é observado na presença de um cromóforo assimétrico ou opticamente activo. Esse cromóforo pode ser quiral por qualquer uma das seguintes razões: a) se contém um ou mais centros quirais, b) se está covalentemente ligado a um centro quiral, ou c) se está colocado num ambiente assimétrico (Kelly *et al.*, 2005).

Em proteínas, os cromóforos de interesse são a ligação peptídica (absorção abaixo dos 240 nm), as cadeias laterais de resíduos de aminoácidos aromáticos como: fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) e triptofano (Trp) (absorção na gama dos 260 aos 320 nm) e as ligações de dissulfeto (fraca absorção por volta dos 260 nm) (Kelly *et al.*, 2005). Desta forma, as bandas de CD para as proteínas ocorrem em duas regiões espectrais. A região do UV-longínquo (180–250 nm) que é dominada pelas contribuições das ligações peptídicas e a região do UV-próximo (250–320 nm) que é originada principalmente pelas contribuições dos aminoácidos aromáticos. As duas regiões espectrais dão informações diferentes relativamente à estrutura da proteína (Schmid, 1997).

### 2.2.1.1 Dicroísmo Circular no UV-Longínquo

O sinal de CD no UV-longínquo fornece informação quantitativa sobre o conteúdo de estrutura secundária em proteínas. Os elementos de estrutura secundária, hélice- $\alpha$ , folha- $\beta$ , volta- $\beta$  e estrutura ao acaso, têm espectros de CD característicos e bem definidos, como se pode ver na Figura 2.2.

O espectro característico da hélice- $\alpha$  (Figura 2.2) é devido a transições electrónicas que ocorrem na amida da ligação peptídica, ou seja, a banda intensa e positiva a 190 nm e a banda negativa a 208 nm são resultantes da transição  $\pi \rightarrow \pi^*$ , enquanto que a outra banda negativa localizada a 222 nm surge a partir de uma transição  $n \rightarrow \pi^*$  (Bulheller *et al.*, 2007).



**Figura 2.2: Espectros típicos de CD na zona do UV-longínquo.** O espectro típico de uma hélice- $\alpha$  está representado a vermelho, o de uma folha- $\beta$  a azul, o de uma volta- $\beta$  a verde e o da estrutura ao acaso a preto.

Comparando o espectro de hélice- $\alpha$  com o da folha- $\beta$  na Figura 2.2, verifica-se que o da folha- $\beta$  é menos intenso. O espectro de CD da folha- $\beta$  é característico por apresentar uma banda negativa à volta dos 217 nm devida a uma transição  $n \rightarrow \pi^*$  e uma banda positiva perto dos 195 nm causada por uma transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  (Nakanishi *et al.*, 1994).

Proteínas que possuem estrutura desordenada têm um espectro de CD com uma banda negativa intensa próxima dos 195-200 nm originada por uma transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  e uma banda fraca positiva causada por uma transição  $n \rightarrow \pi^*$  (Nakanishi *et al.*, 1994) (Figura 2.2).

As voltas- $\beta$  apresentam espectros de CD muito variáveis, pois são encontrados muitos tipos desta estrutura em proteínas, mas usualmente apresentam uma banda positiva perto dos 205 nm e uma banda negativa na zona dos 190 nm (Figura 2.2).

Os espectros de CD obtidos no ultravioleta longínquo podem ser utilizados para determinar as quantidades relativas dos diferentes elementos de estrutura secundária de uma proteína. Existem vários procedimentos para realizar este tipo de análise baseados na aproximação de que um espectro de dicroísmo circular no UV-longínquo pode ser representado como uma combinação linear das contribuições dos diferentes elementos de estrutura secundária de acordo com a Equação 2.7 (Johnson, 1985; Yang *et al.*, 1986).

$$[\theta(\lambda)]_{\text{ERM}} = f_{\alpha} \times [\theta_{\alpha}(\lambda)] + f_{\beta} \times [\theta_{\beta}(\lambda)] + f_t \times [\theta_t(\lambda)] + f_n \times [\theta_n(\lambda)] \quad (2.7)$$

onde  $[\theta_{\alpha}(\lambda)]$ ,  $[\theta_{\beta}(\lambda)]$ ,  $[\theta_t(\lambda)]$  e  $[\theta_n(\lambda)]$  são os espectros base para hélice- $\alpha$ , folha- $\beta$ , volta- $\beta$  e estruturas não-regulares, e  $f_{\alpha}$ ,  $f_{\beta}$ ,  $f_t$  e  $f_n$  são as respectivas fracções destes elementos estruturais na proteína em análise.

Dicroísmo circular no UV-longínquo é uma técnica ideal para monitorizar alterações conformacionais em proteínas que podem ocorrer em função de mudanças nas condições experimentais como pH, temperatura e ligação de ligandos (Kelly e Price, 2000).

### 2.2.1.2 Dicroísmo Circular no UV-Próximo

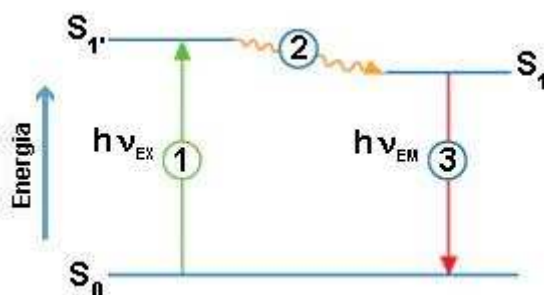
O sinal de CD no UV-próximo é observado quando, numa proteína nativa, as cadeias laterais dos aminoácidos aromáticos estão num ambiente assimétrico. Cada aminoácido tende a ter um perfil característico nesta região. O triptofano apresenta um pico entre os 290 nm e os 305 nm, a tirosina entre os 275 nm e os 282 nm e a fenilalanina entre os 255 e os 270 nm (Kelly *et al.*, 2005). As ligações de dissulfeto, apesar de fracamente, também contribuem para o espectro de CD no UV-próximo aproximadamente aos 260 nm, embora por vezes haja sobreposição das bandas com os aminoácidos aromáticos (Kelly e Price, 2000). Contudo, o sinal de CD destes resíduos de aminoácidos e das ligações dissulfeto é muito fraco na ausência de estrutura ordenada (Schmid, 1997). Os espectros de CD nesta região do UV dependem de alguns factores, tais como o número de cada um dos aminoácidos aromáticos presentes, a sua mobilidade, a natureza do seu ambiente e a sua disposição espacial na proteína (Kelly *et al.*, 2005).

Esta técnica espectroscópica pode dar uma visão global de alterações estruturais na proteína (Schmid, 1997) e, particularmente, da presença de estados parcialmente desnaturados ou estados *molten globule* (intermediários compactos) (Kelly *et al.*, 2005). É também muito utilizada para estudar processos de *folding* (dobragem/enrolamento) e *unfolding* (desenrolamento) de proteínas, bem como a sua estabilidade.

## 2.2.2 Fluorescência

Actualmente, a espectroscopia de fluorescência é uma das espectroscopias mais utilizada nas áreas da Bioquímica e da Biofísica. Embora não forneça informação estrutural de uma forma detalhada, esta técnica apresenta uma grande sensibilidade às mudanças estruturais e às propriedades dinâmicas das biomoléculas (Royer, 1995).

A fluorescência é um método de análise espectroquímico no qual as moléculas são excitadas pela absorção da radiação electromagnética a um determinado comprimento de onda e emitem radiação em comprimentos de onda maiores. Como representado na Figura 2.3, o diagrama de Jablonski mostra que quando uma molécula é excitada, o estado electrónico da molécula altera-se do estado electrónico fundamental para um dos vários níveis vibracionais num dos estados electrónicos excitados. Normalmente, o estado electrónico excitado é o primeiro estado excitado singlete  $S_1$  (Lakowicz, 1983).



**Figura 2.3: Diagrama de Jablonski simplificado.** Representação esquemática dos processos: (1) absorção ou excitação de electrões do estado fundamental ( $S_0$ ) para um estado excitado de maior energia; (2) relaxação, devido às vibrações e movimentos moleculares, onde há transição de electrões de um estado electrónico singlete excitado de maior energia ( $S_1'$ ) para um de menor energia ( $S_1$ ), sem emissão de radiação e (3) fluorescência ou emissão de fótons acompanhando a transição de electrões de um estado electrónico singlete excitado de menor energia para o estado fundamental.  $h\nu_{EX}$  representa a energia absorvida pelo sistema e  $h\nu_{EM}$  representa a emissão de fluorescência.

Contudo, a energia da luz emitida é menor do que a absorvida, apesar de que tanto a absorção da radiação como a emissão de fluorescência resultarem de transições entre um estado electrónico excitado e o estado fundamental. A explicação para esta diferença de energias é que ao ocorrer absorção, a molécula parte de um arranjo de equilíbrio adequado ao estado electrónico fundamental. Quando passa a um estado electrónico excitado, a molécula vai-se rearranjar ou sofrer uma relaxação, para uma outra geometria mais adequada a esse estado excitado (Figura 2.3). Um

pouco de energia é perdida nessa relaxação, bem como através de transições vibracionais, de modo que no momento da emissão a diferença de energia entre o estado excitado e o fundamental é menor que aquela existente no momento da absorção (Schmid, 1997; Ito, 2004).

Como referido anteriormente, a fluorescência é apropriada para analisar alterações conformacionais, nomeadamente em proteínas. A fluorescência intrínseca das proteínas é devida à presença de 3 resíduos de aminoácidos aromáticos que absorvem luz ultra-violeta: a fenilalanina (Phe), a tirosina (Tyr) e o triptofano (Trp). Em proteínas que contenham os 3 aminoácidos, a fluorescência é dominada pela contribuição dos triptofanos porque, quer a absorvância no comprimento de onda de excitação, quer o rendimento quântico de emissão, são consideravelmente superiores comparados com os respectivos valores para a tirosina e, principalmente, para a fenilalanina, como se pode ver na Tabela 2.1 (Schmid, 1997).

**Tabela 2.1: Propriedades de absorvância e fluorescência dos aminoácidos aromáticos em solução aquosa a pH neutro.** Os comprimentos de onda máximos de absorção e de emissão estão indicados devidamente como  $\lambda_{\text{máx}}$ , o coeficiente de absorção molar está indicado como  $\epsilon_{\text{máx}}$  e  $\phi_{\text{máx}}$  indica o rendimento quântico de fluorescência que corresponde à razão entre o número de fótons emitidos por fluorescência e o número de fótons absorvidos (Schmid, 1997).

Aminoácido	Absorvância		Fluorescência	
	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\epsilon_{\text{máx}}$ ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\phi_{\text{máx}}$
Triptofano	280	5600	355	0,13
Tirosina	275	1400	304	0,14
Fenilalanina	258	200	282	0,02

A banda de absorção observada em proteínas a aproximadamente 280 nm é devida aos resíduos de tirosina e de triptofano simultaneamente, embora a absorção do triptofano seja 4 vezes superior relativamente à tirosina. Por outro lado, neste comprimento de onda, a fenilalanina emite fluorescência (Tabela 2.1). Para comprimentos de onda maiores que 295 nm, a absorção é devida maioritariamente ao triptofano. Assim, para observar a fluorescência do triptofano pode fazer-se excitação selectiva entre os 295 e os 305 nm (Lakowicz, 1983). Portanto, se se observar a emissão após excitação a ambos os comprimentos de onda, 280 nm e 295 nm, pode obter-se informação da contribuição dos resíduos de tirosina e de triptofano para a fluorescência de uma proteína nativa. A dificuldade na detecção da fluorescência da



fenilalanina em proteínas nativas é devida aos valores baixos de rendimento quântico e de coeficiente de absorção molar (Tabela 2.1).

A emissão de fluorescência dos resíduos de tirosina é detectável na ausência de triptofano e a fluorescência de fenilalanina na ausência de tirosina e triptofano (Schmid, 1997). Portanto, a emissão de fluorescência em proteínas é maioritariamente devida à exposição média dos seus resíduos de triptofano à fase aquosa (Lakowicz, 1983; Schmid, 1997). A cadeia lateral do triptofano é formada por um grupo indol, o fluoróforo responsável pela absorção na proximidade de 280 nm e emissão de radiação na gama de 340 a 355 nm, em função do ambiente químico que o rodeia. Quando uma proteína que contenha os 3 aminoácidos aromáticos (Trp, Tyr e Phe) se encontra no estado desnaturado, a proteína apresenta um espectro de emissão similar ao de N-acetil-L-triptofano amida (NATA) em água, com um máximo a 355 nm, aproximadamente (Royer, 1995). Por outro lado, num ambiente hidrofóbico, como no interior de uma proteína nativa em que os resíduos aromáticos se encontram parcialmente acessíveis ao solvente, a emissão do triptofano ocorre para comprimentos de onda inferiores a 355 nm. Ao contrário da fenilalanina e da tirosina, o triptofano é altamente sensível à polaridade do solvente. Ou seja, para proteínas que contenham triptofanos é possível seguir desvios no comprimento de onda e variações na intensidade de fluorescência, que acompanham alterações conformacionais, como seja por exemplo, a desnaturação (Schmid, 1997). A magnitude do desvio para comprimentos de onda maiores observado em espectros de fluorescência de uma proteína desnaturada relativamente ao espectro de fluorescência de uma proteína nativa, depende da extensão a que o triptofano está escondido na proteína nativa e exposto na desnaturada.

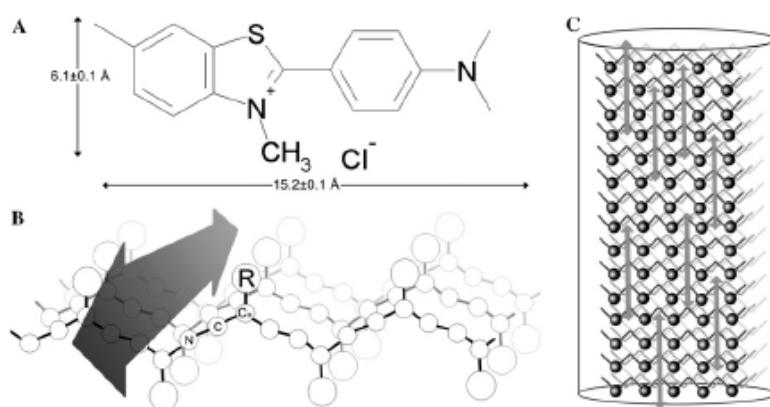
A detecção de fluorescência, comparativamente com a medição de absorção, é um método mais adequado ao estudo de alterações conformacionais das proteínas, uma vez que é extremamente sensível às alterações do ambiente em que os cromóforos se encontram. Alguns dos factores externos que provocam variação da fluorescência são: a viscosidade do solvente, a temperatura e o pH.

### **2.2.2.1 Ensaio com Tioflavina-T**

A Tioflavina-T (Th-T), representada na Figura 2.4 A, é uma sonda fluorescente bastante utilizada como método de detecção de fibras amilóides em solução (Naiki *et al.*, 1989; LeVine III, 1993) e de fácil utilização. Na presença de fibras

amilóides, a Th-T quando excitada a um comprimento de onda de 450 nm, apresenta um máximo de emissão a 482 nm. Por outro lado, quando livre em solução, apresenta um máximo de excitação a 385 nm e um máximo de emissão a 445 nm (LeVine III, 1993). No entanto, sabe-se pouco acerca do mecanismo de interação da sonda com fibras amilóides. Os autores Naiki *et al.* (1989) referem apenas a existência de ligação específica da Th-T às fibras amilóides. Um trabalho recente de Krebs *et al.* (2005) propõe um mecanismo de ligação da Th-T às fibras em que as moléculas de Th-T estão orientadas paralelamente ao eixo da fibra amilóide (Figura 2.2 C).

Uma das características das cadeias  $\beta$  é terem as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos orientadas alternadamente para um e outro lado da folha- $\beta$ . Este arranjo é mantido ao longo das folhas- $\beta$  paralelas e anti-paralelas. Na estrutura fibrilar, as cadeias laterais das diferentes faces da folha- $\beta$ , formam canais com orientação paralela ao eixo principal da fibra amilóide e perpendicular às cadeias  $\beta$  (Figura 2.4 B e C) (Pauling e Corey, 1951; Salemme, 1983). A largura desses canais é estimada em cerca de 6,5 a 6,95 Å (Saleme, 1983). Estes valores sugerem que a Th-T se posiciona nesses canais com o seu eixo maior paralelo ao eixo das fibras, rodeada de muito perto por cadeias laterais (Krebs *et al.*, 2005). Assim, o aumento de fluorescência da Th-T observado na presença de fibras amilóides, não se deve à ligação regular de muitas moléculas de Th-T, mas sim à limitação do espaço físico disponível para a Th-T e consequente restrição da sua dinâmica molecular.



**Figura 2.4: Modelo da interação da Tioflavina-T com fibras amilóides.** (A) Estrutura da Th-T. A dimensão da molécula segundo o eixo perpendicular ao plano em que está representada é  $4,3 \pm 0,1$  Å. (B) Representação esquemática de uma folha  $\beta$  (Branden e Tooze, 1991). Estão indicados os átomos da cadeia principal (N, C, e C<sub>α</sub>) e a cadeia lateral R para um resíduo. O eixo principal da fibra é perpendicular às cadeias- $\beta$ . Um dos locais proposto para a ligação de Th-T às fibras encontra-se indicado pela seta dupla. (C) Representação de um protofilamento de amilóide com três folhas- $\beta$ . A Th-T está representada por setas (Krebs *et al.*, 2005).

Ainda em 2005, os autores Khurana *et al.*, sugeriram que as moléculas de Th-T formam micelas em solução aquosa e que estas, por sua vez, se ligam às fibras amilóides através de interações electrostáticas e ligações de hidrogénio (Kelényi, 1967). Estas micelas apresentam-se com um interior hidrofóbico e com azotos carregados positivamente orientados para o solvente. No entanto, estes autores afirmam que a Th-T não é específica apenas para estruturas em folha- $\beta$ , uma vez que também se liga a ácidos nucleicos.

Embora seja difícil definir quais os factores que influenciam a intensidade de fluorescência, o ensaio de Th-T é um ensaio de carácter qualitativo que apresenta resultados credíveis.

### **2.2.3 Cromatografia de Exclusão Molecular acoplada a um Detector Multiangular de Dispersão de Luz**

A cromatografia de exclusão molecular (SEC) é uma técnica que permite separar misturas de macromoléculas com base nos seus tamanhos moleculares e forma. Neste tipo de cromatografia, a fase estacionária é uma matriz polimérica sólida constituída por esferas porosas de diâmetro controlado, empacotadas numa coluna, que se distinguem pela gama de separação e pela estabilidade ao pH e temperatura. A fase móvel é um solvente de baixa viscosidade que passa através das esferas ao longo da coluna.

As amostras são aplicadas no topo da coluna e arrastadas através desta pela fase móvel. As diferentes proteínas vão sendo retardadas de maneira distinta, pelo que podem ser recolhidas separadamente à medida que são eluídas da coluna. As moléculas com tamanho superior ao diâmetro dos poros da matriz são excluídas primeiro, uma vez que não difundem pelos poros da matriz, mas sim entre as esferas da matriz. No caso de moléculas de tamanho inferior ao tamanho dos poros da matriz, estas difundem pelo interior dos poros das esferas da matriz, o que faz com que levem mais tempo a atravessar a coluna. Assim, o tempo de eluição da molécula varia de acordo com o seu tamanho e forma (Stellwagen, 1990). Portanto, as moléculas são caracterizadas pelo seu volume de eluição ( $V_e$ ) que é o volume de eluente necessário para que a molécula atravessasse a coluna. Assim, quanto maior a molécula, menor o seu volume de eluição. Partículas suficientemente grandes são completamente excluídas dos poros das esferas e eluem ao mesmo tempo no designado volume de exclusão ou

externo ( $V_0$ ) da coluna, independentemente dos seus tamanhos. O volume de exclusão determina-se usando, pelo menos, uma molécula de elevado peso molecular (Harding, 1997).

Para monitorizar a separação na SEC, um detector é colocado depois da coluna e o sinal registado num computador que traça o cromatograma respectivo. O acoplamento de uma bomba de alta precisão à coluna permite manter e controlar a velocidade de fluxo da fase móvel. A eluição de moléculas de proteína detecta-se geralmente pela absorção no ultra-violeta, a 280 nm, região onde absorvem as cadeias laterais dos aminoácidos aromáticos (Irvine, 2003).

Uma forma de determinar de forma absoluta as massas moleculares e tamanhos das macromoléculas eluídas na SEC, é acoplar um detector de dispersão de luz com múltiplos ângulos ao sistema de separação (SEC-MALLS). Este sistema fornece boas aproximações na determinação das massas moleculares médias e dos volumes médios de macromoléculas, como proteínas e polímeros sendo, por isso, usado na monitorização de processos de oligomerização e/ou agregação de moléculas em solução (Folta-Stogniew e Williams, 1999; Wyatt, 1993, 1997).

Na técnica de dispersão de luz estática (SLS) a radiação laser polarizada, a um determinado comprimento de onda ( $\lambda_0$ ), incide na amostra e a dispersão de luz é detectada através de um fotodetector. Em MALLS a dispersão da luz é medida por vários fotodetectores colocados em ângulos ( $\theta$ ) específicos, relativamente ao feixe incidente (van Dijk e Smit, 2000).

A quantidade de luz dispersa medida a cada ângulo é directamente proporcional à massa molecular (MM) e à concentração ( $c$ ) em g/mL da molécula em análise (Folta-Stogniew e Williams, 1999). Deste modo, a detecção por dispersão da luz torna-se mais sensível à medida que as massas moleculares aumentam. É por este motivo que a técnica SEC-MALLS é muito usada em ensaios que envolvam agregação em proteínas (Penzkofer *et al.*, 2007). A relação entre a dispersão de luz e a massa molecular é dada pela Equação 2.8:

$$\frac{K^*c}{R(\theta)} = \frac{1}{P(\theta)MM} + 2A_2c \quad (2.8)$$

onde  $R(\theta)$  é o excesso de intensidade da dispersão de Rayleigh comparada com a do solvente puro e que depende do ângulo de dispersão da luz, da distância da amostra ao detector, da intensidade de luz incidente e do volume da amostra irradiada;  $A_2$  é o segundo coeficiente virial que resulta da interacção solvente-soluto (normalmente, o

valor usado para proteínas é de  $10^{-5}$  mL.mol/g<sup>2</sup>);  $P(\theta)$  é o factor forma que descreve a dependência angular da dispersão da luz com o tamanho e conformação da molécula e  $K^*$  é uma constante experimental definida segundo a Equação 2.9:

$$K^* = \frac{4 \pi^2 n_0^2}{N_A \lambda_0^4} \left( \frac{dn}{dc} \right)^2 \quad (2.9)$$

onde  $n_0$  é o índice de refração do solvente,  $n$  é o índice de refração da solução,  $N_A$  é o número de Avogadro e  $dn/dc$  é o incremento do índice de refração com a concentração de soluto (normalmente compreendido entre 0,183 e 0,186 mL/g) (Wyatt, 1997; Folta-Stogniew e Williams, 1999; van Dijk e Smit, 2000).

A Equação 2.8 é válida para moléculas de dimensões máximas menores que  $\lambda_0$ , ou seja, com massas moleculares aproximadamente menores que  $50 \times 10^6$  g/mol (Harding, 1997). Para concentrações muito baixas de proteínas ( $< 0,1$  mg/mL), o termo  $A_2c$  é aproximadamente nulo, podendo assim ser desprezado (Folta-Stogniew e Williams, 1999).

Para moléculas maiores que  $\lambda_0/20$ ,  $P(\theta)$  pode ser simplificado como:

$$P(\theta) = 1 - \frac{16 \pi^2}{3 \lambda_0^2} R_g^2 \sin^2(\theta/2) \quad (2.10)$$

onde  $R_g$  é o raio de giração médio das moléculas que é uma forma de expressar a distribuição de massa no interior do volume da molécula tendo em conta o seu centro de massa e, portanto, directamente relacionado com a conformação molecular. Neste caso, quantos mais fotodetectores houver em múltiplos ângulos, mais precisa é a determinação média das massas moleculares e os respectivos raios de giração (Wyatt, 1997). Na Equação 2.10, para moléculas de grandes dimensões, mais termos de potências maiores são necessários (Wyatt, 1993).

Para moléculas mais pequenas que  $\lambda_0/20$ , a dispersão da luz é isotrópica, ou seja, é a mesma para cada ângulo (Wyatt, 1997). Para moléculas deste tamanho não haverá qualquer variação angular da dispersão da luz, logo  $P(\theta)$  será aproximadamente igual a 1, pois  $\frac{16 \pi^2}{3 \lambda_0^2} R_g^2 \sin^2(\theta/2) \approx 0$  (Harding, 1997; Folta-Stogniew e Williams, 1999), o que permite determinar directamente a MM de uma molécula a partir de  $R(\theta)$  na Equação 2.8.

## 2.2.4 Microscopia Electrónica de Transmissão

A microscopia electrónica tem sido muito utilizada nas últimas décadas para a determinação da morfologia de complexos proteicos. A microscopia electrónica de transmissão (TEM) constitui uma ferramenta muito importante para diferenciar morfologicamente espécies intervenientes em processos de agregação de proteínas em solução, por exemplo.

Os métodos de microscopia electrónica baseiam-se na interacção de feixes de electrões com a amostra. O fluxo de electrões, num microscópio electrónico típico, é formado por uma fonte (por exemplo, um filamento de tungsténio) que é acelerado por um potencial eléctrico positivo de várias dezenas de kilovolts na direcção da amostra. Os feixes electrónicos, após serem dispersos por estruturas diferentes da amostra, podem ser focados através de lentes electromagnéticas e detectados para se produzir uma imagem bidimensional imensamente ampliada da amostra numa película fotográfica ou, mais recentemente, sob a forma digital (Loura e Almeida, 2004; Reimer e Kohl, 2008).

A principal vantagem em usar um feixe de electrões é que há um grande aumento no poder de resolução. Este aumento deve-se ao facto do comprimento de onda do feixe de electrões ser muito pequeno e, quanto menor o comprimento de onda, maior a resolução obtida (relação de Broglie). Este facto aponta para a possibilidade teórica de se atingirem, com os microscópios electrónicos, resoluções da ordem de 0,002 nm. Todavia, como o poder de resolução não depende só do comprimento de onda, mas também da abertura numérica, e esta ser limitada por razões inerentes à natureza electromagnética das lentes, atingem-se limites de resolução próximos de 0,1 nm. No entanto, na observação de materiais biológicos, pela falta de contraste que os caracteriza, raramente se consegue ultrapassar a resolução de 1-2 nm. Esta falta de contraste é devida ao baixo número atómico dos átomos que os constituem (C, H, N, O) (Ruprecht e Nield, 2001). Para se obter um melhor contraste e uma melhor imagem, na preparação das amostras recorre-se a um tratamento com substâncias que contenham átomos pesados, como ósmio, chumbo e urânio (Loura e Almeida, 2004).



## 2.3 Procedimento Experimental

### 2.3.1 Preparação das Amostras de TTR-WT

#### 1) Transtirretina Nativa a pH 7,2

As amostras da proteína transtirretina no seu estado nativo tetramérico a pH 7,2 em tampão fosfato de sódio 50 mM e NaCl 150 mM foram preparadas a concentrações de 16  $\mu\text{M}$ . A concentração das soluções de TTR-WT foi determinada por espectrofotometria de UV/Visível num espectrofotómetro UV500 Spectronic Unicam através da leitura de absorvância a 280 nm, usando o coeficiente de absorção molar de  $7,76 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Quintas *et al.*, 1999).

As amostras de TTR-WT a pH 7,2 foram sujeitas a ensaios de dicroísmo circular (CD) no UV-longínquo e próximo, fluorescência e cromatografia de exclusão molecular acoplada a um detector multiangular de dispersão de luz (SEC-MALLS), à temperatura de 24 °C

#### 2) Transtirretina Desnaturada a pH 2,0

Para preparar amostras de TTR a pH 2,0, procedeu-se à diálise de amostras de TTR-WT a pH 7,2 contra uma solução aquosa de HCl 10 mM, pH 2,0, durante 4 dias, a 4 °C. Este procedimento produz transtirretina no estado monomérico desnaturado (Lindgren *et al.*, 2005). As cassetes de diálise usadas Slide-A-Lyzer, constituídas por membranas de celulose com porosidade para massas moleculares menores que 3,500 kDa, foram adquiridas à Pierce Biotechnology. Após a diálise, procedeu-se novamente à verificação da concentração da amostra de TTR-WT (16  $\mu\text{M}$ ) por espectrofotometria de UV/Visível num espectrofotómetro UV500 Spectronic Unicam através da leitura de absorvância a 280 nm, usando o coeficiente de absorção molar de  $7,76 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Quintas *et al.*, 1999).

As amostras de TTR-WT a pH 2,0 foram sujeitas a ensaios de CD (UV-longínquo e próximo), fluorescência e SEC-MALLS, à temperatura de 24 °C.



### **3) Ensaaios de Agregação a pH 2,0 com NaCl 100 mM**

Após diálise a pH 2,0 da TTR-WT a 2,3 e 16  $\mu$ M, procedeu-se à adição de NaCl 100 mM a partir de uma solução concentrada de NaCl 5 M. A adição de sal nestas condições, promove a agregação da proteína transtirretina (Lindgren *et al.*, 2005).

## **2.3.2 Ensaaios de Dicroísmo Circular**

Todas as experiências de dicroísmo circular (CD) foram realizadas num espectropolarímetro DSM 20 da Olis Inc., usando uma fenda de 0,6 mm e à temperatura de 24 °C. A aquisição dos espectros de CD dos diversos ensaios foi realizada com o *software* Olis Spectral Works versão 4.3.

### **2.3.2.1 Dicroísmo Circular no UV-Longínquo**

Nos ensaios de CD no UV-longínquo de TTR-WT a pH 7,2, pH 2,0 e pH 2,0 com NaCl 100 mM a vários tempos de incubação, a gama de comprimentos de onda utilizada para cada espectro foi de 190 nm a 260 nm, com uma acumulação de 2 varrimentos com 70 incrementos de comprimento de onda e um tempo de integração de 4 segundos por ponto. Os respectivos espectros de tampão na ausência de TTR-WT foram efectuados nas mesmas condições.

Nas experiências de cinética da fase inicial do processo de agregação da TTR-WT, a pH 2,0, após a adição de NaCl para uma concentração final de 100 mM, seguiu-se a variação do sinal de elipticidade observada ao longo do tempo, no comprimento de onda 213 nm. Nestes ensaios, o tempo de integração para cada ponto foi de 6 segundos para um total de experiência de 1 hora (TTR-WT 16  $\mu$ M) e 2 horas (TTR-WT 2,3  $\mu$ M).

Nas experiências de cinética da fase final do processo de agregação da TTR-WT 16  $\mu$ M, a pH 2,0 com 100 mM NaCl, foram recolhidos espectros ao longo de 37 dias de incubação.

As cuvetes usadas nos ensaios de CD no UV-longínquo tinham um percurso óptico de 0,2 e 1 mm, para as amostras de TTR-WT a 16 e 2,3  $\mu$ M, respectivamente.

Todos os resultados experimentais de CD no UV-longínquo foram analisados com o programa *Origin7* (OriginLab Corporation).

### **2.3.2.1 Dicroísmo Circular no UV-Próximo**

Nos ensaios de CD no UV-próximo de TTR-WT a pH 7,2, pH 2,0 e pH 2,0 com NaCl 100 mM a vários tempos de incubação, a gama de comprimentos de onda utilizada para cada espectro foi de 250 nm a 320 nm, com uma acumulação de 2 varrimentos com 70 incrementos de comprimento de onda e um tempo de integração de 4 segundos por ponto. Os respectivos espectros de tampão na ausência de TTR-WT foram efectuados nas mesmas condições.

Nas experiências de cinética da fase inicial do processo de agregação da TTR-WT 16  $\mu$ M, a pH 2,0 e após a adição de NaCl para uma concentração final de 100 mM, seguiu-se a variação do sinal de elipticidade observada ao longo do tempo, no comprimento de onda 291 nm. Nestes ensaios, o tempo de integração para cada ponto foi de 10 segundos para um total de 1 hora de experiência.

Nas experiências de cinética da fase final do processo de agregação da TTR-WT 16  $\mu$ M, a pH 2,0 com 100 mM NaCl, foram recolhidos espectros ao longo de 37 dias de incubação.

Em todos os ensaios de CD no UV- próximo, a cuvete utilizada tinha um percurso óptico de 5 mm.

Todos os resultados experimentais de CD no UV- próximo foram analisados com o programa *Origin7* (OriginLab Corporation).

### **2.3.3 Ensaios de Fluorescência**

Todos os ensaios de fluorescência foram realizados num fluorímetro Varian Cary Eclipse à temperatura de 24 °C utilizando uma cuvete com um percurso óptico de 5x5 mm. A aquisição de todos os espectros de fluorescência foi realizada com o *software* Varian Cary Eclipse versão 1.1.

Os espectros de fluorescência realizados com amostras de TTR-WT 16  $\mu$ M, a pH 7,2, pH 2,0 e pH 2,0 com NaCl 100 mM a vários tempos de incubação, foram obtidos utilizando um comprimento de onda de excitação de 280 nm, com uma

acumulação de 2 varrimentos para cada espectro. As fendas de excitação e emissão usadas foram de 5 e 10 nm, respectivamente.

Nas experiências de cinética da fase inicial do processo de agregação da TTR-WT 16  $\mu\text{M}$ , a pH 2,0 e após a adição de NaCl para uma concentração final de 100 mM, seguiu-se a variação do sinal de fluorescência ao longo do tempo, no comprimento de onda de emissão 380 nm, com um comprimento de onda de excitação de 290 nm. As fendas de excitação e emissão usadas foram de 5 e 10 nm, respectivamente. Nestes ensaios, o tempo de integração para cada ponto foi de 9 segundos para um total de 1 hora de experiência.

Nas experiências de cinética da fase final do processo de agregação da TTR-WT 16  $\mu\text{M}$ , a pH 2,0 com 100 mM NaCl, foram recolhidos espectros ao longo de 37 dias de incubação.

Todos os resultados experimentais de fluorescência foram analisados com o programa *Origin7* (OriginLab Corporation).

### 2.3.3.1 Ensaio de Tioflavina-T

O ensaio de Tioflavina-T (Th-T) foi realizado aos 37 dias de incubação da amostra de TTR-WT, a pH 2,0, com NaCl 100 mM, para a detecção de fibras amilóides (Vassar e Culling, 1959). À amostra de proteína incubada adicionou-se uma solução concentrada de Th-T em tampão glicina-NaOH 50 mM, pH 9,0, previamente filtrada, de modo a obter-se uma concentração final de 10  $\mu\text{M}$  de Th-T. A concentração da solução *stock* de Th-T foi previamente determinada por espectrofotometria de UV/Visível num espectrofotómetro UV500 Spectronic Unicam através da leitura de absorvância a 411 nm, usando o coeficiente de absorção molar de  $2,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Cardoso *et al.*, 2000).

Após a adição de Th-T à amostra de TTR-WT, a mistura é incubada à temperatura ambiente durante cerca de 20 minutos. Para intensificar o sinal de emissão de fluorescência da Th-T procedeu-se ao acerto do pH a 9,0. Os espectros de fluorescência foram obtidos num fluorímetro Varian Cary Eclipse, à temperatura ambiente. Obtiveram-se espectros de emissão com o comprimento de onda de excitação de 450 nm (LeVine III, 1993), com uma acumulação de 2 varrimentos para cada espectro. As fendas de excitação e emissão foram de 5 nm. A cuvete utilizada tinha um percurso óptico de 5x5 mm.

### 2.3.4 Ensaios de Cromatografia de Exclusão Molecular acoplada a um Detector Multiangular de Dispersão de Luz

Foram realizados ensaios de cromatografia de exclusão molecular acoplada a um detector multiangular de dispersão de luz (SEC-MALLS) com amostras de TTR-WT 16  $\mu\text{M}$ , a pH 7,2 em tampão fosfato de sódio 50 mM e a pH 2,0 em HCl 10 mM. A coluna foi pré-equilibrada com o tampão respectivo a cada amostra e o tampão foi previamente filtrado através de membranas com poro de 0,2  $\mu\text{m}$ . Cada injeção foi de 100  $\mu\text{L}$ .

As amostras para os ensaios de cinética da fase inicial do processo de agregação da TTR-WT, a pH 2,0, após a adição de NaCl para uma concentração final de 100 mM, foram realizadas a duas concentrações de TTR-WT: a 2,3  $\mu\text{M}$  para tempos de incubação de 0, 30 minutos, 2, 4, 8, 16, 20 e 24 horas, e a 16  $\mu\text{M}$  para tempos de incubação de 0, 2, 10, 30, 60 minutos, 2, 5 e 24 horas. A coluna foi previamente equilibrada com HCl 10 mM, NaCl 100 mM, pH 2,0. Para os ensaios a 2,3  $\mu\text{M}$  injectaram-se na coluna 700  $\mu\text{L}$  de amostra, enquanto que para os ensaios a 16  $\mu\text{M}$  injectaram-se 100  $\mu\text{L}$ .

Todas as amostras foram analisadas por cromatografia de exclusão molecular à temperatura de aproximadamente 24 °C. A coluna utilizada foi uma TSK-GEL G3000SW<sub>XL</sub>, com um volume total de 14,3 mL e com separação óptima entre massas moleculares de 10 a 500 kDa. Antes de cada injeção, a coluna foi equilibrada com tampão, previamente filtrado através de membranas com poro de 0,2  $\mu\text{m}$ . A velocidade de fluxo do eluente foi de 0,5 mL/min para todos os ensaios.

As espécies eluídas pela coluna passam primeiramente por um detector de UV (Gilson) que mede a absorção das mesmas a 280 nm, e depois passam por um sistema de detecção multiangular de dispersão da luz (miniDAWN TREOS, Wyatt Technology). Um feixe de radiação linearmente polarizada incidente nas espécies eluídas pela SEC é proveniente de um laser de arseneto de gálio (GaAs), cujo comprimento de onda ( $\lambda_0$ ) é de 658 nm. A dispersão de luz é detectada por 3 fotodetectores colocados em três ângulos fixos relativamente ao feixe de luz incidente na amostra: 41,6°, 90,0° e 138,4°. A normalização de sensibilidade dos fotodetectores a 41,6° e 138,4° foi realizada segundo o procedimento descrito no manual. Foram determinados os valores de 0,74 e 0,75, respectivamente. Ensaios com BSA (albumina sérica bovina) foram também usados para determinar o atraso temporal entre o detector de UV e o de MALLS (0,11 minutos). O valor de  $dn/dc$  usado

foi de 0,185 mL/g e o de  $n_0$  foi de 1,333. A aquisição dos dados e os cálculos para as massas moleculares das diferentes espécies foram realizados com o *software* ASTRA V versão 5.3.1.5 (Wyatt Technology).

### 2.3.5 Ensaios de Microscopia Electrónica de Transmissão

O ensaio de microscopia electrónica de transmissão (TEM) foi realizado aos 37 dias de incubação da amostra de TTR-WT, a pH 2,0, com NaCl 100 mM, com a finalidade de identificar a morfologia e tamanho dos agregados formados. Para visualizar os agregados ao microscópio, colocou-se 5  $\mu$ L de amostra numa grelha de cobre com uma malha de 400 quadrados, coberta com um filme polimérico de *formvar*, e aguardou-se 1 minuto. De seguida, adicionaram-se 5  $\mu$ L de 1% de acetato de uranilo, voltando-se a aguardar 1 minuto. Estes ensaios foram realizados no IBMC, Instituto de Biologia Molecular e Celular, da Universidade do Porto. As imagens das amostras observadas foram obtidas através de um microscópio electrónico de transmissão Zeiss modelo EM 902A, equipado com uma unidade com um canhão de electrões de filamentos de tungsténio, operando até 80 kV, e com uma câmara acoplada CCD da Orius Gatan.

## Capítulo 3

# Resultados e Discussão



Actualmente, a sequência de mecanismos moleculares que ocorrem durante a conversão do tetrâmero da TTR em agregados precursores de fibras amilóides, ainda não está completamente esclarecida. Embora se saiba que a dissociação do tetrâmero da TTR produz uma espécie monomérica com características estruturais diferentes do monómero nativo (Quintas *et al.*, 2001; Lindgren *et al.*, 2005), as dúvidas prevalecem relativamente ao que sucede com esse monómero não-nativo no processo inicial de agregação da TTR.

Lindgren *et al.* (2005) propuseram um dos modelos para a formação de fibras amilóides da proteína transtirretina *in vitro*. Estes autores consideram que a pH 2,0, o tetrâmero dissocia a um monómero desnaturado que, após a adição de NaCl 100 mM, sofre uma mudança conformacional adoptando uma conformação de glóbulo fundido compacto (*molten globule*), susceptível à agregação.

No presente trabalho, decidiu-se explorar as condições experimentais usadas por Lindgren *et al.* (2005), pois permitem iniciar de forma controlada o processo de agregação da TTR. De forma a monitorizar os estados iniciais de agregação da TTR, foram realizados ensaios de dicroísmo circular no UV-longínquo e próximo, fluorescência e cromatografia de exclusão molecular acoplada a um detector multiangular de dispersão de luz.

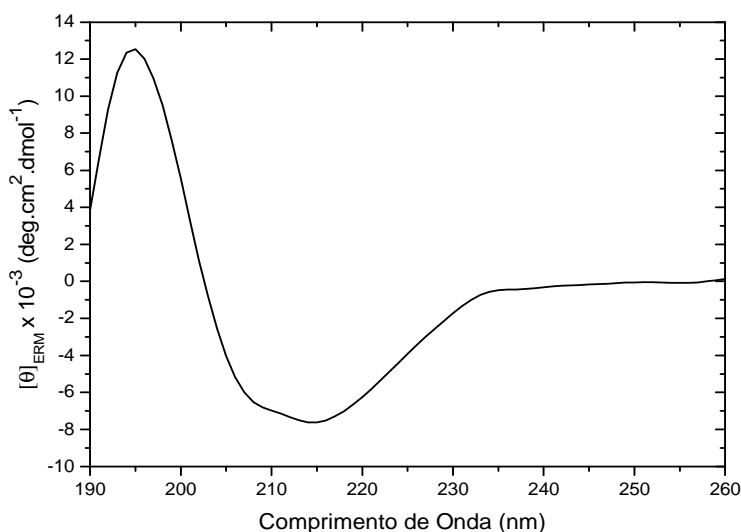
### 3.1 Análise da Estrutura Secundária da TTR-WT por Dicroísmo Circular no UV-Longínquo

A proteína transtirretina em condições fisiológicas, ou seja, na sua forma nativa apresenta maioritariamente estrutura secundária em folha- $\beta$  (Blake *et al.*, 1978; Hörnberg *et al.*, 2000) (Figura 1.2). A Figura 3.1 apresenta o espectro de dicroísmo circular (CD) no UV-longínquo da TTR-WT, a pH 7,2, e à temperatura de 24 °C. No espectro é possível verificar um máximo de elipticidade do resíduo médio por volta de 195 nm e um mínimo perto de 217 nm, bandas características de uma proteína com estrutura secundária maioritariamente em folha- $\beta$ .

Tendo em conta a estrutura cristalográfica da TTR humana determinada por difracção de raios-X com uma resolução de 1.8 Å (Blake *et al.*, 1978) e que se encontra depositada na base de dados PDB (*Protein Data Bank*) com o código 2PAB, foi possível avaliar as percentagens dos diferentes tipos de estrutura secundária presentes na estrutura tridimensional da TTR-WT através do algoritmo de cálculo

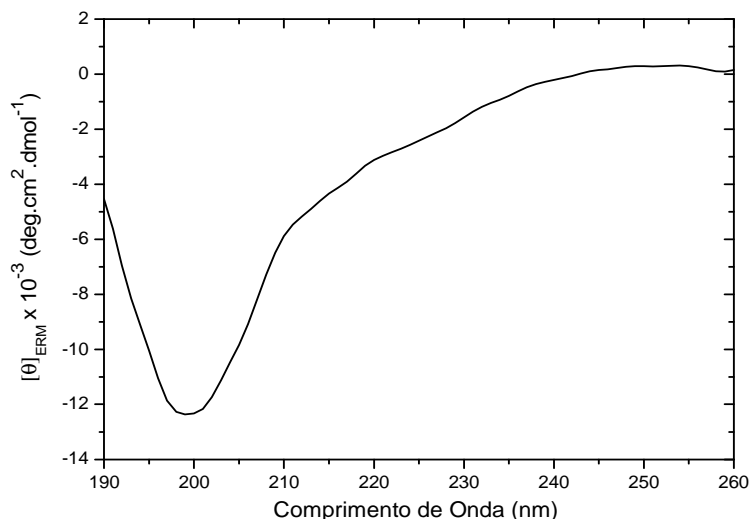


DSSP (*Definition of Secondary Structure of Proteins*). Este algoritmo considera que dos 127 aminoácidos da unidade monomérica da TTR, 8 estão presentes em estrutura em hélice- $\alpha$  e 59 encontram-se em 9 cadeias- $\beta$ . Desta forma, as percentagens de estrutura secundária obtidas pelo algoritmo DSSP são: 6% de hélice- $\alpha$ , 46% de folha- $\beta$  e 48% de outras estruturas. A elevada percentagem de outras estruturas (voltas e estrutura ao acaso) para a TTR é aceitável, uma vez que há 7 voltas e outros tipos de estrutura que unem os elementos de estrutura secundária regular repetitiva (hélice- $\alpha$  e cadeias- $\beta$ ).



**Figura 3.1: Espectro de CD no UV-longínquo da TTR-WT a pH 7,2.** O espectro foi registado à temperatura de 24 °C, com uma concentração de TTR-WT de 16  $\mu$ M em tampão fosfato de sódio 50 mM e NaCl 150 mM, pH 7,2. A cuvete usada tinha um percurso óptico de 0,2 mm. Acumularam-se 2 varrimentos, com 70 incrementos de comprimento de onda e um tempo de integração de 4 segundos por ponto.

Com o objectivo de investigar os estados iniciais de agregação da TTR-WT a pH 2,0, numa primeira etapa procedeu-se à alteração do pH das amostras de proteína através de diálise contra uma solução aquosa de HCl 10 mM, durante 4 dias, a 4 °C, de forma a promover a dissociação do tetrâmero da TTR em monómeros e ainda a desnaturação das espécies monoméricas (Lindgren *et al.*, 2005). Como se pode ver na Figura 3.2, o espectro de CD apresenta apenas um mínimo de elipticidade do resíduo médio, aproximadamente a 200 nm. O espectro de CD característico de estruturas proteicas desordenadas apresenta um mínimo próximo dos 195-197 nm. Desta forma, após 4 dias a pH 2,0, a TTR encontra-se numa estrutura desnaturada muito desordenada ainda que não totalmente.



**Figura 3.2: Espectro de CD no UV-longínquo da TTR-WT a pH 2,0.** O espectro foi registado à temperatura de 24 °C, após diálise da TTR-WT contra uma solução aquosa de HCl 10 mM pH 2,0, durante 4 dias, a 4°C. A concentração de TTR-WT foi de 16 µM. A cuvete usada tinha um percurso óptico de 0,2 mm. Acumularam-se 2 varrimentos, com 70 incrementos de comprimento de onda e um tempo de integração de 4 segundos por ponto.

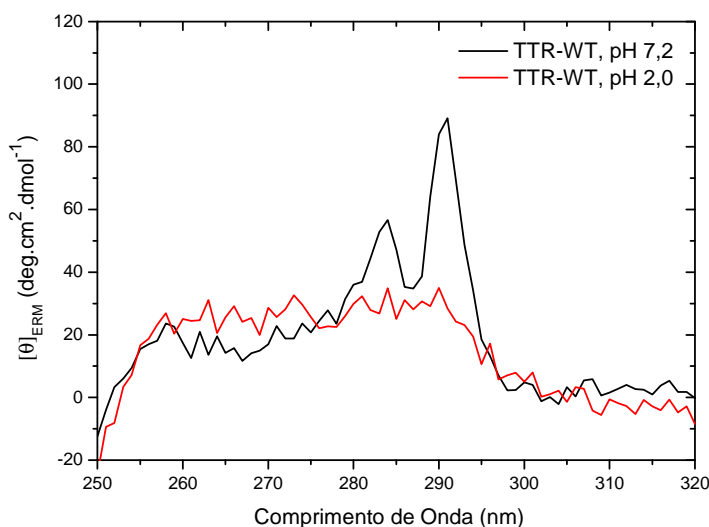
Adicionalmente, foi feito um ajuste ao espectro da Figura 3.2, recorrendo ao programa CONTIN, numa tentativa de avaliar as percentagens de estruturas secundárias. O algoritmo de cálculo tem como base espectros de CD no UV-longínquo de 48 proteínas de referência, cuja estrutura tridimensional é conhecida. Os resultados obtidos ao realizar o ajuste foram: 74% de outras estruturas e 27% de estrutura ordenada (folha-β e hélice-α). Mediante os valores percentuais de estrutura secundária para a TTR-WT a pH 2,0, confirma-se que a TTR está num estado desnaturado devido ao aumento de estrutura desorganizada, mas apresenta ainda estrutura secundária ordenada residual.

Estudos de dinâmica molecular foram realizados no nosso laboratório numa tentativa de caracterizar a extensão da desnaturação de monómeros da TTR através do aumento da temperatura. Dos resultados obtidos das várias simulações constatou-se que na maior parte dos casos há uma perda significativa de estrutura secundária (Brito *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2010). Apesar da desnaturação nas simulações ser induzida pelo aumento da temperatura e no caso do presente trabalho ser induzida pela acidificação do meio, verifica-se que em ambos os casos, a desnaturação não é total, mas parcial.

### 3.2 Análise da Estrutura Terciária da TTR-WT por Dicroísmo Circular no UV-Próximo e por Fluorescência

As bandas de CD no UV-próximo são observadas quando as cadeias laterais aromáticas de uma proteína se encontram num ambiente assimétrico. Assim, os espectros de CD nesta zona do ultravioleta constituem um critério extremamente sensível para analisar alterações da estrutura terciária de uma proteína, isto é, alterações no arranjo tridimensional da estrutura da proteína.

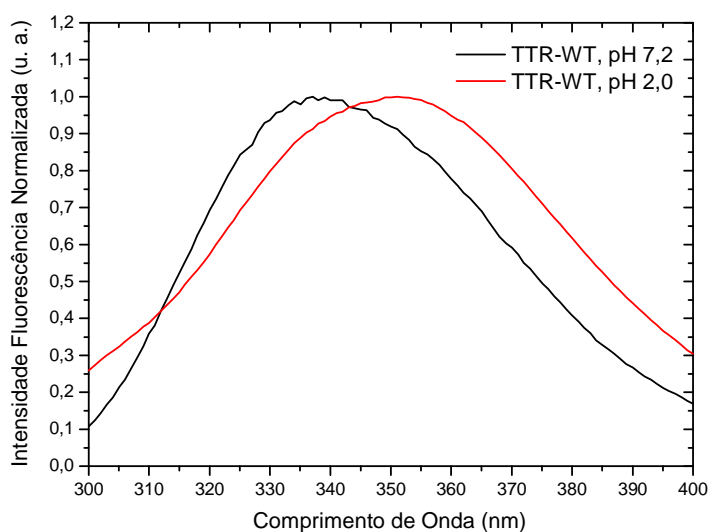
Na Figura 3.3 está representado o espectro de CD no UV-próximo da TTR-WT no estado nativo. O espectro apresenta 2 máximos positivos de elipticidade do resíduo médio a 283 e 291 nm. Numa proteína nativa, o sinal de CD no UV-próximo é devido às contribuições dos aminoácidos aromáticos num ambiente assimétrico: a fenilalanina apresenta um pico entre os 255 e os 270 nm, a tirosina entre os 275 nm e os 282 nm e o triptofano entre os 290 nm e os 305 nm (Kelly *et al.*, 2005). Assim, no caso da TTR-WT no seu estado nativo, os dois picos observados no espectro de CD no UV-próximo devem-se ao ambiente assimétrico das cadeias laterais dos triptofanos e das tirosinas.



**Figura 3.3: Espectros de CD no UV-próximo da TTR-WT a pH 7,2 e a pH 2,0.** Os espectros foram registados à temperatura de 24 °C, com uma concentração de TTR-WT de 16 μM. O espectro a preto corresponde à TTR-WT a pH 7,2 em tampão fosfato de sódio 50 mM e NaCl 150 mM e o espectro a vermelho corresponde à TTR-WT a pH 2,0, após diálise durante 4 dias, a 4°C, contra HCl 10 mM. A cuvete usada tinha um percurso óptico de 5 mm. Para cada espectro, acumularam-se 2 varrimentos, com 70 incrementos de comprimento de onda e um tempo de integração de 4 segundos por ponto.

Alterando o pH da solução de TTR-WT para 2,0 através de uma diálise contra HCl 10 mM, observa-se que o sinal de elipticidade do resíduo médio no UV-próximo se torna muito fraco indicando ausência de estrutura ordenada (Schmid, 1997). Assim, o espectro da TTR-WT a pH 2,0 (Figura 3.3) é indicativo de que a TTR apresenta uma estrutura terciária onde o ambiente químico dos triptofanos e tirosinas foi claramente alterado para um ambiente menos organizado, relativamente ao ambiente existente no estado nativo.

A emissão máxima de fluorescência de triptofanos em proteínas nativas varia normalmente entre 332 e 342 nm (Einarsson e Andersson, 1977). No caso da TTR, o máximo de emissão ocorre aos 340 nm. A fluorescência em proteínas é dominada pela contribuição dos aminoácidos aromáticos, nomeadamente os triptofanos. A TTR-WT contém dois resíduos de triptofanos por monômero, o triptofano 41 e o triptofano 79. No entanto, o triptofano 79 exibe uma percentagem de fluorescência pouco significativa a pH 7, pelo que a fluorescência exibida é consequência maioritariamente do triptofano 41 (Quintas *et al.*, 1999).



**Figura 3.4: Espectros de fluorescência da TTR-WT a pH 7,2 e a pH 2,0.** Os espectros foram registados à temperatura de 24 °C, com uma concentração de TTR-WT de 16  $\mu$ M. O comprimento de onda de excitação foi 280 nm. O espectro a preto corresponde à TTR-WT a pH 7,2 em tampão fosfato de sódio 50 mM e NaCl 150 mM e o espectro a vermelho corresponde à TTR-WT a pH 2,0, após diálise durante 4 dias, a 4°C, contra HCl 10 mM. A cuvete usada tinha um percurso óptico de 5x5 mm.

No espectro de fluorescência da TTR-WT desnaturada a pH 2,0 (Figura 3.4) observa-se um desvio para o vermelho no máximo de emissão, aproximadamente para os 350 nm, relativamente ao máximo de emissão da TTR-WT a pH 7,2. Este

desvio deve-se a uma alteração do ambiente químico em torno dos triptofanos para um ambiente mais polar, ou seja, com uma maior exposição destes ao solvente.

Assim, pode-se concluir que após 4 dias a pH 2,0, a TTR-WT encontra-se desnaturada, com quantidades residuais de estrutura secundária ordenada, estrutura terciária desorganizada e os resíduos de triptofano mais expostos ao solvente do que no estado nativo.

### **3.3 Análise da Massa Molecular da TTR-WT por Cromatografia de Exclusão Molecular acoplada a um Detector Multiangular de Dispersão de Luz**

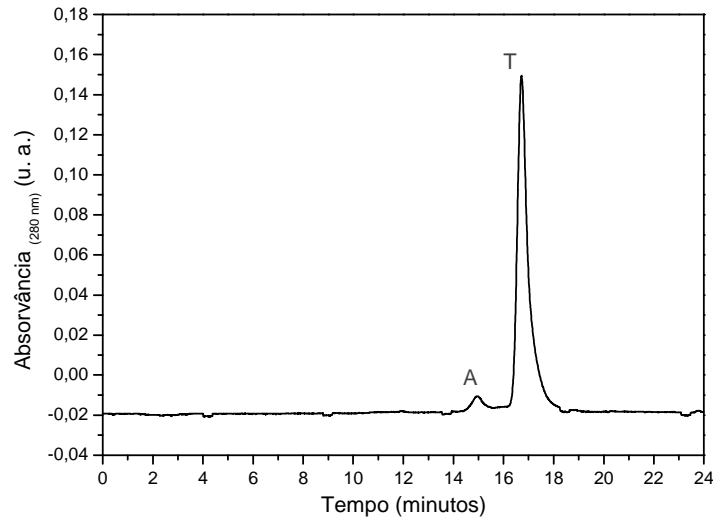
A proteína transtirretina no seu estado nativo encontra-se na forma tetramérica com um peso molecular de aproximadamente 55 kDa. Injectou-se uma amostra de TTR-WT a pH 7,2 num sistema SEC-MALLS. Este sistema de dispersão de luz com detecção multiangular (MALLS) acoplado a uma cromatografia de exclusão molecular (SEC) tem-se mostrado bastante útil na determinação das massas moleculares médias aparentes de proteínas. As espécies vão sendo eluídas na SEC pelo seu tamanho e forma e depois passam por um detector de dispersão de luz com múltiplos ângulos de detecção. A quantidade de luz dispersa medida simultaneamente a cada ângulo é directamente proporcional à massa molecular e à concentração dessas espécies (Folta-Stogniew e Williams, 1999).

As massas moleculares aparentes das diferentes espécies nos ensaios de SEC-MALLS foram determinadas segundo as Equações 2.8, 2.9 e 2.10 da Secção 2.2.3.

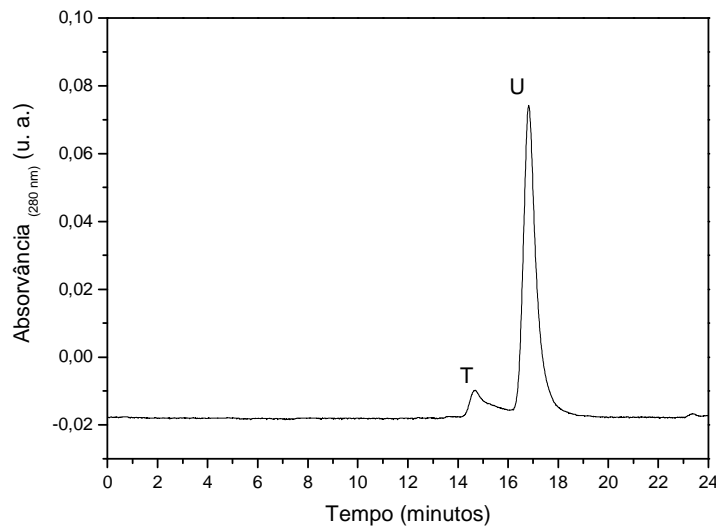
No cromatograma da TTR-WT nativa a pH 7,2 (Figura 3.5), observam-se dois picos: A e T. O pico T é bem definido e intenso, com tempo de eluição aproximadamente aos 17 minutos e peso molecular aparente de 63 kDa, que corresponde deste modo ao tetrâmero da TTR. O pequeno pico (A) com tempo de eluição aproximadamente aos 15 minutos apresenta um peso molecular médio aparente de 269 kDa que corresponde a agregados proteicos presentes na solução.

No cromatograma da TTR-WT desnaturada a pH 2,0 (Figura 3.6) também se observam dois picos: U e T. O pico mais intenso (U), com tempo de eluição aproximadamente aos 17 minutos, tem um peso molecular médio aparente de 17 kDa. Este pico corresponde ao monómero desnaturado da TTR. O pico mais pequeno (T)

apresenta uma massa molecular de 54 kDa com um tempo de eluição perto dos 15 minutos, indicando que ainda há uma pequena percentagem de tetrâmero na amostra que não foi totalmente desnaturada.



**Figura 3.5: Análise de uma amostra de TTR-WT a pH 7,2 por SEC-MALLS.** O cromatograma foi obtido a uma velocidade de fluxo de 0,5 mL/min em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,2. Aplicaram-se 100  $\mu$ L de amostra de TTR-WT 16  $\mu$ M. T corresponde ao tetrâmero e A corresponde a agregados.



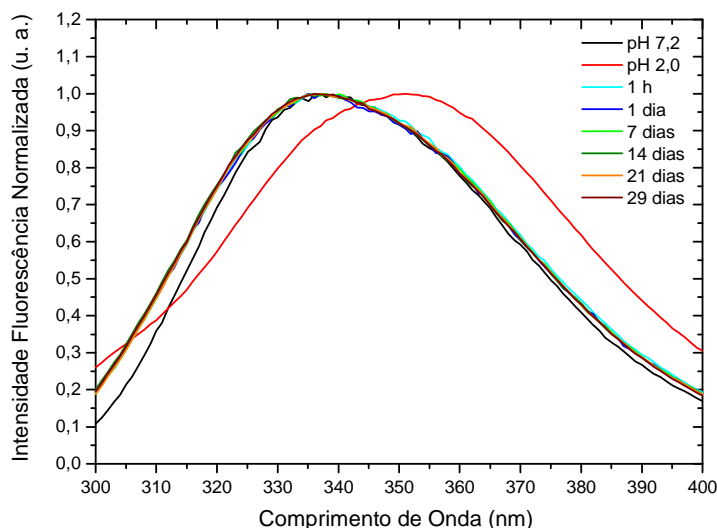
**Figura 3.6: Análise de uma amostra de TTR-WT a pH 2,0 por SEC-MALLS.** O cromatograma foi obtido a uma velocidade de fluxo de 0,5 mL/min em HCl 10 mM, pH 2,0. Aplicaram-se 100  $\mu$ L de amostra de TTR-WT 16  $\mu$ M. U corresponde ao monómero desnaturado e T corresponde ao tetrâmero.

### 3.4 Agregação da TTR-WT seguida por Fluorescência e Dicroísmo Circular no UV-Próximo

No modelo de formação de fibras amilóides da TTR proposto por Lai *et al.* (1996) é sugerido que a pH 2,0 se forma uma estrutura do tipo glóbulo fundido (*molten globule*) que é não-amiloidogénico, portanto, incompatível com a formação de fibras amilóides. Por outro lado, no modelo proposto por Lindgren *et al.* (2005) o glóbulo fundido compacto e amiloidogénico (*molten globule*), capaz de agregar e formar fibras amilóides, forma-se após a adição de NaCl às espécies monoméricas desnaturadas.

De modo a promover a agregação, procedeu-se neste trabalho à adição de NaCl para uma concentração final de 100 mM aos monómeros desnaturados a pH 2,0 (Lindgren *et al.*, 2005). As alterações de estrutura terciária, induzidas pela alteração da força iónica do meio, foram seguidas por fluorescência e CD no UV-próximo ao longo do tempo.

A Figura 3.7 mostra os espectros de fluorescência intrínseca retirados a vários tempos após a adição de NaCl à TTR-WT desnaturada a pH 2,0. Comparando estes espectros com o espectro de TTR a pH 2,0 (máximo de emissão aproximadamente a 350 nm), verifica-se que há um desvio para o azul no máximo de emissão de fluorescência, para aproximadamente os 340 nm. Este máximo de emissão é exactamente o mesmo que o da proteína no estado nativo a pH 7,2.



**Figura 3.7: Espectros de fluorescência de TTR-WT a pH 2,0 para vários tempos de incubação após a adição de NaCl 100 mM.** Espectros recolhidos a vários tempos de incubação: 1 hora, 1, 7, 14, 21, e 29 dias. Os espectros foram registados à temperatura de 24 °C, com uma concentração de TTR-WT de 16  $\mu$ M. O comprimento de onda de excitação foi 280 nm. A cuvete usada tinha um percurso óptico de 5x5 mm. A preto e a vermelho também estão representados os espectros de TTR-WT a pH 7,2 e a pH 2,0, respectivamente.

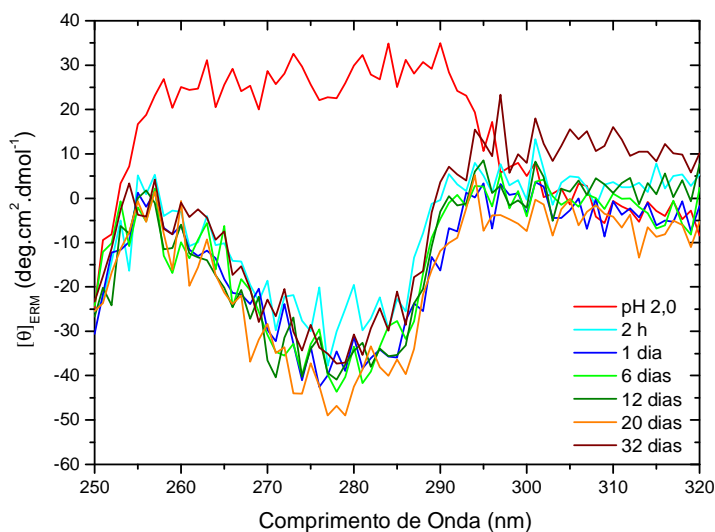
Este desvio no comprimento de onda no máximo de emissão significa que o ambiente químico em torno dos triptofanos foi alterado para um ambiente mais hidrofóbico, como aquele verificado na conformação nativa (máximo de emissão aproximadamente 340 nm). Como a pH 2,0, a TTR apresenta-se fundamentalmente carregada positivamente porque está abaixo do seu ponto isoelétrico que é aproximadamente 5 (Pettersson *et al.*, 1987), as cargas negativas sob a forma do ião cloreto (Cl<sup>-</sup>) vão neutralizar as cargas positivas da proteína que ficaram expostas ao solvente após a desnaturação em pH ácido. Este efeito de neutralização diminui as repulsões electroestáticas entre os resíduos de aminoácidos carregados, favorecendo deste modo o efeito hidrofóbico e permitindo uma reestruturação tridimensional da unidade monomérica da TTR que adquire novamente uma estrutura ordenada e onde os triptofanos se encontram menos expostos ao solvente. No entanto, verifica-se um ligeiro alargamento dos espectros de TTR-WT a pH 2,0 e NaCl 100 mM, especialmente a comprimentos de onda baixos, quando comparados com o espectro a pH 7,2 (Figura 3.7). Como foi dito anteriormente, a fluorescência intrínseca da TTR deve-se maioritariamente aos triptofanos, pelo que esta pequena alteração entre os espectros pode querer dizer que o ambiente químico em torno dos triptofanos durante a fase inicial do processo de agregação é diferente daquele sentido pelos triptofanos na proteína nativa. Note-se que no estado nativo a TTR apresenta uma conformação tetramérica, ao passo que nestes ensaios de agregação após a adição de sal e segundo o modelo de Lindgren *et al.* (2005), a TTR encontra-se numa conformação monomérica parcialmente desnaturada (*molten globule*), com tendência para agregar.

Como se pode ver na Figura 3.7, as pequenas alterações verificadas nos espectros após a adição de sal comparativamente com o espectro a pH 7,2, são mantidas durante o processo de agregação, pois os espectros registados a vários tempos de incubação são praticamente sobreponíveis, ou seja, o ambiente químico em torno dos triptofanos não muda significativamente durante o processo de agregação da TTR-WT.

A Figura 3.8 mostra diversos espectros de CD no UV-próximo a vários tempos de incubação de TTR-WT a pH 2,0 com sal. É possível observar que após a adição de NaCl 100 mM à TTR-WT no estado desnaturado a pH 2,0, há a passagem de uma estrutura desorganizada com baixo sinal de elipticidade, para a formação de uma estrutura que apresenta um pico negativo de elipticidade próximo dos 278 nm, tal como observado pelos autores Jiang *et al.* (2001b) que produziram uma proteína mutante de TTR com dupla mutação (Phe87Met/Leu110Met) e onde verificaram que a pH 7,0 se encontra no estado monomérico e que agrega em condições ácidas. É possível verificar também que, ao longo do tempo, este pico negativo se mantém e



que todos os espectros registados a diversos tempos, após adição de sal, são praticamente sobreponíveis, não se registando deste modo grandes alterações.



**Figura 3.8: Espectros de CD no UV-próximo da TTR-WT a pH 2,0 para vários tempos de incubação após a adição de NaCl 100 mM.** Espectros recolhidos a vários tempos de incubação: 2 horas, 1, 6, 12, 17, 20, e 32 dias. Os espectros foram registados à temperatura de 24 °C, com uma concentração de TTR-WT de 16  $\mu$ M. A cuvete usada tinha um percurso óptico de 5 mm. Para cada espectro, acumularam-se 2 varrimentos, com 70 incrementos de comprimento de onda e um tempo de integração de 4 segundos por ponto. A vermelha também está representado o espectro de TTR-WT a pH 2,0.

Como já foi referido anteriormente, para que uma proteína exiba sinal de CD na região do UV-próximo é necessário que os seus resíduos aromáticos estejam inseridos num ambiente assimétrico (Schmid, 1997; Kelly *et al.*, 2005). Para que nesta região o sinal de CD se altere, tem de existir uma alteração do ambiente químico em torno dos aminoácidos aromáticos, como se verificou no caso da transição da TTR nativa para a desnaturada (Figura 3.3). Isto implica que os 5 resíduos de tirosinas e os 2 resíduos de triptofanos existentes por monómero na proteína transtirretina, com a alteração da força iónica do meio a pH 2,0, sofram uma mudança no seu ambiente químico. No entanto, o ambiente químico em torno destes aminoácidos aromáticos a pH 2,0 e NaCl 100 mM (um mínimo de elipticidade observado a 278 nm, Figura 3.8) é também diferente do ambiente químico existente na proteína nativa, a pH 7,2 (dois máximos de elipticidade a 283 e 291 nm, Figura 3.3). Esta diferença nos ambientes químicos em torno das tirosinas e triptofanos a pH 7,2 e a pH 2,0 com NaCl mostra que a conformação de TTR-WT após a adição de sal é diferente da conformação de proteína nativa e reflecte a formação do *molten globule* amiloidogénico. Por outro lado,

verifica-se que o ambiente químico destes resíduos aromáticos a pH 2,0 com sal é mantido ao longo do processo de agregação da TTR-WT.

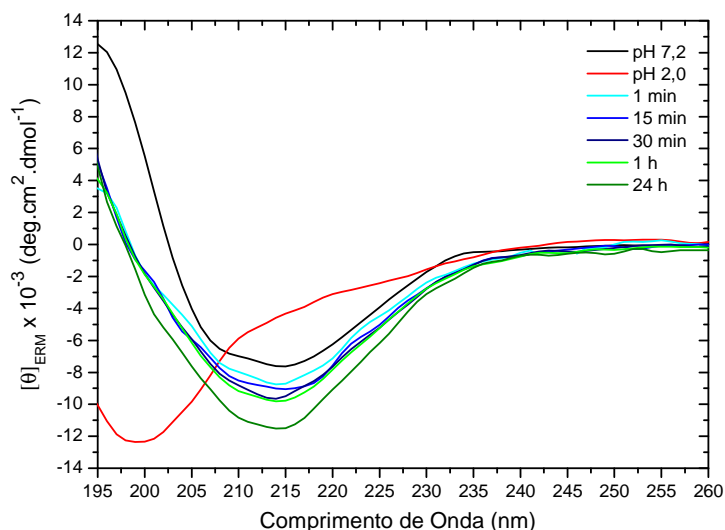
Os resultados experimentais obtidos por CD no UV-próximo complementam os resultados obtidos por fluorescência intrínseca (Figura 3.7), pois apesar de a alteração conformacional associada à formação do monómero amiloidogénico ser consistente com uma acessibilidade ao solvente dos resíduos aromáticos próxima do estado nativo, o ambiente químico em torno destes resíduos parece ser distinto do que ocorre no estado nativo.

### 3.5 Agregação da TTR-WT seguida por Dicroísmo Circular no UV-Longínquo

No sentido de avaliar as alterações conformacionais que acompanham a formação de agregados amilóides a partir da forma desnaturada a pH 2,0 de TTR-WT, foi também estudada a variação do sinal de CD no UV-longínquo ao longo do tempo.

De acordo com os resultados obtidos, após a adição de sal aos monómeros desnaturados de TTR-WT, verifica-se que houve mudanças conformacionais significativas (Figura 3.9). Logo após um minuto da adição de sal, observa-se um ganho de estrutura secundária dramática, com passagem de uma estrutura altamente desordenada para uma estrutura do tipo folha- $\beta$ , com um mínimo de elipticidade observada na zona dos 213 - 215 nm. Estes resultados confirmam que, após a adição de sal, há uma reestruturação tridimensional dos monómeros desnaturados da proteína transtirretina, que adquirem novamente estrutura secundária.

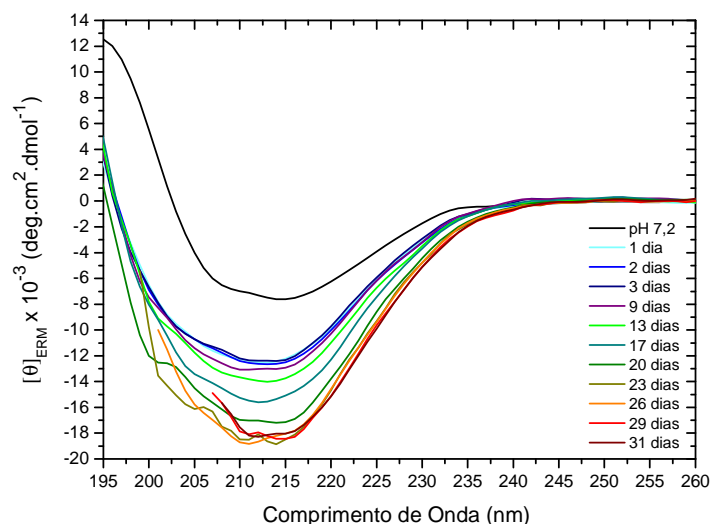
No espectro de CD no UV-longínquo ao primeiro minuto de incubação após a adição de NaCl (Figura 3.9), já é possível observar uma forma característica de estrutura em folha- $\beta$  e um sinal mais negativo da elipticidade do resíduo médio, comparado com o espectro de TTR-WT no seu estado nativo (Figura 3.9). Estes resultados experimentais são compatíveis com o modelo de Lindgren *et al.*, segundo o qual a mudança de conformação se deve à passagem de um monómero desnaturado com alguma estrutura secundária residual, eventualmente numa conformação de glóbulo fundido compacto não-amiloidogénico, para um glóbulo fundido (*molten globule*) com mais estrutura secundária ordenada e com capacidade de agregar.



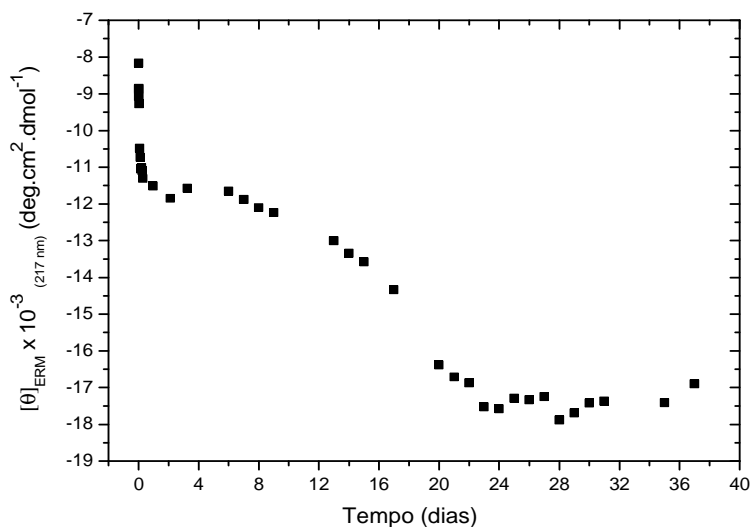
**Figura 3.9: Espectros de CD no UV-longínquo de TTR-WT, a pH 2,0 e após a adição de NaCl 100 mM para diferentes tempos de incubação até 24 horas.** Espectros recolhidos a vários tempos de incubação: 1, 15, 30 minutos (a azul), 1 e 24 horas (a verde). Os espectros foram registados à temperatura de 24 °C e para uma concentração de TTR-WT de 16 μM. A cuvete usada tinha um percurso óptico de 0,2 mm. Para cada espectro, fez-se 1 varrimento, com 65 incrementos de comprimento de onda e um tempo de integração de 4 segundos por ponto. A preto e a vermelho estão representados os espectros de TTR-WT a pH 7,2 e a pH 2,0, respectivamente.

Verifica-se ainda que ao longo do tempo, e acompanhando a agregação, há aumento do valor absoluto do sinal de CD, o que pode indicar ganho de estrutura secundária em folha-β. Considerando esta observação, foram recolhidos mais espectros ao longo do tempo, de modo a ver até quando este aumento de sinal se mantinha (Figura 3.10). O aumento do valor absoluto do sinal de CD, e possível ganho de estrutura secundária do tipo folha-β ocorre até, aproximadamente, 23 dias. Como se pode ver na Figura 3.10, a partir do 23º dia há sobreposição dos espectros. Adicionalmente, para os tempos de incubação mais longos parece haver um ligeiro desvio para o vermelho do comprimento de onda (1 a 2 nm) do mínimo de elipticidade observada, o que pode ser indicativo do aparecimento de agregados grandes e ricos em folha-β.

Para uma melhor percepção do ganho significativo de estrutura secundária do tipo folha-β ao longo do tempo (Figuras 3.9 e 3.10), na Figura 3.11 é apresentado o valor de elipticidade do resíduo médio a 217 nm em função do tempo de incubação após a adição de sal à TTR-WT a pH 2,0.



**Figura 3.10: Espectros de CD no UV-longínquo de TTR-WT, a pH 2,0 e após a adição de NaCl 100 mM para diferentes tempos de incubação longos.** Espectros recolhidos a vários tempos de incubação: 1, 2, 3, 9, 13, 17, 20, 23, 26, 29 e 31 dias. Os espectros foram registados à temperatura de 24 °C e a concentração de TTR-WT foi de 16  $\mu\text{M}$ . A cuvete usada tinha um percurso óptico de 0,2 mm. Para cada espectro, acumularam-se 2 varrimentos, com 65 incrementos de comprimento de onda e um tempo de integração de 4 segundos por ponto. A preto também está representado o espectro de TTR-WT a pH 7,2.



**Figura 3.11: Monitorização do processo de agregação da TTR-WT, a pH 2,0, NaCl 100 mM e 16  $\mu\text{M}$  por CD no UV-longínquo.** Os valores de elipticidade do resíduo médio a 217 nm foram obtidos em função do tempo de incubação, a 24 °C, após a adição de NaCl 100 mM a TTR-WT desnaturada a pH 2,0.

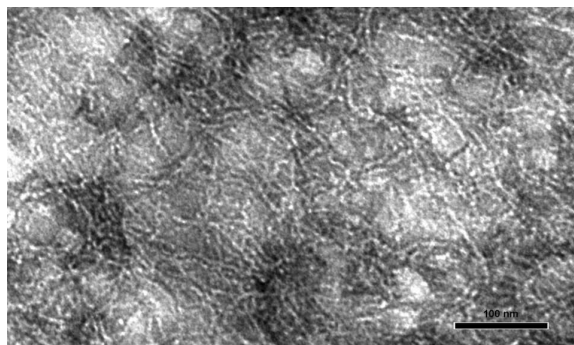
Analisando a Figura 3.11, observa-se uma primeira fase com um decréscimo acentuado da elipticidade, correspondendo a um aumento na estrutura secundária

associada à mudança do estado conformacional dos monómeros desnaturados para monómeros amiloidogénicos e primeiros oligómeros (Figura 3.9). Seguidamente, observa-se uma fase em que a elipticidade do resíduo médio se mantém aproximadamente constante por volta dos  $-11.5 \text{ deg.cm}^2\text{dmol}^{-1}$ , desde o primeiro até ao sexto dia. A partir do 6º dia até ao 23º dia observa-se um aumento gradual do valor absoluto da elipticidade que deverá corresponder a um aumento e estabilização da estrutura secundária em folha- $\beta$ . Após o 23º dia, a elipticidade do resíduo médio estabiliza novamente, por volta dos  $-17.5 \text{ deg.cm}^2\text{dmol}^{-1}$  (Figuras 3.10 e 3.11).

O comportamento aproximadamente sigmoidal, observado entre o primeiro e o trigésimo sétimo dia (Figura 3.11), sugere um mecanismo de agregação do tipo nucleação-crescimento com a nucleação de oligómeros a ocorrer entre o 1º e 6º dias, seguida de uma fase de crescimento de agregados até à formação de fibras amilóides.

### 3.6 Caracterização dos Agregados de TTR-WT

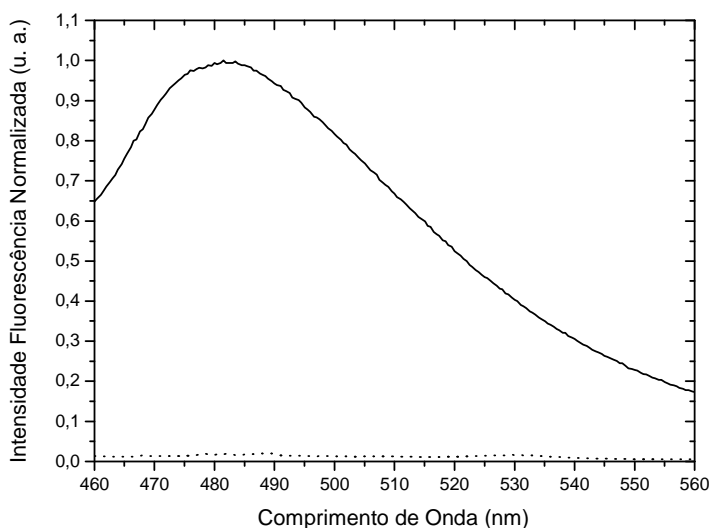
No sentido de caracterizar morfologicamente as espécies formadas na fase final do processo de agregação, ao 37º dia de incubação de TTR-WT a pH 2,0 com NaCl 100 mM fez-se um ensaio de microscopia electrónica de transmissão (TEM). A fotomicrografia electrónica (Figura 3.12) revela estruturas fibrilares não-ramificadas com um diâmetro de aproximadamente 10 nm e comprimento indeterminado. O diâmetro destas estruturas fibrilares é o diâmetro característico observado para fibras amilóides de TTR (Serpell *et al.*, 1995). Pode-se portanto concluir que ao 37º dia de incubação com NaCl 100 mM, a amostra de TTR-WT apresenta fibras amilóides maduras.



**Figura 3.12: Análise morfológica dos agregados de TTR-WT.** Fotomicrografia de microscopia electrónica de fibras amilóides presentes na amostra após 37 dias de incubação a 24 °C e adição de NaCl 100 mM da TTR-WT desnaturada a pH 2,0. A concentração final de TTR-WT neste ensaio de TEM foi de 8  $\mu\text{M}$  (diluição 1:2 da amostra inicial).

Para além do ensaio de microscopia electrónica realizado, fez-se também um ensaio de fluorescência com tioflavina-T (Th-T) da mesma amostra. Os máximos de excitação e de emissão de fluorescência da Th-T sofrem um desvio para o vermelho após a ligação com fibras amilóides (Naiki *et al.*, 1989). Na ausência de fibras amilóides, a Th-T apresenta um baixo rendimento quântico de fluorescência, com máximos de excitação e de emissão a 385 e 445 nm, respectivamente (LeVine III, 1993). Na presença de fibras amilóides, o rendimento quântico de fluorescência aumenta significativamente e os máximos de excitação e emissão sofrem um desvio para 450 e 482 nm, respectivamente (Naiki *et al.*, 1989).

A Figura 3.13 mostra a resposta fluorimétrica da Th-T em presença de TTR-WT 16  $\mu\text{M}$  desnaturada a pH 2,0, com NaCl 100 mM, após 37 dias de incubação a 24 °C. O espectro apresenta um máximo de emissão aproximadamente aos 482 nm, o mesmo máximo de emissão que se observa para a tioflavina-T na presença de fibras amilóides.



**Figura 3.13: Ensaio de Th-T para detecção de fibras amilóides.** Espectro de emissão de Th-T (linha contínua) de uma amostra de TTR-WT 16  $\mu\text{M}$ , após 37 dias de incubação a 24 °C, pH 2,0 e NaCl 100 mM. Adicionou-se à amostra uma solução de Th-T concentrada de forma a obter uma concentração final de Th-T 10  $\mu\text{M}$ . O comprimento de onda de excitação usado foi 450 nm. A cuvete usada tinha um percurso óptico de 5x5 mm. A linha a ponteados (···) representa o espectro de emissão do tampão com Th-T 10  $\mu\text{M}$  na ausência de TTR-WT.

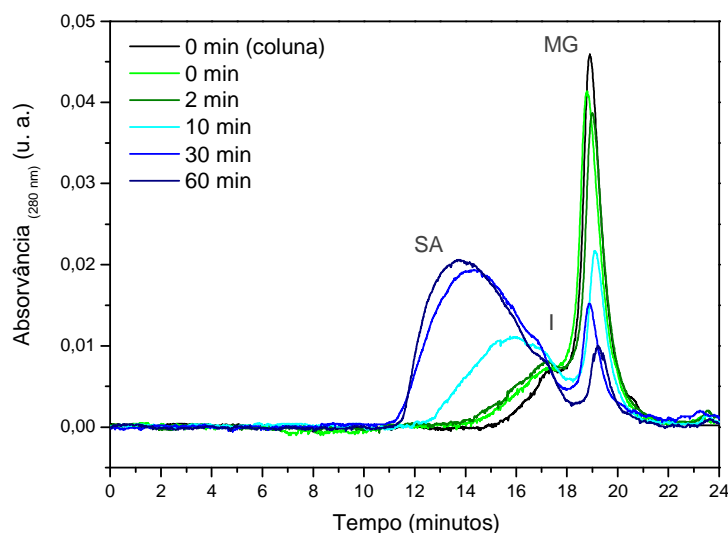
Estes resultados estão, assim, concordantes com os resultados obtidos por TEM (Figura 3.12). Por outro lado, estes resultados podem justificar o pequeno desvio do comprimento de onda do mínimo de elipticidade do resíduo médio observado nos espectros de CD no UV-longínquo para tempos mais longos de incubação

(Figura 3.10). É natural que o mínimo de elipticidade observada ao longo do processo de agregação (213 nm) sofra um desvio para valores mais próximos dos 217 nm (mínimo característico de estruturas em folha- $\beta$ ) aquando da formação de fibras amilóides maduras que são estruturas abundantes em folha- $\beta$  (Steim e Fleischer, 1967; Reinert e Davis, 1971).

### **3.7 Determinação da Massa Molecular Aparente das Espécies formadas no Processo de Agregação da TTR-WT por Cromatografia de Exclusão Molecular acoplada a um Detector Multiangular de Dispersão de Luz**

Com o objectivo de determinar a massa molecular dos oligómeros formados no início do processo de agregação da proteína transtirretina, foram preparadas várias amostras de TTR-WT a 16  $\mu$ M e pH 2,0, e para vários tempos de incubação após adição de NaCl 100 mM: 0, 2, 10, 30 e 60 minutos. Estas amostras foram posteriormente injectadas num sistema SEC-MALLS e os dados registados estão apresentados na Figura 3.14.

Analisando a Figura 3.14 é possível verificar a existência de 2 picos principais em todos os cromatogramas (SA e MG). O pico MG é bem definido e apresenta um tempo de eluição por volta dos 19 minutos. Da análise de todos os cromatogramas por MALLS, este pico tem um peso molecular médio aparente entre 20 e 27 kDa, correspondendo em princípio a uma espécie monomérica da TTR. Segundo o modelo proposto por Lindgren *et al.* (2005), na fase inicial do processo de agregação da TTR-WT a espécie monomérica que se forma é o *molten globule* (MG), logo o referido pico corresponderá ao conjunto de monómeros desnaturados e *molten globules*. Também é possível verificar na Figura 3.14 que este pico referente às espécies monoméricas vai diminuindo de intensidade ao longo do tempo de incubação com sal, à medida que a intensidade e a largura do pico SA vai aumentando. Os valores das massas moleculares médias aparentes obtidas por MALLS indicam que este pico diz respeito a pequenos agregados (SA). Para os ensaios de 10, 30 e 60 minutos de incubação, os agregados apresentam uma massa molecular média aparente de aproximadamente 230, 350 e 380 kDa, respectivamente.



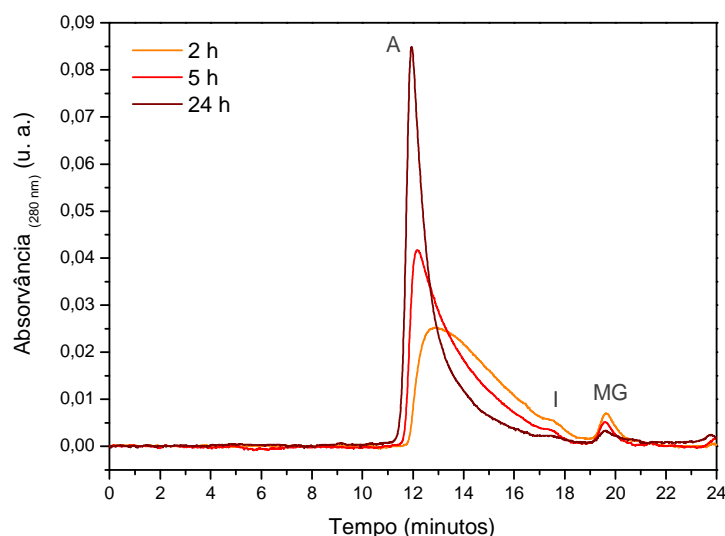
**Figura 3.14: Cromatogramas de SEC-MALLS de TTR-WT 16  $\mu$ M, pH 2,0 e após a adição de NaCl 100 mM para diferentes tempos de incubação até 1 hora.** Cromatogramas recolhidos a vários tempos de incubação: 0 (coluna), 0, 2, 10, 30 e 60 minutos. 0 min (coluna) significa que se injectou na coluna de exclusão molecular uma amostra de TTR-WT a pH 2,0 sem sal. Cada cromatograma foi obtido a uma velocidade de fluxo de 0,5 mL/min em HCl 10 mM, pH 2,0 e NaCl 100 mM. Aplicaram-se 100  $\mu$ L de cada amostra. MG corresponde ao *molten globule*, SA corresponde a pequenos agregados e I corresponde a um intermediário oligomérico de agregação.

O tempo 0 minutos (coluna) significa que se injectaram-se 100  $\mu$ L de TTR-WT a pH 2,0 sem adicionar sal previamente, ou seja, a agregação foi iniciada no interior da coluna de exclusão molecular equilibrada com HCl 10 mM, pH 2,0 e NaCl 100 mM. O tempo 0 minutos significa que a mistura de NaCl 100 mM à amostra de TTR-WT a pH 2,0 foi feita imediatamente antes de se injectar a amostra na coluna.

Prepararam-se ainda amostras de TTR-WT a pH 2,0 com sal para tempos mais longos de incubação, no sentido de seguir o desaparecimento do *molten globule* ao longo do processo de agregação. Na Figura 3.15 encontram-se os cromatogramas obtidos através do sistema SEC-MALLS para tempos de incubação de 2, 5 e 24 horas. Mesmo 24 horas após o início da agregação, ainda é visível uma percentagem mínima de monómero (MG) em solução.

Analisando todos os cromatogramas das Figuras 3.14 e 3.15, verifica-se que à medida que o pico de *molten globule* diminui de intensidade, vai aumentando a intensidade do pico dos agregados, indicando que a massa molecular média aparente destes agregados vai aumentando ao longo do tempo. Por outro lado, para os tempos de incubação 2, 5 e 24 horas, os agregados são eluídos no volume de exclusão ou externo da coluna, o que indica que estes agregados têm massas moleculares aparentes superiores a 500 kDa.



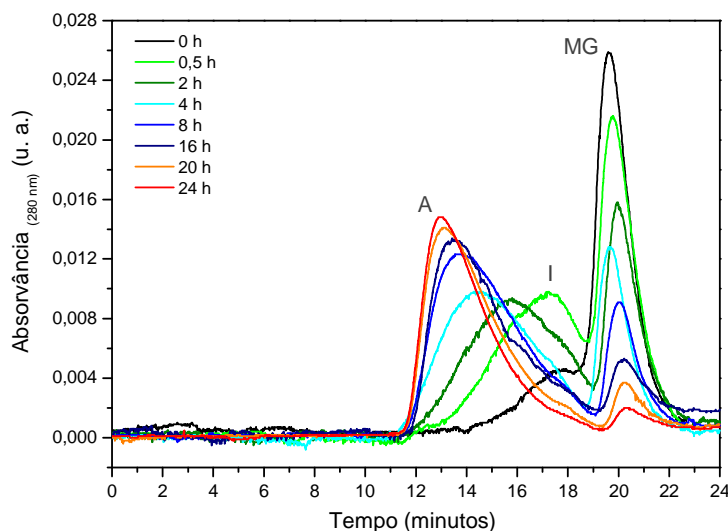


**Figura 3.15: Cromatogramas de SEC-MALLS de TTR-WT 16  $\mu$ M, pH 2,0 e após a adição de NaCl 100 mM para tempos de incubação até 24 horas.** Cromatogramas recolhidos a vários tempos de incubação: 2, 5 e 24 horas. Cada cromatograma foi obtido a uma velocidade de fluxo de 0,5 mL/mim em HCl 10 mM, pH 2,0 e NaCl 100 mM. Aplicaram-se 100  $\mu$ L de cada amostra. MG corresponde ao *molten globule*, A corresponde a agregados e I corresponde a um intermediário oligomérico de agregação.

É interessante notar que nos primeiros tempos de incubação (0 e 2 minutos) há um pequeno pico (I) aos 17 minutos de eluição, com uma massa molecular média aparente de 70 a 90 kDa, que corresponde ao ombro observado nos restantes cromatogramas (Figuras 3.14 e 3.15). Devido à baixa intensidade deste ombro verificada nos ensaios com tempos de incubação a partir dos 10 minutos, não foi possível calcular as massas moleculares médias aparentes destas espécies nos restantes cromatogramas. Isto pode querer dizer que logo na fase inicial do processo de agregação se forma uma espécie oligomérica amiloidogénica intermediária que aparenta ter entre 5 e 7 unidades monoméricas (5 monómeros  $\approx$  69 kDa; 7 monómeros  $\approx$  96 kDa).

Dos vários cromatogramas obtidos ao longo do processo de agregação para TTR-WT 16  $\mu$ M (Figuras 3.14 e 3.15), observa-se que o sistema de cromatografia não é capaz de separar os diferentes agregados que se formam ao longo do processo de agregação da TTR-WT. Desta forma, realizou-se uma nova experiência de agregação, diminuindo a concentração de TTR-WT o mais possível. Ao diminuir a concentração de proteína espera-se que o processo de agregação se torne mais lento, facilitando a separação e identificação dos diferentes agregados no processo.

Na Figura 3.16 estão representados os diversos ensaios de SEC-MALLS a vários tempos de incubação após a adição de NaCl 100 mM a TTR-WT 2,3  $\mu$ M.



**Figura 3.16: Cromatogramas de SEC-MALLS de TTR-WT 2,3  $\mu\text{M}$ , pH 2,0 e após a adição de NaCl 100 mM para tempos de incubação até 24 horas.** Cromatogramas recolhidos a vários tempos de incubação: 0, 30 minutos, 2, 4, 8, 16, 20 e 24 horas. Cada cromatograma foi obtido a uma velocidade de fluxo de 0,5 mL/mim em HCl 10 mM, pH 2,0 e NaCl 100 mM. Aplicaram-se 700  $\mu\text{L}$  de cada amostra. MG corresponde ao *molten globule*, A corresponde a agregados e I corresponde a um intermediário oligomérico de agregação.

Analisando e comparando estes ensaios com os ensaios anteriores de SEC-MALLS de TTR-WT 16  $\mu\text{M}$  (Figuras 3.14 e 3.15) verifica-se que, de facto, o processo de agregação ficou mais lento com a diminuição da concentração de proteína. Ao final de 24 horas, ainda há uma percentagem significativa de *molten globule*.

Nestes ensaios, as massas moleculares médias aparentes do *molten globule*, apresentam valores entre 25 a 31 kDa. Adicionalmente, é ainda mais evidente a formação de uma espécie intermediária de oligomerização, em especial, no ensaio de 30 minutos de incubação, com um tempo de eluição aproximadamente aos 17 minutos (Figura 3.16). Verifica-se que esta espécie intermediária oligomérica se forma logo no ensaio de 0 minutos e que, para os restantes ensaios com tempos de incubação superiores a 30 minutos, o cromatograma também apresenta um pequeno ombro para o mesmo tempo de eluição (17 minutos). No entanto, como a intensidade do ombro na maior parte dos ensaios é muito baixa (2, 4, 8, 16, 20 e 24 horas), não foi possível calcular os pesos moleculares médios aparentes para estes ensaios. Contudo, para os ensaios de 0 e 30 minutos, as massas moleculares médias aparentes obtidas para o pico dos agregados apresentam valores compreendidos entre 95 e 127 kDa, o que equivale a um oligómero constituído por 7 a 10 unidades monoméricas. Estes resultados estão globalmente de acordo com os resultados anteriormente obtidos para

uma concentração mais elevada de TTR-WT (Figuras 3.14 e 3.15), havendo portanto a formação de um oligómero intermediário do processo de agregação com cerca de 6 a 10 subunidades monoméricas.

Estes resultados experimentais obtidos por SEC-MALLS de TTR-WT a 2,3 e 16  $\mu\text{M}$  estão de acordo com experiências realizadas no nosso laboratório por *Photo Induced Cross-Linking of Unmodified Proteins* (PICUP) que mostraram que as espécies monoméricas da TTR-WT e TTR-L55P se associam uma a uma até à formação de um octómero, pelo menos (Correia, 2005; Silva, 2006). Desta forma, combinando os resultados de SEC-MALLS e PICUP tudo indica que efectivamente haja a presença de um intermediário oligomérico logo na fase inicial do processo de agregação da TTR, constituído por cerca de 6 a 10 subunidades monoméricas.

### **3.8 Cinética da Fase Inicial do Processo de Agregação da TTR-WT a pH 2,0 e NaCl 100 mM**

Com o objectivo de determinar o valor das constantes de velocidade para a mudança do estado conformacional do monómero da TTR-WT e/ou para a formação dos primeiros oligómeros no processo de agregação da TTR-WT, monitorizou-se a variação da elipticidade do resíduo médio no UV-longínquo a 213 nm, a variação da elipticidade do resíduo médio no UV-próximo a 291 nm e a variação da intensidade de emissão de fluorescência a 380 nm usando um comprimento de onda de excitação de 290 nm. Para todas as experiências realizadas, a concentração final de TTR-WT foi de 16  $\mu\text{M}$ .

De forma a encontrar um mecanismo cinético que se adeque a estes resultados experimentais, foram testados dois mecanismos. Inicialmente, tentou-se ajustar aos dados um mecanismo simples de dois estados (Monómero Desnaturado  $\rightarrow$  Pequenos Agregados), embora o ajuste aos pontos experimentais não tenha sido bem sucedido. Seguidamente, tentou-se ajustar aos dados um mecanismo que sugere a presença de um intermediário (Monómero Desnaturado  $\rightarrow$  Intermediário  $\rightarrow$  Pequenos Agregados) e verificou-se que este mecanismo era apropriado aos pontos experimentais obtidos para cada técnica (Figura 3.17). Segundo o modelo de agregação proposto por Lindgren *et al.* (2005) e segundo os resultados experimentais obtidos no presente trabalho por SEC-MALLS, CD e fluorescência, tudo indica que o intermediário amiloidogénico que se forma à medida que desaparece o monómero desnaturado é

um monómero parcialmente desnaturado, com grande percentagem de estrutura secundária ordenada e estrutura terciária não-nativa (*molten globule*) que vai agregando ao longo do tempo. Assim, o mecanismo mais simples e que mais se adequa aos resultados experimentais obtidos é traduzido por:



onde  $U$  representa monómero desnaturado,  $MG$  representa *molten globule* e  $SA$  representa pequenos agregados.

A equação diferencial da velocidade para o desaparecimento do reagente monomérico desnaturado ao longo do tempo é dada pela expressão (Formosinho e Arnaut, 2003):

$$\frac{d[U]}{dt} = -k_1 [U] \quad (3.1)$$

onde  $[U]$  representa a concentração molar de monómero desnaturado ao longo do tempo. No instante  $t = 0$ , tem-se  $[U] = C$ , sendo  $C$  a concentração total de proteína. Integrando a Equação 3.1, para a condição inicial de  $t = 0$ , obtém-se:

$$\int_C^{[U]} \frac{d[U]}{[U]} = -k_1 \int_0^t dt \quad (3.2)$$

que é a lei integrada da velocidade e que permite determinar a concentração molar de proteína desnaturada ao longo do tempo:

$$[U] = C e^{-k_1 t} \quad (3.3)$$

De acordo com o modelo estabelecido, a variação da concentração do intermediário monomérico compacto em função do tempo depende da velocidade de desaparecimento do monómero desnaturado e da velocidade de formação dos pequenos agregados. Assim, a variação da concentração do monómero compacto ao longo do tempo é dada pela seguinte equação diferencial (Formosinho e Arnaut, 2003):

$$\frac{d[MG]}{dt} = k_1 [U] - k_2 [MG] \quad (3.4)$$

Tendo em conta que a concentração de  $U$  é dada pela Equação 3.3 e que  $[MG] = 0$  para  $t = 0$ , a equação integral para a dependência da concentração de  $MG$  com o tempo é dada pela expressão:

$$[MG] = \frac{k_1}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) C \quad (3.5)$$

válida para o caso em que  $k_1 \neq k_2$ .

O produto  $SA$  é formado pelo decaimento do intermediário  $MG$  e a sua variação da concentração com o tempo é dada pela equação diferencial 3.6 (Formosinho e Arnaut, 2003):

$$\frac{d[SA]}{dt} = k_2 [MG] \quad (3.6)$$

Tendo em consideração a Lei da Conservação da Massa em que a todos os tempos da reacção a massa total permanece constante, a soma das concentrações de todas as espécies presentes em solução é dada pela Equação 3.7:

$$C = [U] + [MG] + [SA] \quad (3.7)$$

e resolvendo em ordem à concentração dos pequenos agregados obtém-se:

$$[SA] = C - [U] - [MG] \quad (3.8)$$

Da substituição das Equações 3.3 e 3.5 na Equação 3.8 resulta na dependência da concentração de  $SA$  com o tempo:

$$[SA] = \left( 1 + \frac{k_1 e^{-k_2 t} - k_2 e^{-k_1 t}}{k_2 - k_1} \right) C \quad (3.9)$$

A intensidade do sinal de CD e de fluorescência,  $I_S$ , corresponde ao somatório da intensidade de sinal proveniente das espécies presentes em solução ( $I_U$ ,  $I_{MG}$  e  $I_{SA}$ ):

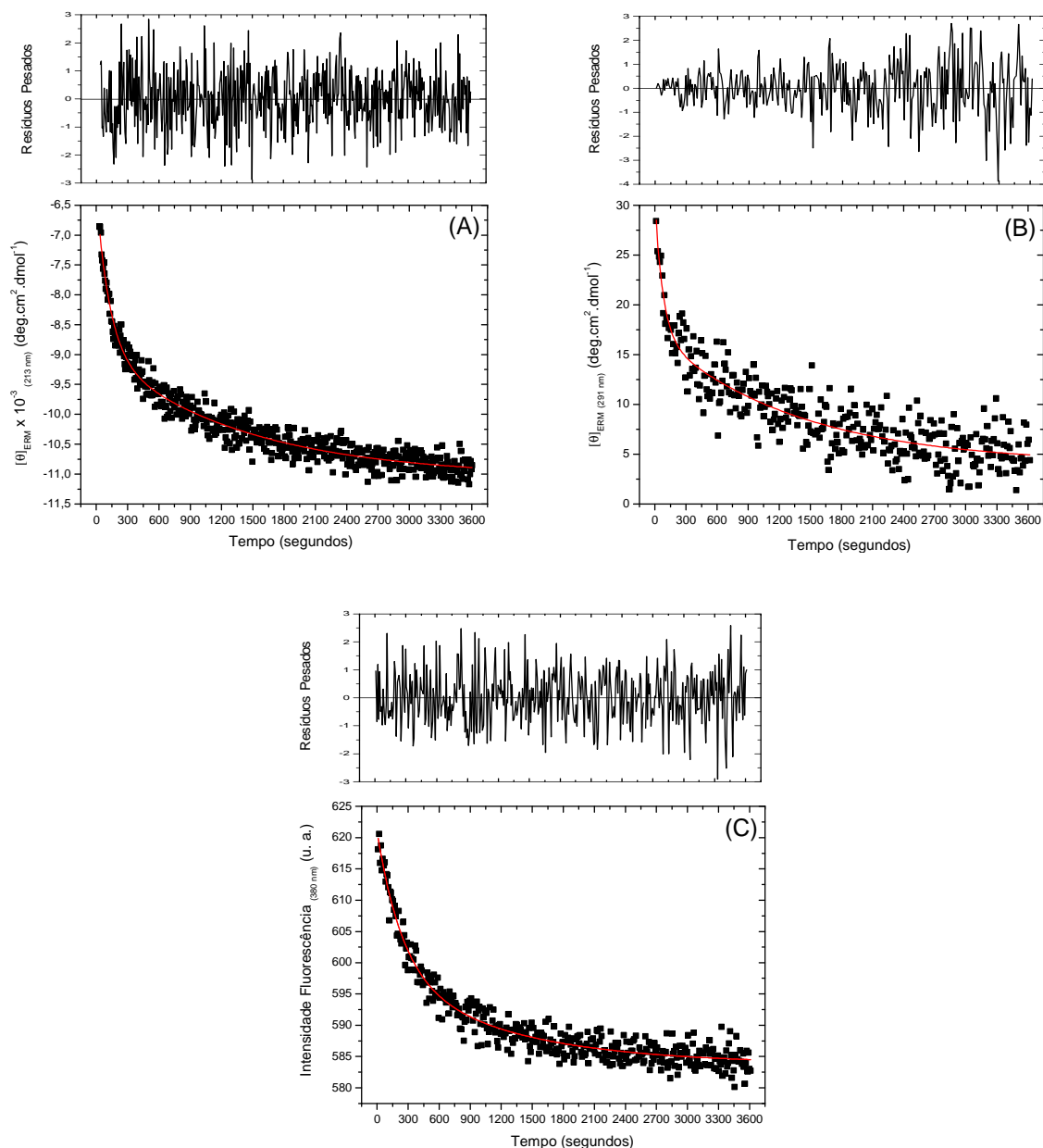
$$I_S = \sum I_i [i] = I_U [U] + I_{MG} [MG] + I_{SA} [SA] \quad (3.10)$$

Assim, no caso do modelo cinético acima considerado (Esquema I), a intensidade do sinal quer do CD quer da fluorescência é dada pela seguinte expressão:

$$I_S = I_U e^{-k_1 t} C + I_{MG} \frac{k_1}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) C + I_{SA} \left( 1 + \frac{k_1 e^{-k_2 t} - k_2 e^{-k_1 t}}{k_2 - k_1} \right) C \quad (3.11)$$

Para determinar as constantes de velocidade aparente  $k_1$  e  $k_2$  do início do processo de agregação da TTR-WT, ajustou-se a função não-linear (Equação 3.11) aos valores experimentais de intensidade de sinal de CD e fluorescência em função do tempo para cada experiência (Figura 3.17), usando o programa *Origin7.0* (*OriginLab Corporation*). A constante cinética  $k_1$  está relacionada com a mudança do estado conformacional monomérico e  $k_2$  está relacionada com a formação das primeiras espécies oligoméricas no processo de agregação da TTR-WT.

Na Tabela 3.1 encontram-se os valores de  $k_1$  e  $k_2$  obtidos a partir do ajuste não-linear aos pontos experimentais para as várias técnicas. Como  $k_1$  é maior que  $k_2$ , conclui-se que a alteração conformacional do monómero desnaturado em *molten globule* é mais rápida que a formação dos pequenos agregados, sendo esta última fase o passo determinante da velocidade da reacção na fase inicial de agregação da TTR-WT. Os valores obtidos para  $k_1$  pelas três técnicas e para cada ensaio são valores na mesma ordem de grandeza e muito próximos entre si. O mesmo acontece para  $k_2$ . No entanto, apenas os valores obtidos por CD no UV-próximo são mais discordantes para  $k_1$  e  $k_2$  face aos outros valores obtidos, principalmente no segundo ensaio.



**Figura 3.17:** Cinética da fase inicial do processo de agregação de TTR-WT 16  $\mu\text{M}$ , a pH 2,0 e após a adição de NaCl 100 mM, seguida por CD e fluorescência. (A) CD no UV-longínquo monitorizado a 213 nm, usando uma cuvete com percurso óptico de 0,2 mm, tempo de integração para cada ponto de 6 segundos e tempo de mistura manual de 35 segundos; (B) CD no UV-próximo monitorizado a 291 nm, usando uma cuvete com percurso óptico de 5 mm, tempo de integração para cada ponto de 10 segundos e tempo de mistura manual de 11 segundos e (C) fluorescência monitorizada a 380 nm com excitação a 290 nm, usando uma cuvete com percurso óptico de 5x5 mm, tempo de integração para cada ponto de 9 segundos e tempo de mistura manual de 10 segundos. Todos os ensaios foram realizados a uma temperatura de 24 °C. A linha vermelha representa o ajuste da função não-linear (Equação 3.11) aos pontos experimentais (■). Os painéis superiores a cada gráfico representam os resíduos pesados.

**Tabela 3.1: Constantes de velocidade da alteração do estado conformacional do monómero ( $k_1$ ) e da formação dos primeiros oligómeros ( $k_2$ ) de TTR-WT 16  $\mu\text{M}$ , a pH 2,0 e NaCl 100 mM, seguida por CD e Fluorescência. Os valores obtidos por CD no UV-próximo para  $k_1$  e  $k_2$  são os mais discordantes face aos restantes, nomeadamente no segundo ensaio.**

Técnica	Ensaio 1		Ensaio 2	
	$k_1$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_2$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_1$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_2$ ( $\text{s}^{-1}$ )
Dicroísmo Circular UV-Longínquo	$0,0078 \pm 0,0007$	$0,00072 \pm 0,00006$	$0,0067 \pm 0,0006$	$0,00061 \pm 0,00007$
Dicroísmo Circular UV-Próximo	$0,013 \pm 0,0014$	$0,00074 \pm 0,00033$	$0,041 \pm 0,022$	$0,0014 \pm 0,00013$
Fluorescência	$0,0085 \pm 0,0005$	$0,00059 \pm 0,00014$	$0,0041 \pm 0,0006$	$0,00084 \pm 0,00021$

A Tabela 3.2 mostra os valores médios de  $k_1$  e  $k_2$  obtidos no total das três técnicas e nos dois ensaios, desprezando o ensaio 2 do CD no UV-próximo.

**Tabela 3.2: Constantes médias de velocidade da alteração do estado conformacional do monómero ( $k_1$ ) e da formação dos primeiros oligómeros ( $k_2$ ) de TTR-WT 16  $\mu\text{M}$ , a pH 2,0 e NaCl 100 mM. Valores médios obtidos no total de dois ensaios de fluorescência e CD no UV-longínquo e um ensaio de CD no UV-próximo.**

	( $\text{s}^{-1}$ )	( $\text{min}^{-1}$ )
$k_1$	$0,0079 \pm 4,4 \times 10^{-3}$	$0,47 \pm 0,26$
$k_2$	$0,0007 \pm 8,0 \times 10^{-5}$	$0,042 \pm 0,005$

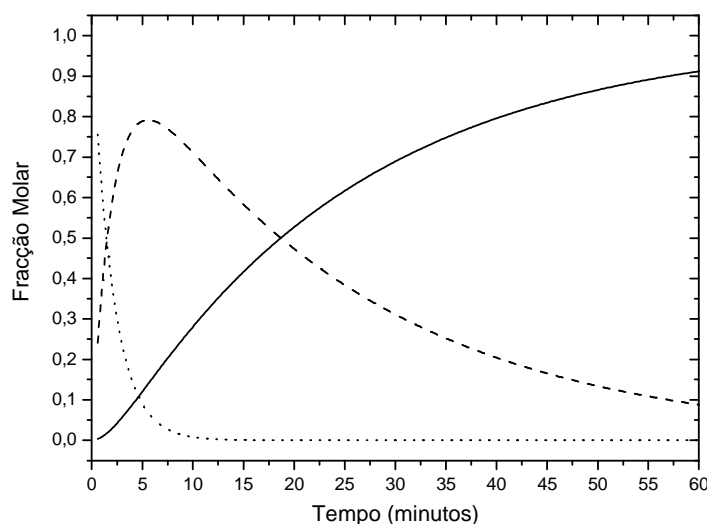
Para a gama de concentrações usadas de TTR-WT a 16  $\mu\text{M}$  e a 24  $^\circ\text{C}$ , a constante de alteração conformacional do monómero é uma ordem de magnitude superior à constante de formação dos pequenos agregados.

A Figura 3.18 ilustra a evolução da fracção molar de  $U$ ,  $MG$  e  $SA$  ao longo do tempo, de acordo com os valores médios das constantes cinéticas apresentadas na Tabela 3.2. Segundo o modelo proposto no presente trabalho para a fase inicial de agregação da TTR-WT ( $U \rightarrow MG \rightarrow SA$ ) e tendo em conta a Figura 3.18 que mostra que aos 10 minutos todo o monómero desnaturado já foi consumido, a espécie



monomérica da TTR-WT a que correspondem os picos de monómero nos ensaios de SEC-MALLS para tempos de incubação superiores a 10 minutos só podem corresponder ao *molten globule* (Figuras 3.14 e 3.15). A concentração de *molten globule* é máxima aproximadamente aos 6 minutos e ao fim de uma hora, ainda há aproximadamente 10% de *molten globule* em solução.

A Figura 3.18 mostra que a partir dos 2 até aos 60 minutos há um aumento da concentração de agregados de aproximadamente 90%. Analisando todos os cromatogramas representados na Figura 3.14 verifica-se que nos tempos de incubação de 0 a 2 minutos há formação de oligómeros com massas moleculares médias aparentes de 70 a 90 kDa e que para os tempos de incubação de 10, 30 e 60 minutos há um aumento brusco das massas moleculares médias aparentes destes agregados até 380 kDa.

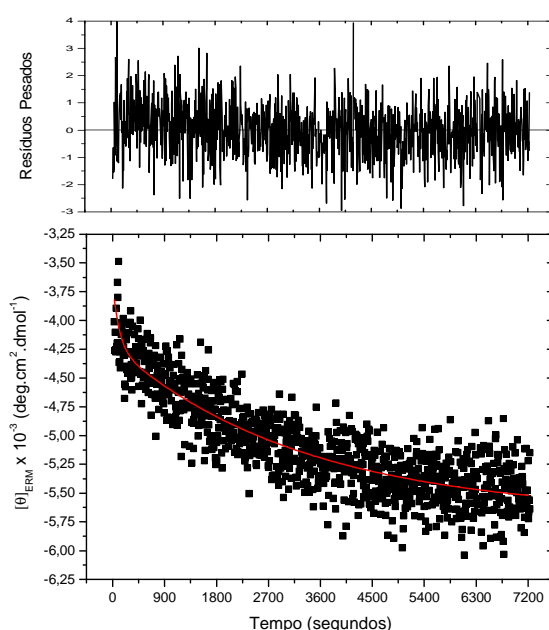


**Figura 3.18: Variação da fracção molar de monómero, *molten globule* e pequenos agregados ao longo do tempo de TTR-WT 16  $\mu\text{M}$ , pH 2,0 e NaCl 100 mM.** (---) representa a variação da fracção molar de monómero desnaturado (*U*), (- - -) representa a variação da fracção molar de *molten globule* (*MG*) e (—) representa a variação da fracção molar de pequenos agregados (*SA*), ao longo do tempo. Os valores usados para as constantes cinéticas foram:  $k_1 = 0,47 \text{ min}^{-1}$  e  $k_2 = 0,042 \text{ min}^{-1}$ .

De modo a testar a influência da concentração de proteína na fase inicial do processo de agregação da TTR-WT no valor das constantes de velocidades aparentes  $k_1$  (constante de velocidade da mudança do estado conformacional do monómero da TTR-WT) e  $k_2$  (constante de velocidade da formação dos primeiros oligómeros no processo de agregação da TTR-WT), monitorizou-se a variação da elipticidade do resíduo médio no UV-longínquo a 213 nm, para uma concentração final de TTR-WT de 2,3  $\mu\text{M}$ . De acordo com os resultados experimentais de agregação obtidos por

SEC-MALLS a esta mesma concentração de TTR-WT, observou-se que a agregação era mais lenta comparativamente aos ensaios de agregação com uma concentração mais elevada de TTR-WT (16  $\mu\text{M}$ ). Assim, como a agregação é mais lenta, o ensaio cinético neste caso teve uma duração total de 2 horas, e não apenas uma hora como nos ensaios cinéticos anteriormente analisados. A variação da elipticidade do resíduo médio em função do tempo está apresentada na Figura 3.19.

Para determinar as constantes cinéticas aparentes  $k_1$  e  $k_2$ , ajustou-se a função não-linear (Equação 3.11) aos valores experimentais de intensidade do sinal de CD em função do tempo. O ajuste do mecanismo proposto para a reacção de agregação da TTR-WT aos dados experimentais está apresentado também na Figura 3.19.



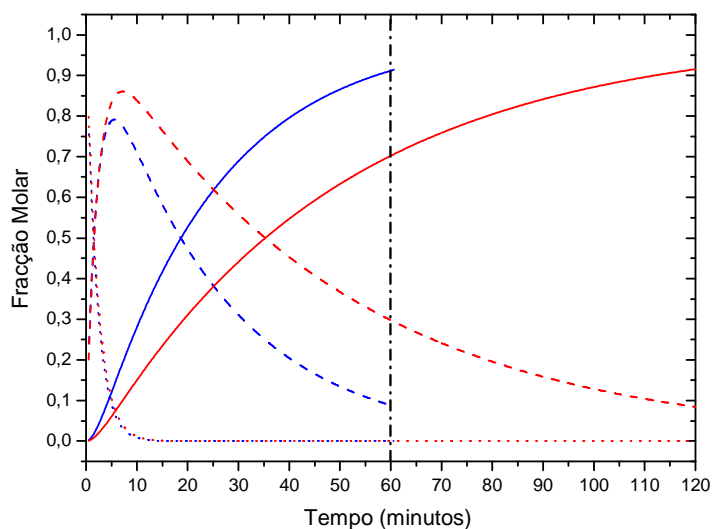
**Figura 3.19: Cinética da fase inicial do processo de agregação de TTR-WT 2,3  $\mu\text{M}$ , a pH 2,0 e após a adição de NaCl 100 mM, seguida por CD no UV-longínquo.** CD no UV-longínquo monitorizado a 213 nm, usando uma cuvete com percurso óptico de 1 mm, tempo de integração para cada ponto de 6 segundos e tempo de mistura manual de 30 segundos. O ensaio foi realizado a uma temperatura de 24 °C. A linha vermelha representa o ajuste da função não-linear (Equação 3.11) aos pontos experimentais (■). O painel superior representa os resíduos pesados.

Segundo a Figura 3.19, o ajuste aos pontos experimentais com a função de ajuste proposta aparenta ser também apropriado, ainda que não tão bom como os ajustes observados para os ensaios a 16  $\mu\text{M}$ . Na Tabela 3.3 encontram-se os valores de  $k_1$  e  $k_2$  obtidos a partir do ajuste não-linear aos pontos experimentais.

**Tabela 3.3: Constantes médias de velocidade da alteração do estado conformacional do monómero ( $k_1$ ) e da formação dos primeiros oligómeros ( $k_2$ ) de TTR-WT 2,3  $\mu\text{M}$ , pH 2,0 e NaCl 100 mM. Os valores apresentados são os valores médios obtidos em CD no UV-longínquo para um total de três ensaios.**

	( $\text{s}^{-1}$ )	( $\text{min}^{-1}$ )
$k_1$	$0,0075 \pm 1,6 \times 10^{-3}$	$0,45 \pm 0,096$
$k_2$	$0,00035 \pm 5,7 \times 10^{-5}$	$0,021 \pm 0,0034$

Comparando estas constante cinéticas com os ensaios de TTR-WT a 16  $\mu\text{M}$  vê-se que  $k_1$  não sofre alterações, enquanto que  $k_2$  é menor. Isto significa que a mudança conformacional do monómero desnaturado para *molten globule* é independente da concentração, ao passo que a formação dos pequenos agregados já é um processo que depende da concentração de TTR-WT.



**Figura 3.20: Variação da fracção molar de monómero, *molten globule* e pequenos agregados ao longo do tempo para TTR-WT 2,3  $\mu\text{M}$  (a vermelho) e 16  $\mu\text{M}$  (a azul), pH 2,0 e NaCl 100 mM. (---) representa a variação da fracção molar de monómero desnaturado ( $U$ ), (- - -) representa a variação da fracção molar de *molten globule* ( $MG$ ) e (—) representa a variação da fracção molar de pequenos agregados ( $SA$ ), ao longo do tempo. A azul ilustra-se o caso em que  $k_1 = 0,47 \text{ min}^{-1}$  e  $k_2 = 0,042 \text{ min}^{-1}$  e a vermelho ilustra-se o caso em que  $k_1 = 0,45 \text{ min}^{-1}$  e  $k_2 = 0,021 \text{ min}^{-1}$ .**

A Figura 3.20 ilustra a evolução da fracção molar de *U*, *MG* e *SA* ao longo do tempo a 2,3  $\mu\text{M}$ , de acordo com os valores médios das constantes cinéticas apresentadas na Tabela 3.2, comparativamente com os resultados obtidos a 16  $\mu\text{M}$  (Figura 3.18).

### 3.9 Cinética da Fase Final do Processo de Agregação da TTR-WT a pH 2,0 e NaCl 100 mM

A formação de fibras amilóides normalmente ocorre através de um processo inicial de nucleação seguido de um processo de crescimento. Na fase de nucleação, um núcleo ordenado de agregados constituídos por unidades monoméricas é formado durante uma *lag phase*, depois de se atingir uma concentração crítica das espécies monoméricas. A etapa de formação do intermediário amiloidogénico (núcleo) é a etapa determinante do processo de formação de fibras amilóides (Rochet e Lansbury Jr, 2000). Depois da nucleação, ocorre um crescimento rápido até à formação de fibras amilóides por associação de monómeros ou oligómeros com o intermediário de nucleação amiloidogénico (Rochet e Lansbury Jr, 2000; Chi *et al.*, 2003; Chiti e Dobson, 2006). Em doentes com amiloidoses, verificou-se sempre um período de vários anos entre o aparecimento de uma proteína potencialmente amiloidogénica até à deposição extracelular de fibras amilóides (Pepys, 2006).

De acordo com os dados experimentais apresentados anteriormente na Figura 3.11, a partir do primeiro dia de incubação de TTR-WT 16  $\mu\text{M}$ , a pH 2,0 e NaCl 100 mM, verifica-se um comportamento aproximadamente sigmoidal da variação do sinal de CD no UV-longínquo, a 217 nm, que sugere o modelo de formação de fibras acima descrito. O modelo cinético de agregação proposto por Finke-Watzky adequa-se aos resultados experimentais obtidos visto ser apropriado para o mecanismo de formação de fibras amilóides. Este modelo apresenta uma etapa de nucleação e uma etapa de crescimento (Morris e Finke, 2009):



onde *SA* representa os pequenos agregados e *A* representa grandes agregados.

As constantes de velocidade para cada etapa são  $k_3$  e  $k_4$ .

A equação diferencial da velocidade para o desaparecimento de SA ao longo do tempo é dada pela seguinte equação diferencial:

$$\frac{d[SA]}{dt} = -k_3 [SA] - k_4 [SA] [A] \quad (3.12)$$

Tendo em consideração a Lei da Conservação da Massa, a soma das concentrações de todas as espécies presentes em solução é dada pela Equação 3.13:

$$C = [SA] + [A] \quad (3.13)$$

e resolvendo em ordem à concentração dos agregados obtém-se:

$$[A] = C - [SA] \quad (3.14)$$

Substituindo a Equação 3.14 na Equação 3.12 e integrando para a condição inicial de que para  $t = 0$  vem  $[SA] = C$ , obtém-se:

$$[SA] = \frac{\frac{k_3}{k_4} + C}{1 + \frac{k_3}{k_4 C} e^{(k_3 + k_4 C)t}} \quad (3.15)$$

Para determinar a velocidade de formação de A, estabelece-se:

$$\frac{d[A]}{dt} = k_3[SA] - k_4 [SA][A] + k_4 [A]^2 \quad (3.16)$$

Tendo em conta a Equação 3.14, substitui-se a concentração de SA pela Equação 3.15 e obtém-se a dependência da concentração de A com o tempo:

$$[A] = C - \frac{\frac{k_3}{k_4} + C}{1 + \frac{k_3}{k_4 C} e^{(k_3 + k_4 C)t}} \quad (3.17)$$

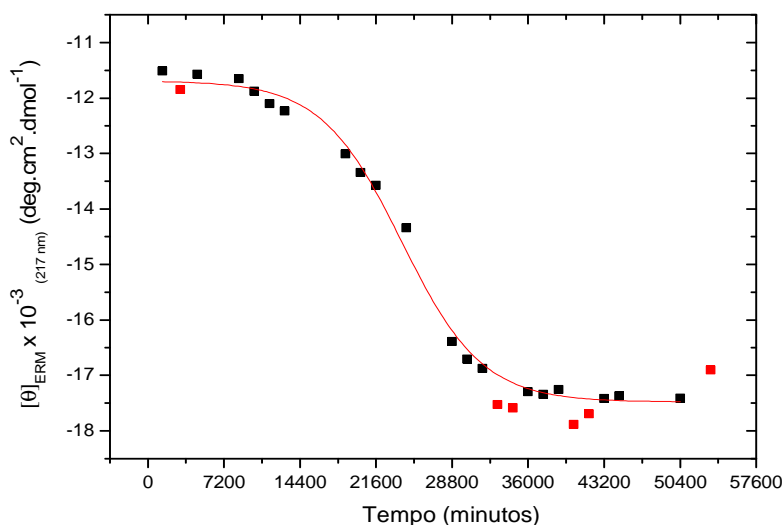
Como já foi referido na Secção 3.8, a intensidade do sinal de CD,  $I_s$ , corresponde ao somatório da contribuição das espécies presentes em solução. Assim, para este modelo cinético de agregação tem-se que:

$$I_S = I_{SA} [SA] + I_A [A] \quad (3.18)$$

e substituindo as Equações 3.15 e 3.17 na Equação 3.18, a intensidade do sinal de CD é dado pela seguinte expressão:

$$I_S = I_{SA} \left( \frac{\frac{k_3}{k_4} + C}{1 + \frac{k_3}{k_4 C} e^{(k_3+k_4 C)t}} \right) + I_A \left( C - \frac{\frac{k_3}{k_4} + C}{1 + \frac{k_3}{k_4 C} e^{(k_3+k_4 C)t}} \right) \quad (3.19)$$

Com a finalidade de determinar o valor das constantes de velocidade para a nucleação de agregados intermediários amiloidogénicos formados através de agregados mais pequenos ( $k_3$ ) e para o crescimento destes agregados até ao aparecimento de fibras amilóides ( $k_4$ ), ajustou-se a função não-linear (Equação 3.19) aos valores experimentais da intensidade de sinal de CD no UV-longínquo em função do tempo, usando o programa *Origin7.0* (*OriginLab Corporation*). O ajuste do mecanismo proposto para a reacção de agregação até à formação de fibras amilóides da TTR-WT 16  $\mu\text{M}$  aos dados experimentais está apresentado na Figura 3.21.



**Figura 3.21: Cinética de agregação de TTR-WT 16  $\mu\text{M}$ , a pH 2,0 e NaCl 100 mM, seguida por CD no UV-longínquo a 217 nm.** A linha vermelha representa o ajuste da função não-linear (Equação 3.19) apenas aos pontos experimentais (■). Os pontos experimentais (■) não foram considerados para o ajuste da função não-linear.

Através da Figura 3.21 verifica-se que o ajuste aos pontos experimentais com a função de ajuste proposta parece ser adequado, embora haja alguns pontos experimentais que parecem estar desviados relativamente ao perfil sigmoidal do

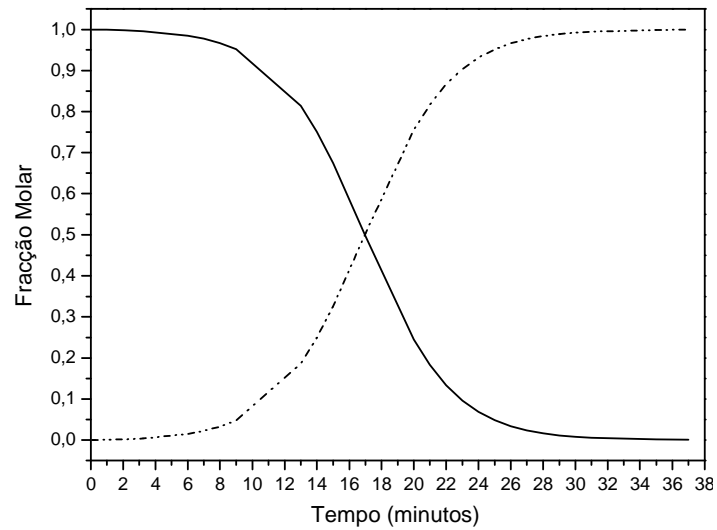
processo de agregação. Por este motivo, esses pontos não foram considerados no ajuste realizado. Na Tabela 3.4 encontram-se as constantes cinéticas de nucleação e crescimento dos agregados amiloidogénicos no processo de formação de fibras amilóides da proteína transtirretina normal.

**Tabela 3.4: Constantes de velocidade para a nucleação de agregados intermediários ( $k_3$ ) e para o crescimento de agregados até à formação de fibras amilóides ( $k_4$ ) de TTR-WT 16  $\mu\text{M}$ , pH 2,0 e NaCl 100 mM. Valores obtidos para  $k_3$  e  $k_4$  a partir do ajuste não-linear (Equação 3.19) aos pontos experimentais da Figura 3.21.**

	(dias <sup>-1</sup> )	(min <sup>-1</sup> )
$k_3$	$6,9 \times 10^{-4} \pm 3,0 \times 10^{-4}$	$4,8 \times 10^{-7} \pm 2,1 \times 10^{-7}$
	( $\mu\text{M}^{-1}\text{dias}^{-1}$ )	( $\mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$ )
$k_4$	$0,37 \pm 0,03$	$2,6 \times 10^{-4} \pm 0,2 \times 10^{-4}$

Através da análise para os valores obtidos para as constantes cinéticas de velocidade conclui-se que a constante de nucleação ( $k_3$ ) é muito mais lenta que a constante de crescimento ( $k_4$ ). Estes valores das constantes cinéticas estão concordantes com a literatura, em que a fase de nucleação ou formação de um núcleo oligomérico é a fase determinante da reacção de formação de fibras amilóides (Rochet e Lansbury Jr, 2000; Chi *et al.*, 2003; Chiti e Dobson, 2006).

A Figura 3.22 ilustra a evolução da fracção molar de SA e A ao longo do tempo para uma concentração de TTR-WT de 16  $\mu\text{M}$  e a 24 °C, de acordo com os valores médios das constantes cinéticas apresentadas na Tabela 3.6. Analisando a Figura 3.22 verifica-se que, aproximadamente ao 17<sup>o</sup> dia, a concentração é de 50% para cada espécie em solução. Verifica-se também que ao fim de um mês de incubação, praticamente se consumiu toda a espécie SA, havendo quase 100% da espécie A.



**Figura 3.22: Variação da fracção molar de pequenos e grandes agregados ao longo do tempo de TTR-WT 16  $\mu\text{M}$ , a pH 2,0 e NaCl 100 mM.** (—) representa a variação da fracção molar de pequenos agregados (SA) e (- · · -) representa a variação da fracção molar de grandes agregados (A), ao longo do tempo. Os valores usados para as constantes cinéticas foram:  $k_3 = 6,9 \times 10^{-4} \text{ dias}^{-1}$  e  $k_4 = 0,37 \mu\text{M}^{-1} \text{ dias}^{-1}$ .





## Capítulo 4

# Conclusões



A amilóide está na origem de um complexo grupo de doenças, as amiloidoses. Estas patologias são caracterizadas pela deposição de fibras amilóides de origem proteica. A Doença de Alzheimer, Polineuropatia Amiloidótica Familiar, Encefalopatias Espongiformes, são apenas alguns exemplos deste tipo de patologias.

Estudos dos mecanismos de formação de amilóide apontam para que quando certas proteínas não se organizam correctamente ou não mantêm a estrutura nativa, agregam e originam fibras amilóides insolúveis, caracterizadas por um arranjo tridimensional em folhas- $\beta$ . Isto leva a crer que o mecanismo de formação destas fibras amilóides seja semelhante, apesar das proteínas geradoras de fibras serem diferentes na sequência de aminoácidos e estrutura tridimensional. Tem sido sugerido que os processos de fibrilização passam pela formação de um intermediário não-nativo, com estrutura parcialmente desnaturada que tem tendência a agregar, originando as fibras amilóides. A caracterização estrutural dos intermediários e os caminhos da agregação permanecem por determinar detalhadamente, sendo poucos os dados experimentais disponíveis sobre os intermediários oligoméricos da maioria das proteínas amiloidogénicas.

Este trabalho teve por objectivo descrever e caracterizar cineticamente o processo de agregação da proteína transtirretina até à formação de fibras amilóides. A identificação e caracterização das espécies envolvidas na agregação são de extrema importância, uma vez que pode permitir o desenvolvimento de terapias dirigidas especificamente a este tipo de espécies moleculares.

O método utilizado neste trabalho para a formação de fibras amilóides da TTR-WT foi o método proposto por Lindgren *et al.* (2005), em que se procede à desnaturação ácida, a pH 2,0, da TTR-WT. Esta desnaturação desencadeia um conjunto de alterações conformacionais na proteína, promovendo a formação de monómeros com pouca estrutura terciária e com estrutura secundária maioritariamente ao acaso, ou seja, monómeros desnaturados. De facto, estes monómeros apresentam ainda estrutura secundária ordenada residual (27 %). A adição de NaCl 100 mM aos monómeros desnaturados provoca um ganho imediato de estrutura secundária do tipo folha- $\beta$  e formação de estrutura terciária não-nativa. Segundo Lindgren *et al.*, estas alterações devem-se à passagem do monómero desnaturado (*U*) para uma conformação em *molten globule* (*MG*) com capacidade para agregar (*SA*). Segundo os resultados obtidos por cromatografia de exclusão molecular acoplada a um detector multiangular de dispersão da luz (SEC-MALLS) no presente trabalho, estes agregados formados ao fim de uma hora após a adição de NaCl apresentam uma massa molecular média aparente de aproximadamente 380 kDa. Todos estes dados experimentais permitiram concluir que o processo inicial de agregação da TTR-WT

não se adapta a um processo simples de dois estados, mas a um processo cinético de três estados com a presença de um intermediário não-nativo, o *molten globule*:

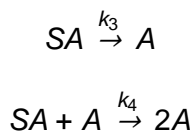


O valor médio das constantes de velocidade aparentes  $k_1$  e  $k_2$  obtido através do ajuste aos dados experimentais para TTR-WT 16  $\mu\text{M}$  foi 0,47  $\text{min}^{-1}$  e 0,042  $\text{min}^{-1}$ , respectivamente. Nas experiências a menor concentração de TTR-WT (2,3  $\mu\text{M}$ ), o valor médio obtido foi para  $k_1$  0,45  $\text{min}^{-1}$  e para  $k_2$  0,021  $\text{min}^{-1}$ . Segundo estes resultados, pode-se constatar que a alteração do estado conformacional do monómero da TTR-WT é um fenómeno rápido e independente da concentração de proteína, ao passo que a formação dos primeiros oligómeros é um processo mais lento e dependente da concentração de proteína. A alteração conformacional da subunidade da proteína transtirretina está de acordo com os modelos de amiloidogénese que considera que a dissociação da TTR em espécies monoméricas parcialmente desnaturadas é um fenómeno fundamental no processo de fibrilogénese (Lai *et al.*, 1996; Quintas *et al.*, 2001; Lindgren *et al.*, 2005).

No início do processo de agregação verificou-se por SEC-MALLS a formação de um intermediário adicional. Este intermediário é um oligómero amiloidogénico constituído por cerca de 6 a 10 subunidades monoméricas, sendo possivelmente o primeiro oligómero (SA) a formar-se no processo de agregação da TTR-WT. Este oligómero poderá constituir uma das unidades básicas para a construção das fibras amilóides. É interessante observar que estes resultados experimentais estão de acordo com os resultados obtidos por Correia (2005) e Silva (2006) através da técnica *Photo Induced Cross-Linking of Unmodified Proteins* (PICUP) em que observaram que na fase inicial do processo de agregação as espécies monoméricas da TTR-WT e TTR-L55P se associam uma a uma até à formação de um oligómero de 8 unidades monoméricas pelo menos, embora nesse trabalho as condições experimentais tenham sido diferentes que as condições experimentais do presente trabalho.

Depois da formação do intermediário oligomérico amiloidogénico e de agregados de elevado peso molecular nas primeiras 24 horas do processo de agregação da TTR-WT, verificou-se por CD no UV-longínquo que se segue uma fase de nucleação durante vários dias. Durante esta fase há a formação de um núcleo de agregados intermediários amiloidogénicos de elevado peso molecular (A). Após a nucleação, segue-se o crescimento mais rápido dos núcleos até à formação de fibras amilóides maduras. Este comportamento para a formação de amilóide da TTR-WT sugere que o intermediário amiloidogénico de nucleação seja outra unidade básica para a construção de fibras amilóides. Os dados experimentais obtidos adequam-se ao

modelo cinético de agregação proposto por Finke-Watzky seguindo um mecanismo de agregação do tipo nucleação-crescimento (Morris e Finke, 2009):



O valor das constantes aparentes de velocidade  $k_3$  e  $k_4$  obtido através do ajuste aos dados experimentais para  $k_3$  foi  $6,9 \times 10^{-4} \text{ dias}^{-1}$  e  $0,37 \mu\text{M}^{-1}\text{dias}^{-1}$ , respectivamente.

Durante o processo de agregação, nos ensaios de fluorescência e CD no UV-próximo, não se registaram grandes alterações da estrutura terciária da proteína, mantendo-se a mesma estrutura não-nativa adquirida desde a formação do *molten globule* até à formação das fibras amilóides. Isto significa que o ambiente químico em torno dos aminoácidos aromáticos é alterado durante o processo de agregação da TTR-WT, relativamente ao ambiente nativo.

Como trabalho futuro e como complemento a estes resultados seria interessante fazer um estudo mais detalhado da influência da concentração de proteína na cinética de agregação da TTR-WT.

Seria ainda interessante fazer estudos análogos aos levados a cabo neste trabalho usando uma temperatura de  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , bem como utilizar diferentes variantes da proteína transtirretina de modo a correlacionar as diferentes constantes cinéticas de todo o processo de agregação com o potencial amiloidogénico de cada variante.

De forma a caracterizar o tamanho dos agregados e a sua morfologia ao longo do processo de agregação, podia-se levar a cabo um estudo detalhado ao longo do tempo por Microscopia Electrónica de Transmissão (TEM).

Também seria interessante fazer ensaios de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) usando a proteína transtirretina com todos os aminoácidos marcados isotopicamente com  $^{13}\text{C}$  e  $^{15}\text{N}$ . Assim, depois da adição de sal à TTR desnaturada acidicamente a pH 2,0, poder-se-ia obter informação a nível da estrutura e dinâmica da proteína ao longo do processo de agregação.

Actualmente, a dinâmica molecular (MD) é uma das ferramentas mais úteis na área da caracterização estrutural de proteínas. Desta forma, seria interessante tentar simular a desnaturação de espécies monoméricas a pH 2,0 por MD, de modo a avaliar quais as alterações estruturais que ocorrem na proteína. Depois desta primeira análise, poder-se-ia aumentar a força iónica do meio de modo a simular a adição de

NaCl, para se examinar em detalhe as alterações conformacionais associadas à formação da espécie monomérica em *molten globule* e aos pequenos agregados iniciais que ocorrem no processo de agregação da proteína transtirretina.

Conjugando toda esta informação com os resultados obtidos neste trabalho, seria mais fácil a caracterização dos diversos passos da agregação da proteína transtirretina. Qualquer passo dado no sentido de entender este processo é importante para o desenvolvimento de novas terapias para a Polineuropatia Amiloidótica Familiar (PAF), Cardiomiopatia Amiloidótica Familiar (CAF) e Amiloidose Senil Sistémica (ASS), bem como para outras amiloidoses.

## Capítulo 5

# Anexos





## Anexo I

Tabela 5.I: Doenças humanas associadas à formação de amiloide (Chiti e Dobson, 2006).

Disease	Aggregating protein or peptide	Number of residues <sup>a</sup>	Native structure of protein or peptide <sup>b</sup>
Neurodegenerative diseases			
Alzheimer's disease <sup>c</sup>	Amyloid $\beta$ peptide	40 or 42 <sup>f</sup>	Natively unfolded
Spongiform encephalopathies <sup>c,e</sup>	Prion protein or fragments thereof	253	Natively unfolded (residues 1–120) and $\alpha$ -helical (residues 121–230)
Parkinson's disease <sup>c</sup>	$\alpha$ -Synuclein	140	Natively unfolded
Dementia with Lewy bodies <sup>c</sup>	$\alpha$ -Synuclein	140	Natively unfolded
Frontotemporal dementia with Parkinsonism <sup>c</sup>	Tau	352–441 <sup>f</sup>	Natively unfolded
Amyotrophic lateral sclerosis <sup>c</sup>	Superoxide dismutase 1	153	All- $\beta$ , Ig like
Huntington's disease <sup>d</sup>	Huntingtin with polyQ expansion	3144 <sup>g</sup>	Largely natively unfolded
Spinocerebellar ataxias <sup>d</sup>	Ataxins with polyQ expansion	816 <sup>g,h</sup>	All- $\beta$ , AXH domain (residues 562–694); the rest are unknown
Spinocerebellar ataxia 17 <sup>d</sup>	TATA box-binding protein with polyQ expansion	339 <sup>g</sup>	$\alpha$ + $\beta$ , TBP like (residues 159–339); unknown (residues 1–158)
Spinal and bulbar muscular atrophy <sup>d</sup>	Androgen receptor with polyQ expansion	919 <sup>g</sup>	All- $\alpha$ , nuclear receptor ligand-binding domain (residues 669–919); the rest are unknown
Hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy <sup>d</sup>	Atrophin-1 with polyQ expansion	1185 <sup>g</sup>	Unknown
Familial British dementia <sup>d</sup>	ABri	23	Natively unfolded
Familial Danish dementia <sup>d</sup>	ADan	23	Natively unfolded
Nonneuropathic systemic amyloidoses			
AL amyloidosis <sup>c</sup>	Immunoglobulin light chains or fragments	~90 <sup>f</sup>	All- $\beta$ , Ig like
AA amyloidosis <sup>c</sup>	Fragments of serum amyloid A protein	76–104 <sup>f</sup>	All- $\alpha$ , unknown fold
Familial Mediterranean fever <sup>c</sup>	Fragments of serum amyloid A protein	76–104 <sup>f</sup>	All- $\alpha$ , unknown fold
Senile systemic amyloidosis <sup>c</sup>	Wild-type transthyretin	127	All- $\beta$ , prealbumin like
Familial amyloidotic polyneuropathy <sup>d</sup>	Mutants of transthyretin	127	All- $\beta$ , prealbumin like
Hemodialysis-related amyloidosis <sup>c</sup>	$\beta$ 2-microglobulin	99	All- $\beta$ , Ig like
ApoAI amyloidosis <sup>d</sup>	N-terminal fragments of apolipoprotein AI	80–93 <sup>f</sup>	Natively unfolded
ApoAII amyloidosis <sup>d</sup>	N-terminal fragment of apolipoprotein AII	98 <sup>i</sup>	Unknown
ApoAIV amyloidosis <sup>c</sup>	N-terminal fragment of apolipoprotein AIV	~70	Unknown
Finnish hereditary amyloidosis <sup>d</sup>	Fragments of gelsolin mutants	71	Natively unfolded
Lysozyme amyloidosis <sup>d</sup>	Mutants of lysozyme	130	$\alpha$ + $\beta$ , lysozyme fold
Fibrinogen amyloidosis <sup>d</sup>	Variants of fibrinogen $\alpha$ -chain	27–81 <sup>f</sup>	Unknown
Icelandic hereditary cerebral amyloid angiopathy <sup>d</sup>	Mutant of cystatin C	120	$\alpha$ + $\beta$ , cystatin like

(Continued)

## Capítulo 5

Disease	Aggregating protein or peptide	Number of residues <sup>a</sup>	Native structure of protein or peptide <sup>b</sup>
Nonneuropathic localized diseases			
Type II diabetes <sup>c</sup>	Amylin, also called islet amyloid polypeptide (IAPP)	37	Natively unfolded
Medullary carcinoma of the thyroid <sup>c</sup>	Calcitonin	32	Natively unfolded
Atrial amyloidosis <sup>c</sup>	Atrial natriuretic factor	28	Natively unfolded
Hereditary cerebral haemorrhage with amyloidosis <sup>d</sup>	Mutants of amyloid $\beta$ peptide	40 or 42 <sup>f</sup>	Natively unfolded
Pituitary prolactinoma	Prolactin	199	All- $\alpha$ , 4-helical cytokines
Injection-localized amyloidosis <sup>c</sup>	Insulin	21 + 30 <sup>j</sup>	All- $\alpha$ , insulin like
Aortic medial amyloidosis <sup>c</sup>	Medin	50 <sup>k</sup>	Unknown
Hereditary lattice corneal dystrophy <sup>d</sup>	Mainly C-terminal fragments of kerato-epithelin	50–200 <sup>f</sup>	Unknown
Corneal amyloidosis associated with trichiasis <sup>c</sup>	Lactoferrin	692	$\alpha$ + $\beta$ , periplasmic-binding protein like II
Cataract <sup>c</sup>	$\gamma$ -Crystallins	Variable	All- $\beta$ , $\gamma$ -crystallin like
Calcifying epithelial odontogenic tumors <sup>c</sup>	Unknown	~46	Unknown
Pulmonary alveolar proteinosis <sup>d</sup>	Lung surfactant protein C	35	Unknown
Inclusion-body myositis <sup>c</sup>	Amyloid $\beta$ peptide	40 or 42 <sup>f</sup>	Natively unfolded
Cutaneous lichen amyloidosis <sup>c</sup>	Keratins	Variable	Unknown

<sup>a</sup>Data refer to the number of residues of the processed polypeptide chains that deposit into aggregates, not of the precursor proteins.

<sup>b</sup>According to Structural Classification Of Proteins (SCOP), these are the structural class and fold of the native states of the processed peptides or proteins that deposit into aggregates prior to aggregation.

<sup>c</sup>Predominantly sporadic, although in some cases hereditary forms associated with specific mutations are well documented.

<sup>d</sup>Predominantly hereditary, although in some cases sporadic forms are documented.

<sup>e</sup>Five percent of the cases are transmitted (e.g., iatrogenic).

<sup>f</sup>Fragments of various lengths are generated and have been reported to be present in ex vivo fibrils.

<sup>g</sup>Lengths shown refer to the normal sequences with nonpathogenic traits of polyQ.

<sup>h</sup>Length shown is for ataxin-1.

<sup>i</sup>The pathogenic mutation converts the stop codon into a Gly codon, extending the 77-residue protein by 21 additional residues.

<sup>j</sup>Human insulin consists of two chains (A and B, with 21 and 30 residues, respectively) covalently linked by disulfide bridges.

<sup>k</sup>Medin is the 245–294 fragment of human lactadherin.

## Anexo II

**Tabela 5.II:** Lista das variantes amiloidogénicas e não-amiloidogénicas da proteína transtirretina humana (Connors *et al.*, 2003).

TTR Variant	Coding Region	Nucleotide Change	Amino Acid Mass Shift (Da)	Phenotype	Geographic Focus (Ethnic Origin)
Gly6Ser*	Exon 2	GGT→AGT	+30	non-amyloid	Caucasian
Cys10Arg		TGT→CGT	+53	AN, E, H, PN	USA (Hungarian)
Leu12Pro		CTG→CCG	-16	AN, CNS, L, LM	UK
<b>Met13Ile*</b>		<b>ATG→ATC</b>	<b>-18</b>	<b>non-amyloid</b>	<b>Germany</b>
<b>Asp18Asn</b>		<b>GAT→AAT</b>	<b>-1</b>	<b>H</b>	<b>USA</b>
Asp18Glu		GAT→GAA/G	+14	AN, PN	South America
Asp18Gly		GAT→GGT	-58	CNS, LM	Hungary
Val20Ile		GTC→ATC	+14	CTS, H	Germany, USA
Ser23Asn		AGT→AAT	+27	E, H, PN	USA (Portuguese)
Pro24Ser		CCT→TCT	-10	CTS, H, PN	USA
<b>Ala25Ser</b>		<b>GCC→TCC</b>	<b>+16</b>	<b>H, PN</b>	<b>USA</b>
<b>Ala25Thr</b>		<b>GCC→ACC</b>	<b>+30</b>	<b>CNS, PN</b>	<b>Japan</b>
<b>Val28Met</b>		<b>GTG→ATG</b>	<b>+32</b>	<b>AN, PN</b>	<b>Portugal</b>
Val30Ala		GTG→GCG	-28	AN, H	USA (German)
Val30Gly		GTG→GGG	-42	CNS, E, LM	USA
Val30Leu		GTG→CTG	+14	AN, H, K, PN	Japan, USA
Val30Met	GTG→ATG	+32	AN, E, LM, PN	Argentina, Brazil, China, Finland, France, Germany, Greece, Italy, Japan, Portugal, Sweden, Turkey, USA	
<b>Phe33Cys</b>	Exon 3	<b>TTC→TGC</b>	<b>-44</b>	<b>CTS, E, K, H</b>	<b>USA</b>
Phe33Ile		TTC→ATC	-34	E, PN	Israel (Polish)
Phe33Leu		TTC→CTC	-34	AN, PN	USA (Polish, Lithuanian)
Phe33Val		TTC→GTC	-48	AN, PN	China, UK
Arg34Thr		AGA→ACA	-55	H, PN	Italy
Lys35Asn		AAG→AAC/T	-14	AN, H, PN	France
Ala36Pro		GCT→CCT	+26	CNS, CTS, E, PN	Greece, Italy, USA
Asp38Ala		GAT→GCT	-44	AN, H, PN	Japan
<b>Trp41Leu</b>		<b>TGG→TTG</b>	<b>-73</b>	<b>E</b>	<b>USA (Russian)</b>
Glu42Asp		GAG→GAC/T	-14	H	France
Glu42Gly		GAG→GGG	-72	AN, H, PN	Japan, Russia, USA
Phe44Ser		TTT→TCT	-60	AN, E, H, PN	USA, Japan
Ala45Asp		GCC→GAC	+44	H, PN	Ireland, Italy, USA
Ala45Ser		GCC→TCC	+16	H	Sweden
Ala45Thr		GCC→ACC	+30	H	Ireland, Italy, USA
Gly47Ala		GGG→GCG	+14	AN, H, PN	Germany, Italy, France
Gly47Arg		GGG→C/AGG	+99	AN, PN	Japan
Gly47Glu		GGG→GAG	+72	H, K, PN	Germany, Italy
Gly47Val		GGG→GTG	+42	AN, CTS, H, PN	Sri Lanka
Thr49Ala		ACC→GCC	-30	CTS, H, PN	France, Italy
Thr49Ile		ACC→ATC	+12	H, PN	Japan
<b>Thr49Pro</b>		<b>ACC→CCC</b>	<b>-4</b>	<b>H</b>	<b>USA</b>
Ser50Arg		AGT→AGG	+69	AN, H, PN	France, Italy, Japan
Ser50Ile		AGT→ATT	+26	AN, H, PN	Japan
Glu51Gly		GAG→GGG	-72	H	USA
Ser52Pro		TCT→CCT	+10	AN, H, K, PN	England
Gly53Glu		GGA→GAA	+72	CNS, LM, N	France
Glu54Gly		GAG→GGG	-72	AN, E, PN	England
Glu54Lys		GAG→AAG	-1	AN, H, PN	Japan
Leu55Arg		CTG→CGG	+43	LM, PN	Germany
<b>Leu55Gln</b>		<b>CTG→CAG</b>	<b>+15</b>	<b>AN, E, PN</b>	<b>USA (Spanish)</b>

Leu55Pro		CTG→CCG	-16	AN, E, H, PN	Taiwan, USA (Dutch, German)
<b>His56Arg</b>		<b>CAT→AAT</b>	<b>+19</b>	H	<b>USA</b>
Leu58Arg		CTC→CGC	+43	AN, CTS, E, H	Japan
Leu58His		CTC→CAC	+24	CTS, H	Germany, USA
Thr59Lys		ACA→AAA	+27	AN, H, PN	Italy, USA (Chinese)
Thr60Ala		ACT→GCT	-30	CTS, H, PN	Australia, Germany Ireland, UK, USA, Japan
Glu61Lys		GAG→AAG	-1	PN	Japan
Phe64Leu		TTT→CTT	-34	CTS, H, PN	Italy, USA
Phe64Ser		TTT→TCT	-60	CNS, E, LM, PN	Canada (Italian), England
Ile68Leu		ATA→T/CTA	0	H	Germany, USA
Tyr69His		TAC→CAC	-26	E	Scotland, USA
<b>Tyr69Ile</b>		<b>TAC→ATC</b>	<b>-50</b>	<b>CTS, H</b>	<b>Japan</b>
Lys70Asn		AAA→AAC/T	-14	CTS, E, PN	Germany, USA
Val71Ala		GTG→GCG	-28	CTS, E, PN	France, Spain
Ile73Val		ATA→GTA	-14	AN, PN	Bangladesh
Asp74His*		GAC→CAC	+22	non-amyloid	Germany
Ser77Phe		TCT→TTT	+60	AN, PN	France
Ser77Tyr		TCT→TAT	+76	H, K, PN	France, Germany, USA
<b>Tyr78Phe</b>		<b>TAC→TTC</b>	<b>-16</b>	<b>PN, CTS, S</b>	<b>France (Italian)</b>
<b>Ala81Thr</b>		<b>GCA→ACA</b>	<b>+30</b>	<b>H</b>	<b>USA</b>
Ile84Asn		ATC→AAC	+1	CTS, E, H	USA (Italian)
Ile84Ser		ATC→AGC	-26	CTS, E, H, LM	Hungary, Switzerland, USA
Ile84Thr		ATC→ACC	-12	AN, H, PN	Germany, UK
Glu89Gln		GAG→CAG	-1	CTS, H, PN	Italy
Glu89Lys		GAG→AAG	-1	AN, H, PN	USA
His90Asn*		CAT→AAT	-23	non-amyloid	Germany, Portugal
Ala91Ser		GCA→TCA	+16	AN, CTS, H, PN	France
<b>Gln92Lys</b>		<b>GAG→AAG</b>	<b>0</b>	<b>H</b>	<b>Japan</b>
Ala97Gly	Exon 4	GCC→GGC	-14	H, PN	Japan
Ala97Ser		GCC→TCC	+16	H, PN	China, France, Taiwan
Gly101Ser*		GGC→AGC	+30	non-amyloid	Japan
Pro102Arg*		CCC→CGC	+59	non-amyloid	Germany
<b>Arg103Ser</b>		<b>CGC→AGC</b>	<b>-69</b>	<b>H</b>	<b>USA</b>
Arg104Cys*		CGC→TGC	-53	non-amyloid	USA
Arg104His*		CGC→CAC	-19	non-amyloid	Japan, USA (Chinese)
<b>Ile107Met</b>		<b>ATT→ATG</b>	<b>+18</b>	<b>H, PN</b>	<b>Germany</b>
Ile107Val		ATT→GTT	-14	CTS, H, PN	Germany, USA, Japan
<b>Ala108Ala*</b>		<b>GCC→GCT</b>	<b>0</b>	<b>non-amyloid</b>	<b>Portugal</b>
Ala109Ser		GCC→TCC	+16	PN	Japan
Ala109Thr*		GCC→ACC	+30	non-amyloid	Portugal
Ala109Val*		GCC→GTC	+28	non-amyloid	USA
Leu111Met		CTG→ATG	+18	CTS, H	Denmark
Ser112Ile		AGC→ATC	+26	H, PN	Italy
Tyr114Cys		TAC→TGC	-60	AN, CNS, E, H, LM, PN	Japan
Tyr114His		TAC→CAC	-26	CTS	Japan
Tyr116Ser		TAT→TCT	-76	AN, CTS, PN	France
Thr119Met*		ACG→ATG	+30	non-amyloid	Portugal, USA
Ala120Ser		GCT→TCT	+16	AN, H, PN	Caribbean
del Val122		del GTC	-99	CNS, CTS, H, PN	USA (Ecuadorian/Spanish)
Val122Ala		GTC→GCC	-28	E, H, PN	UK, USA
Val122Ile		GTC→ATC	+14	H	Africa, Portugal, USA
Pro125Ser*		CCC→TCC	-10	non-amyloid	Italy

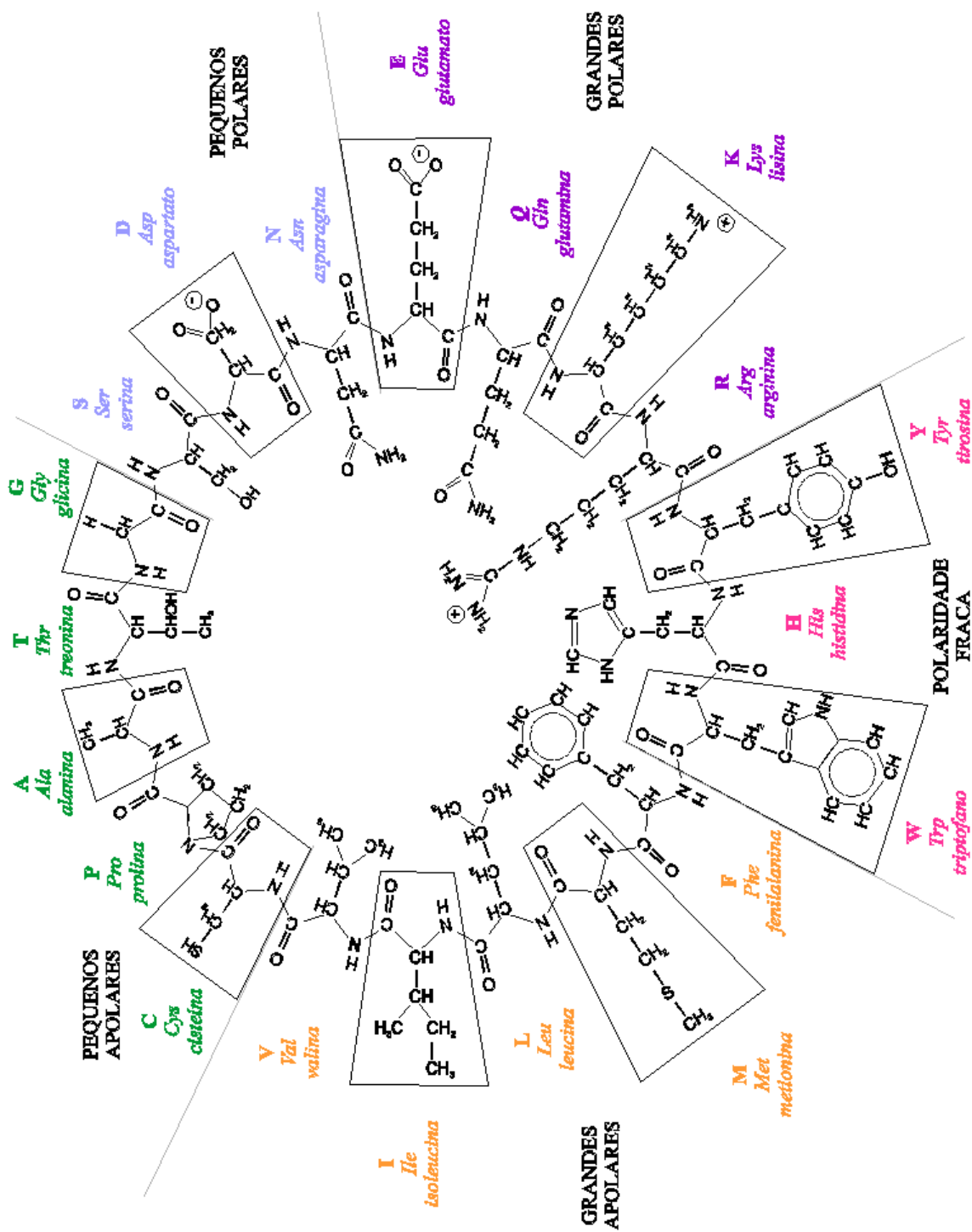
Abbreviation Key: AN = autonomic neuropathy; CNS = central nervous system; CTS = carpal tunnel syndrome; E = eye; H = heart; K = kidney; L = liver; LM = leptomeningeal; N = neuropathy; PN = polyneuropathy; S = skin

\* indicates non-amyloidogenic variant

Information added since the 2000 compilation<sup>6</sup> is indicated with **bold font**.

### Anexo III

Tabela 5.III: Estrutura dos aminoácidos.





## Capítulo 6

# Bibliografía





- Andersson, K., Olofsson, A., Nielsen, E. H., Svehag, S.-E., Lundgren, E., 2002. Only amyloidogenic intermediates of transthyretin induce apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294, 309-314.
- Ando, Y., Nyhlin, N., Suhr, O., Holmgren, G., Uchida, K., El Sahly, M., Yamashita, T., Teresaki, H., Nakamura, M., Uchino, M., Ando, M., 1997. Oxidative stress is found in amyloid deposits in systemic amyloidosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232, 497-502.
- Andrade, C., 1952. A peculiar form of peripheral neuropathy: familial atypical generalized amyloidosis with special involvement of the peripheral nerves. *Brain* 75, 408-427.
- Barreiros, A.-P., Post, F., Hoppe-Lotichius, M., Linke, R. P., Vahl, C. F., Schäfers, H.-J., Galle, P. R., Otto, G., 2010. Liver Transplantation and Combined Liver-Heart Transplantation in Patients with Familial Amyloid Polyneuropathy: A Single-Center Experience. *Liver Transplantation* 16, 314-323.
- Behl, C., Davis, J. B., Lesley, R., Schubert, D., 1994. Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* 77, 817-827.
- Bendeck, M. P., Conte, M., Zhang, M., Nili, N., Strauss, B. H., Farwell, S. M., 2002. Doxycycline modulates smooth muscle cell growth, migration, and matrix remodeling after arterial injury. *Am. J. Pathol.* 160, 1089-1095.
- Benson, M. D., Kincaid, J. C., 2007. The molecular biology and clinical features of amyloid neuropathy. *Muscle Nerve* 36, 411-423.
- Blake, C. C. F., Swan, I. D. A., Rerat, C., Berthou, J., Laurent, A., Rerat, B., 1971. An X-ray study of the subunit structure of prealbumin. *Journal of Molecular Biology* 61 (1), 217-218.
- Blake, C. C. F., Geisow, M. J., Swan, I. D. A., Rerat, C., Rerat, B., 1974. Structure of human plasma prealbumin at 2.5 Å resolution: a preliminary report on the polypeptide chain conformation, quaternary structure and thyroxine binding. *J. Biol. Chem.* 88, 1-12.
- Blake, C. C., Geisow, M. J., Oatley, S. J., Rerat, B., Rerat, C., 1978. Structure of prealbumin: secondary, tertiary and quaternary interactions determined by Fourier refinement at 1.8 Å. *J. Mol. Biol.* 121 (3), 339-356.

- Blake, C., Serpell, L., 1996. Synchrotron X-ray studies suggest that the core of the transthyretin amyloid fibril is a continuous  $\beta$ -sheet helix. *Structure* 4, 989-998.
- Branden, C., Tooze, J., 1991. *Introduction to Protein Structure*. First ed. Garland, New York and London.
- Brito, R. M. M., Dubitzky, W., Rodrigues, J. R., 2004. Protein Folding and Unfolding Simulations: A New Challenge for Data Mining. *OMICS: A Journal of Integrative Biology* 8 (2), 153-166.
- Bulheller, B. M., Rodger, A., Hirst, J. D., 2007. Circular and linear dichroism of proteins. *Physical Chemistry Chemical Physics* 9, 2020-2035.
- Cardoso, I., Pereira, P. J. B., Damas, A. M., Saraiva, M. J. M., 2000. Aprotinin binding to amyloid fibrils. *Eur. J. Biochem.* 267, 2307-2311.
- Cardoso, I., Merlini, G., Saraiva, M. J., 2003. 4'-iodo-4'-deoxydoxorubicin and tetracyclines disrupt transthyretin amyloid fibrils in vitro producing noncytotoxic species: screening for TTR fibril disrupters. *The FASEB Journal* 17, 803-809.
- Cardoso, I., Saraiva, M. J., 2006. Doxycycline disrupts transthyretin amyloid: evidence from studies in a FAP transgenic model. *The FASEB Journal* 20, 234-239.
- Chi, E. Y., Krishnan, S., Randolph, T. W., Carpenter, J. F., 2003. Physical Stability of Proteins in Aqueous Solution: Mechanism and Driving Forces in Nonnative Protein Aggregation. *Pharmaceutical Research* 20 (9), 1325-1336.
- Chiti, F., Dobson, C. M., 2006. Protein Misfolding, Functional Amyloid and Human Disease. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 333-366.
- Coelho, T., Choraó, R., Sousa, A., Alves, I. L., Torres, M. F., Saraiva, M. J. M., 1996. Compound heterozygotes of transthyretin Met 30 and transthyretin Met 119 are protected from the devastating effects of familial amyloid polyneuropathy. *Neuromuscular Disorders* 6 (Suppl. 1), S20.
- Cohen, A. S., Connors, L. H., 1987. The pathogenesis and biochemistry of amyloidosis. *J. Pathol.* 151, 1-10.
- Cohen, A. S., Jones, L. A., 1993. Advances in amyloidosis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 5, 62-76.

- 
- Colon, W., Kelly, J. W., 1992. Partial denaturation of transthyretin is sufficient for amyloid fibril formation in vitro. *Biochemistry* 31, 8654-8660.
- Connelly, S., Choi, S., Johnson, S. M., Kelly, J. W., Wilson, I. A., 2010. Structure-based design of kinetic stabilizers that ameliorate the transthyretin amyloidoses. *Current Opinion in Structural Biology* 20, 54-62.
- Connors, L.H., Lim, A., Prokaeva, T., Roskens, V. A., Costello, C. E., 2003. Tabulation of human transthyretin (TTR) variants. *Amyloid* 10 (3), 160-184.
- Conway, K. A., Lee, S. J., Rochet, J. C., Ding, T. T., Williamson, R. E., Lansbury, P. T., 2000. Acceleration of oligomerization not fibrillization is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease. Implication for pathogenesis and therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 571-576.
- Correia, B. E., 2005. Estudos em agregação da proteína Transtirretina. Tese de Estágio Científico, Licenciatura em Química, Universidade de Coimbra.
- Correia, B. E., Loureiro-Ferreira, N., Rodrigues, J. R., Brito, R. M. M., 2006. A structural model of an amyloid protofilament of Transthyretin. *Protein Science* 15, 28-32.
- Costa, P. P., Figueira, A. S., Bravo, F. R., 1978. Amyloid fibril protein related to prealbumin in familial amyloidotic polyneuropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (9), 4499-4503.
- Damas, A. M., Saraiva, M. J., 2000. Review: TTR Amyloidosis - Structural Features Leading to Protein Aggregation and Their Implications on Therapeutic Strategies. *Journal of Structural Biology* 130, 290-299.
- Dickson, P. W., Aldred, A. R., Marley, P. D., Tu, G. F., Howlett, G. J., Schreiber, G., 1985. High prealbumin and transferrin mRNA levels in the choroid plexus of rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 127, 890-895.
- Dobson, C. M., 2003. Protein folding and misfolding. *Nature* 426, 884-890.
- Einarsson, R., Andersson, L. O., 1977. Binding of heparin to human antithrombin III as studied by measurements of tryptophan fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta – Protein Structure* 490 (1), 104-111.

- Eneqvist, T., Andersson, K., Olofsson, A., Lundgren, E., Sauer-Eriksson, A. E., 2000. The  $\beta$ -Slip: A novel concept in transthyretin amyloidosis. *Molecular Cell* 6, 1207-1218.
- Felding, P., Fex, G., 1982. Cellular origin of prealbumin in the rat. *Biochim. Biophys. Acta* 716, 446-449.
- Folta-Stogniew, E., Williams, K.R., 1999. Determination of Molecular Masses in Solution: Implementation of an HPLC Size Exclusion Chromatography and Laser Light Scattering Service in a Core Laboratory. *Journal of Biomolecular Techniques* 10, 51-63.
- Formosinho, S. J., Arnaut, L. G., 2003. *Cinética Química*. Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Green, N. S., Foss, T. R., Kelly, J. W., 2005. Genistein, a natural product from soy, is a potent inhibitor of transthyretin amyloidosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 14545-14550.
- Hamilton, J. A., Steinrauf, L. K., Braden, B. C., Liepnieks, J., Benson, M. D., Holmgren, G., Sandgren, O., Steen, L., 1993. The X-ray Crystal Structure Refinements of Normal Human Transthyretin and the Amyloidogenic Val-30-Met Variant to 1.7Å Resolution. *The Journal of Biological Chemistry* 268 (4), 2416-2424.
- Hammarström, P., Jiang, X., Hurshman, A. R., Powers, E. T., Kelly, J. W., 2002. Sequence-dependent denaturation energetic: a major determinant in amyloid disease diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 6427-6432.
- Harding, S. E., 1997. Hydrodynamic properties of proteins. *Protein Structure, A Practical Approach*. Second ed. IRL Press 174 (9), 219-251.
- Herbert, J., Wilcox, J. N., Pham, K.-T. C., Fremeau, R. T. Jr., Zeviani, M., Dwork, A., Soprano, D. R., Makover, A., Goodman De, W. S., Zimmerman, E. A., Roberts, J. L., Schon, E. A., 1986. Transthyretin: a choroid plexus-specific transport protein in human brain. *Neurology* 36, 900-911.
- Holmgren, G., Steen, L., Ekstedt, J., Groth, C. G., Ericzon, B. G., Eriksson, S., Andersen, O., Karlberg, I., Norden, G., Nakazato, M., et al., 1991. Biochemical effect of liver transplantation in two Swedish patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP-met30). *Clin. Genet.* 40, 242-246.

- 
- Holmgren, G., Steen, L., Suhr, O., Ericzon, B. G., Groth, C. G., Andersen, O., Wallin, B. G., Seymour, A., Richardson, S., Hawkins, P. N., Pepys, M. B., 1993. Clinical improvement and amyloid regression after liver transplantation in hereditary transthyretin amyloidosis. *Lancet* 341, 1113-1116.
- Hörnberg, A., Eneqvist, T., Olofsson, A., Lundgren, E., Sauer-Eriksson, A. E., 2000. A comparative analysis of 23 structures of the amyloidogenic protein transthyretin. *J. Mol. Biol.* 302 (3), 649-669.
- Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K., 1996. VMD: Visual Molecular Dynamics. *J. Molec. Graph.* 14, 33-38.
- Inouye, H., Domingues, F. S., Damas, A. M., Saraiva, M. J., Lundgren, E., Sandgren, O., Kirschner, D. A., 1998. Analysis of X-ray diffraction patterns from amyloid of biopsied vitreous humor and kidney of transthyretin (TTR) Met30 familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) patients: axially arrayed TTR monomers constitute the protofilament. *Amyloid* 5, 163-174.
- Irvine, G. B., 2003. High-performance size-exclusion chromatography of peptides. *J. Biochem. Biophys. Methods* 56, 233-242.
- Ito, J. A., 2004. Técnicas Espectroscópicas em Biofísica. *Caderno de Física da UEFS* 03 (01), 21-29.
- Jacobson, D. R., McFarlin, D. E., Kane, I., Buxbaum, J. N., 1992. Transthyretin Pro<sup>55</sup>, a variant associated with early-onset, aggressive, diffuse amyloidosis with cardiac and neurologic involvement. *Hum. Genet.* 89, 353-356.
- Jacobson, D. R., Pastore, R. D., Yaghoubian, R., Kane, I., Gallo, G., Buck, F. S., Buxbaum, J. N., 1997. Variant sequence transthyretin (isoleucine 122) in late onset cardiac amyloidosis in black Americans. *The New England Journal Of Medicine* 336, 466-473.
- Jahn, T. R., Radford, S. E., 2008. Folding *versus* aggregation: Polypeptide conformations on competing pathways. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 469, 100-117.
- Jiang, X., Buxbaum, J. N., Kelly, J. W., 2001a. The V122I cardiomyopathy variant of transthyretin increases the velocity of rate-limiting tetramer dissociation, resulting in accelerated amyloidosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (26), 14943-14948.

- Jiang, X., Smith, C. S., Petrassi, M., Hammarström, P., White, J. T., Sacchettini, J. C., Kelly, J. W., 2001b. An Engineered Transthyretin Monomer that Is Nonamyloidogenic, Unless It Is Partially Denaturated. *Biochemistry* 40, 11442-11452.
- Jimenez, J. L., Nettleton, E. J., Bouchard, M., Robinson, C. V., Dobson, C. M., Saibil, H. R., 2002. The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 9196-9201.
- Johnson, W. C. 1985. *Methods of biochemical analysis*. D. Glick ed. Wiley, New York, 31, 61.
- Kelényi, G., 1967. On the histochemistry of azo group-free thiazole dyes. *J. Histochem. Cytochem.* 15 (3), 172-180.
- Kelly, S. M., Price, N. C., 2000. The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. *Current Protein and Peptide Science* 1, 349-384.
- Kelly, S. M., Jess, T. J., Price, N. C., 2005. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta* 1751, 119-139.
- Khurana, R., Coleman, C., Ionescu-Zanetti, C., Carter, S. A., Krishna, V., Grover, R. K., Roy, R., Singh, S., 2005. Mechanism of thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Journal of Structural Biology* 151, 229-238.
- Krebs, M. R. H., Bromley, E. H. C., Donald, A. M., 2005. The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localization and implications. *Journal of Structural Biology* 149, 30-37.
- Lai, Z., Colón, W., Kelly, J. W., 1996. The Acid-Mediated Denaturation Pathway of Transthyretin Yields a Conformational Intermediate That Can Self-Assemble into Amyloid. *Biochemistry* 35, 6470-6482.
- Lakowicz, J. R., 1983. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Plenum Press, New York and London.
- LeVine III, H., 1993. Thioflavin-T interaction with synthetic Alzheimer's disease  $\beta$ -amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Science* 2, 404-410.

- Lindgren, M., Sörgjerd, K., Hammarström, P., 2005. Detection and characterization of aggregates, prefibrillar amyloidogenic oligómeros, and protofibrils using fluorescence spectroscopy. *Biophysical Journal* 88, 4200-4212.
- Lindgren, M., Hammarström, P., 2010. Amyloid oligomers: spectroscopic characterization of amyloidogenic protein states. *FEBS Journal* 277, 1380-1388.
- Loura, L. M. S., Almeida, R. F. M, 2004. *Tópicos de Biofísica de Membranas*. Lidel, Edições Técnicas, Lda.
- Mason, J. M., Kokkoni, N., Stott, K., Doig, A. J., 2003. Design strategies for anti-amyloid agents. *Current Opinion in Structural Biology* 13, 526-532.
- Merlini, G., Ascari, E., Amboldi, N., Bellotti, V., Arbustini, E., Perfetti, V., Ferrari, M., Zorzoli, I., Marinone, M. G., Garini, P., Diegoli, M., Trizio, D., Ballinari, D., 1995. Interaction of the anthracycline 4'-iodo-4'-deoxydoxorubicin with amyloid fibrils: Inhibition of amyloidogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 2959-2963.
- Miller, S. R., Sekijima, Y., Kelly, J. W., 2004. Native state stabilization by NSAIDs inhibits transthyretin amyloidogenesis from the most common familial disease variants. *Laboratory Investigation* 84, 545-552.
- Morris, A. M., Finke, R. G., 2009.  $\alpha$ -Synuclein aggregation variable temperature and variable pH kinetic data: A re-analysis using the Finke-Watzky 2-step model of nucleation and autocatalytic growth. *Biophysical Chemistry* 140, 9-15.
- Naiki, H., Higuchi, K., Hosokawa, M., Takeda, T., 1989. Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin-T. *Anal. Biochem.* 177, 244-249.
- Nakanishi, K., Berova, N., Wood, R. W., 1994. *Circular Dichroism. Principles and Applications*, VCH: New York.
- Naylor, H. M., Newcomer, M. E., 1999. The Structure of Human Retinol-Binding Protein (RBP) with Its Carrier Protein Transthyretin Reveals an Interaction with the Carboxy Terminus of RBP. *Biochemistry* 38, 2647-2653.
- Olofsson, A., Ippel, H. J., Baranov, V., Horstedt, P., Wijmenga, S., Lundgren, E., 2001. Capture of a dimeric intermediate during transthyretin amyloid formation. *J. Biol. Chem.* 276, 39592-39599.



- Palha, J. A.; Ballinari, D.; Amboldi, N.; Cardoso, I.; Fernandes, R.; Belloti, V.; Merlini, G.; Saraiva, M. J., 2000. 4'-iodo-4'-deoxydoxorubicin (I-DOX) disrupts the fibrillar structure of transthyretin amyloid. *Am. J. Pathol.* 156, 1919-1925.
- Pauling, L., Corey, R. B., 1951. Configurations of polypeptide chains with favored orientations around single bonds: two new pleated sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 37, 729-740.
- Penzkofer, A.; Shirdel, J.; Zirak, P.; Breitzkreuz, H.; Wolf, E., 2007. Protein aggregation studied by forward light scattering and light transmission analysis. *Chemical Physics* 342, 55-63.
- Pepys, M. B., 2006. Amyloidosis. *Annu. Rev. Med.* 57, 223-241.
- Peterson, P. A., 1971. Characteristics of a Vitamin A-Transporting Protein Complex Occurring in Human Serum. *The Journal of Biological Chemistry* 246, 34-43.
- Peterson, S. A.; Klabunde, T.; Lashuel, H. A.; Purkey, H.; Sacchettini, J. C.; Kelly, J. W., 1998. Inhibiting transthyretin conformational changes that lead to amyloid fibril formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 12956-12960.
- Pettersson, T.; Carlstrom, A.; Jornvall, H., 1987. Different Types of Microheterogeneity of Human Thyroxine-Binding Prealbumin. *Biochemistry* 26, 4572-4583.
- Puchtler, H.; Sweat, F.; Levine, M., 1962. On the binding of Congo Red by amyloid. *J. Histochem. Cytochem.* 10, 355-364.
- Quintas, A.; Saraiva, M. J. M.; Brito, R. M. M., 1997. The amyloidogenic potential of transthyretin variants correlates with their tendency to aggregate in solution. *FEBS Lett.* 418 (3), 297-300.
- Quintas, A.; Saraiva, M. J. M.; Brito, R. M. M., 1999. The Tetrameric Protein Transthyretin Dissociates to a Non-native Monomer in Solution. *Journal of Biological Chemistry* 271 (46), 32943-32949.
- Quintas, A.; Vaz, D. C.; Cardoso, I.; Saraiva, M. J. M.; Brito, R. M. M., 2001. Tetramer Dissociation and Monomer Partial Unfolding Precedes Protofibril Formation in Amyloidogenic Transthyretin Variants. *Journal of Biological Chemistry* 276 (29), 27207-27213.
- Ratner, M., 2009. Spotlight focuses on protein-misfolding therapies. *Nature Biotechnology* 27, 874.

- 
- Reimer, L., Kohl, H., 2008. Transmission electron microscopy: physics of image formation. Fifth ed. Springer Series in Optical Sciences 36.
- Reinert, J. C., Davis, J. L., 1971. The circular dichroism spectrum of microsomal membranes. Magnesium-induced aggregation. *Biochim. Biophys. Acta* 241, 921-924.
- Reixach, N., Deechongkit, S., Jiang, X., Kelly, J. W., Buxbaum, J. N., 2004. Tissue damage in the amyloidoses: Transthyretin monomers and nonnative oligomers are the major cytotoxic species in tissue culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (9), 2817-2822.
- Rochet, J. C., Lansbury Jr, P. T., 2000. Amyloid fibrillogenesis: themes and variations. *Current Opinion in Structural Biology* 10, 60-68.
- Rodrigues, J. R., Simões, C. J. V., Silva, C. G., Brito, R. M. M., 2010. Potentially amyloidogenic conformational intermediates populate the unfolding landscape of transthyretin: Insights from molecular dynamics simulations. *Protein Sci.* 19 (2), 202-219.
- Royer, C. A., 1995. Approaches to Teaching Fluorescence Spectroscopy. *Biophysical Journal* 68, 1191-1195.
- Ruprecht, J., Nield, J., 2001. Determining the structure of biological macromolecules by transmission electron microscopy, single particle analysis and 3D reconstruction. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 75, 121-164.
- Sacchettini, J. C., Kelly, J. W., 2002. Therapeutic strategies for human amyloid diseases. *Nature Reviews Drug Discovery* 1, 267-275.
- Salemme, F. R., 1983. Structural properties of protein beta-sheets. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 42 (2-3), 95-133.
- Saraiva, M. J. M., Birken, S., Costa, P. P., Goodman, D. S., 1984. Amyloid Fibril Protein in Familial Amyloidotic Polyneuropathy, Portuguese Type. Definition of Molecular Abnormality in Transthyretin (Prealbumin). *J. Clin. Invest.* 74, 104-119.
- Saraiva, M. J. M., 2001. Transthyretin amyloidosis: a tale of weak interactions. *FEBS Lett.* 498, 201-203.

- Saraiva, M. J. M., 2001. Transthyretin Mutations in Hyperthyroxinemia and Amyloid Diseases. *Human Mutation* 17, 493-503.
- Saraiva, M. J. M., 2002. Hereditary transthyretin amyloidosis: molecular basis and therapeutical strategies. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 4, 1-11.
- Saraiva, M. J., 2004. Transthyretin Mutations in Familial Amyloidotic Polyneuropathy. *Hot Thyroidology No. 1*.
- Schmid, F. X., 1997. Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes. *Protein Structure, A Practical Approach*. Second ed. IRL Press 174 (11), 261-297.
- Schussler, G. C., 2000. The thyroxine-binding proteins. *Thyroid* 10, 141-149.
- Sebastião, M. P., Merlini, G., Saraiva, M. J., Damas, A. M., 2000. The molecular interaction of 4'-iodo-4'-deoxydoxorubicin with Leu-55Pro transthyretin 'amyloid-like' oligomer leading to disaggregation. *Biochem. J.* 351, 273-279.
- Serpell, L. C., Sunde, M., Fraser, P. E., Luther, P. K., Morris, E. P., Sangren, O., Lundgren, E., Blake, C. C. F., 1995. Examination of the structure of the transthyretin amyloid fibril by image reconstruction from electron micrographs. *J. Mol. Biol.* 254, 113-118.
- Serpell, L. C., Sunde, M., Benson, M. D., Tennent, G. A., Pepys, M. B., Fraser, P. E., 2000. The protofilament substructure of amyloid fibrils. *J. Mol. Biol.* 300, 1033-1039.
- Silva, A. F. T., 2006. Estudo da Oligomerização da Proteína Transtirretina. Tese de Estágio Científico, Licenciatura em Química, Universidade de Coimbra.
- Sipe, J. D., Cohen, A. S., 2000. Review: history of the amyloid fibril. *Journal of Structural Biology* 130, 179-188.
- Sörgjerd, K., Klingstedt, T., Lindgren, M., Kågedal, K., Hammarström, P., 2008. Prefibrillar transthyretin oligomers and cold stored native tetrameric transthyretin are cytotoxic in cell culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 377, 1072-1078.

- 
- Sousa, M. M., Cardoso, I., Fernandes, R., Guimarães, A., Saraiva, M. J., 2001. Deposition of transthyretin in early stages of familial amyloidotic polyneuropathy. *Am. J. Pathol.* 159, 1993-2000.
- Stangou, A. J., Hawkins, P. N., Heaton, N. D., Rela, M., Monaghan, M., Nihoyannopoulos, P., O'Grady, J., Pepys, M. B., Williams, R., 1998. Progressive cardiac amyloidosis following liver transplantation for familial amyloid polyneuropathy: implications for amyloid fibrillogenesis. *Transplantation* 66, 229-233.
- Stangou, A. J., Hawkins, P. N., 2004. Liver transplantation in transthyretin-related familial amyloid polyneuropathy. *Curr. Opin. Neurol.* 17, 615-620.
- Steim, J. M., Fleischer, S., 1967. Aggregation-induced red shift of the Cotton effect of mitochondrial structural protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58, 1292-1298.
- Stellwagen, E., 1990. Gel filtration. *Methods in Enzymology* 182, 317-328.
- Sunde, M., Serpell, L. C., Bartlam, M., Fraser, P. E., Pepys, M. B., Blake, C. C. F., 1997. Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J. Mol. Biol.* 273, 729-739.
- Uversky, V. N., Segel, D. J., Doniach, S., Fink, A. L., 1998. Association-induced folding of globular proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5480-5483.
- van Dijk, J. A. P. P., Smit, J. A. M., 2000. Size-exclusion chromatography-multiangle laser light scattering analysis of  $\beta$ -lactoglobulin and bovine serum albumin in aqueous solution with added salt. *Journal of Chromatography A* 867, 105-112.
- Vassar, P. S., Culling, C. F., 1959. Fluorescent stains, with special reference to amyloid and connective tissues. *Arch. Pathol.* 68, 487-498.
- Virchow, R., 1854. Ueber eine im Gehirn und Rückenmark des Menschen aufgefundene Substanz mit der chemischen Reaction der Cellulose. *Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med.* 6, 135-138.
- Westermarck, P., Sletten, K., Johansson, B., Cornell, G. G., 1990. Fibril in senile systemic amyloidosis is derived from normal transthyretin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2843-2845.

- Wojtczak, A., Cody, V., Luft, J.R., Pangborn, W., 1996. Structures of human transthyretin complexed with thyroxine at 2.0 Å resolution and 3',5'-dinitro-*N*-acetyl-L-thyronine at 2.2 Å resolution. *Acta Cryst. D52*, 758-765.
- Woody, R. W., 1995. Circular Dichroism. *Methods in Enzymology*. 246, 34-71.
- Wyatt, P. J., 1993. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. *Analytica Chimica Acta* 272, 1-40.
- Wyatt, P. J., 1997. Multiangle Light Scattering: the basic tool for macromolecular characterization. *Instrumentation Science and Technology* 25 (1), 1-18.
- Yamamoto, Y., Yoshizawa, T., Kamio, S., Aoki, O., Kawamata, Y., Masushige, S., Kato, S., 1997. Interactions of Transthyretin (TTR) and Retinol-Binding Protein (RBP) in the Uptake of Retinol by Primary Rat Hepatocytes. *Exp. Cell Res.* 234, 373-378.
- Yang, J.-T., Wu, C.-S. C., Martinez, H. M., 1986. *Methods in enzymology*. C. H. W. Hirs and S. N. Timasheff ed. Academic Press, New York, 130, 208.
- Yazaki, M., Tokuda, T., Nakamura, A., Higashikata, T., Koyama, J., Higuchi, K., Harihara, Y., Baba, S., Kametani, F., Ikeda, S., 2000. Cardiac amyloid in patients with familial amyloid polyneuropathy consists of abundant wild-type transthyretin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 274, 702-706.
- Yazaki, M., Mitsuhashi, S., Tokuda, T., Kametani, F., Takei, Y.-I., Koyama, J., Kawamorita, A., Kanno, H., Ikeda, S.-I., 2006. Progressive wild-type transthyretin deposition after liver transplantation preferentially occurs onto myocardium in FAP patients. *Am. J. Transplant.* 7, 235-242.