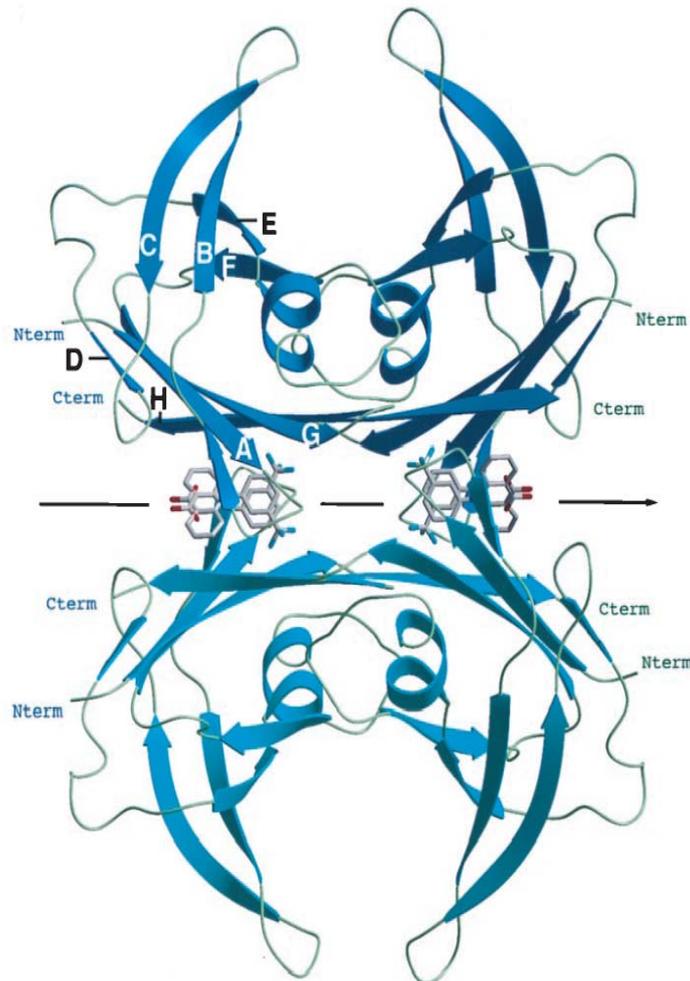


RICARDO SANT'ANNA DE OLIVEIRA

**PEQUENAS MOLÉCULAS COMO INIBIDORES DE
AGREGAÇÃO DA PROTEÍNA AMILOIDOGÊNICA
TRANSTIRRETINA**



**Rio de Janeiro - RJ
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

RICARDO SANT'ANNA DE OLIVEIRA

**PEQUENAS MOLÉCULAS COMO INIBIDORES DE
AGREGAÇÃO DA PROTEÍNA AMILOIDOGÊNICA
TRANSTIRRETINA**

**Dissertação de mestrado apresentada ao programa em
Química Biológica do Instituto de Bioquímica Médica
da Universidade Federal do Rio de Janeiro visando à
obtenção do grau de mestre em Química Biológica.**

**Orientadora: Débora Foguel
Professora adjunta - IBqM - UFRJ**

**Co-orientadora: Carolina Alvares da Cunha de Azeredo
Braga - Doutora**

**Rio de Janeiro – RJ
2009**

Ficha Catalográfica

Sant'Anna, Ricardo Oliveira.
Pequenas Moléculas como inibidores da
agregação da proteína amiloidogênica
Transtirretina/Ricardo Sant'Anna de Oliveira. Rio de
janeiro: UFRJ/IBqM,2009, 120 fl.
Orientador: Débora Foguel/Carolina Alvares
da Cunha de Azeredo Braga
Dissertação (Mestrado): UFRJ/Instituto de
Bioquímica Médica/Programa de Pós Graduação em
Química Biológica
Referências Bibliográficas: f.: 99-118
1. Transtirretina. 2. Inibidores. 3. Agregação
I. Foguel, Débora; Braga, Carolina Álvares da
Cunha de Azeredo
II. Universidade federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Bioquímica Médica. III. Título

RICARDO SANT'ANNA DE OLIVEIRA

Rio de Janeiro, 29 de Abril de 2009.

Banca examinadora:

Débora Foguel
Prof^a. Adjunta do Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ (Orientadora)

Carolina Alvares da Cunha de Azeredo Braga (Co-orientadora)

Ana Paula Valente
Prof^a. Adjunta do Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ

Maria Lúcia Bianconi
Prof^a Adjunta do Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ

Yraima Moura Lopes Cordeiro
**Prof^a Adjunta do Departamento de Fármacos, Faculdade de Farmácia -
UFRJ**

José Ricardo Murari Pires
Prof. Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ (Revisor)

Samantha Monteiro Martins
Prof^a. Adjunta da Faculdade de Farmácia - Macaé - UFRJ

Dedico este trabalho aos meus pais, pois sempre permitiram e apoiaram todas as minhas escolhas vocacionais e profissionais, assim posso dizer que me sinto uma pessoa muito livre.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus e à Sua Mãe.

Aos meus pais, Jacy e Wanda, pois acredito que o amor deles sempre foi o meu maior auxílio nesta Terra.

Aos meus irmãos e à minha nova irmã, Juliana, por toda a amizade.

Aos meus familiares, avós, tias e tios. Aos meus dois sobrinhos pequeninos.

Agradeço especialmente à Débora, Carol e Aline, orientadoras queridas e aluna. A ajuda e amizade foram muito importantes para mim. Ao meu ex aluno de IC, Rogério.

A toda a banca examinadora, especialmente ao meu revisor, Prof. Zé Ricardo, pela leitura muito atenciosa desta dissertação e sugestões.

Aos meus amigos TODOS do LTPV/LAPA e do CNRMN, mas sou um pouco medroso e pela falta de tempo não correrei o risco de esquecer alguém, além disso, e mais importante, os meus amigos sabem da importância que têm para mim.

Aos meus amigos que não são do universo da bioquímica, mas são colaboradores indispensáveis!

Agradeço ao professor Maurício pela colaboração e amizade.

Ao Emerson, Rose e Dona Silvia, pelo apoio cuidadoso e amizade.

RESUMO

A Transtirretina (TTR) é uma proteína amiloidogênica envolvida em males como a Polineuropatia Amiloidótica Familiar (PAF) e Amiloidose Sistêmica Senil (ASS). A TTR é tetramérica, sintetizada principalmente no fígado e responsável pelo transporte secundário do hormônio tiroxina no sangue. Até hoje, o transplante de fígado é a única terapia existente para a PAF e não existe ainda intervenção para a ASS. O mecanismo preciso de agregação desta proteína ainda não é compreendido, porém, acredita-se que as primeiras etapas do processo envolvem a dissociação do tetrâmero em monômeros parcialmente desenovelados, que seriam os intermediários amiloidogênicos. Este evento ocorreria *in vivo* nos lisossomas e esta hipótese é sustentada porque *in vitro* o pH ácido promove a fibrilogênese. Em busca de novas abordagens terapêuticas, estudos demonstraram que algumas pequenas moléculas se ligam ao sítio do hormônio aumentando a barreira energética da dissociação. Neste trabalho, nós investigamos o efeito de alguns compostos já usados para outros fins farmacêuticos como Sulindaco (SUL), Indometacina (IND), Cetoconazol (CET), Clorpromazina (CLO), Propranolol (PRO) e Lumiracoxibe (LUM), na cinética de agregação e estabilidade da wt-TTR e de seu mutante mais agressivo, L55P-TTR. Para avaliar o efeito dos compostos, usamos agentes perturbadores como a alta pressão hidrostática (APH) e a desnaturação ácida em combinação com técnicas espectroscópicas. Sulindaco, Indometacina e Lumiracoxibe foram eficazes em inibir a agregação induzida por pH e APH de forma dependente de concentração. Realizando uma curva de concentração, foi possível determinar o IC₅₀ de cada um dos compostos e as afinidades aparentes de cada um deles foram calculadas medindo o deslocamento da sonda hidrofóbica ANS que se liga aos mesmos sítios dos compostos. Assim, observamos uma relação direta entre afinidade e eficácia dos compostos que foi: LU>INDO>SUL. Para investigar se estes compostos poderiam se ligar a algum intermediário da via de agregação, nós os adicionamos às amostras de TTR após o início da cinética e observamos ainda existir um efeito inibitório. Porém, com o uso da gel filtração, estimamos que tal efeito se deu devido à presença significativa de tetrâmeros ainda em solução nos tempos escolhidos. A estabilidade conferida pelos compostos também foi avaliada frente à APH e mais uma vez eles demonstraram efeito estabilizador. Os compostos se mostraram também eficientes em inibir a agregação induzida pela APH, o que nos permite sugerir uma nova metodologia para o “screening” de compostos antiamiloidogênicos. Estes dados de atividade aqui obtidos, em conjunto com os dados de difração de raios-X dos complexos TTR-ligantes podem ser úteis para a formulação de novas estratégias terapêuticas contra as amiloidoses causadas pela Transtirretina.

ABSTRACT

Transthyretin (TTR) is an amyloidogenic protein involved in diseases such as Familial Amyloid Polyneuropathy (FAP) and Senil Systemic Amyloidosis (SSA). TTR is tetrameric, synthesized in the liver and is the second carrier of Thyroxine (T4) in blood circulation. Liver transplantation is the only therapy for FAP and there is no intervention for SSA yet. The precise mechanism of this protein aggregation is not completely understood, although it is believed that the initial steps are the dissociation of the tetramers into partially unfolded monomers that would be the amyloidogenic intermediates. This event could take place at the acidic environment of the lysosomes and this hypothesis is supported by the fact that acid pH *in vitro* promotes TTR fibrillation. In search of new therapeutic approaches, some studies have demonstrated that small molecules that share structural similarities with T4 can bind to its site in TTR, raising the energetic barrier of dissociation. In this study we investigate the effects of some compounds already in use in the medicine such as Sulindac, Indomethacin, Lumiracoxibe, Chlorpromazine, Ketoconazole and Propranolol on the aggregation kinetics and stability of wt-TTR and its most aggressive natural mutant, the L55P-TTR. To evaluate such effects we used acidic denaturation and High Hydrostatic Pressure (HHP) as perturbing agents, because both also promote aggregation, in combination with spectroscopic techniques. Sulindac, Indomethacin and Lumiracoxibe were able to prevent aggregation induced even by acid pH and HHP in a dose-dependent manner. Performing a dose-response curve, we calculated the IC₅₀ of each compound. We also compared the apparent affinities of the ligands for the protein by indirect fluorescence of ANS. Thus, we observed a direct correlation between efficacy and affinity that was: LU>INDO>SUL. To investigate if these molecules would act over any aggregation intermediate or if they bind specifically to the native folded protein, we added them to the TTR samples after the beginning of aggregation kinetics and observed that there was still an inhibitory effect. Performing a size exclusion chromatography assay, we found that the effect was due to a big quantity of tetramers remaining in solution. The stability conferred by the compounds was also accessed against HHP and once again they seem to raise the energetic barrier of dissociation. The inhibitors also showed activity against HHP-induced aggregation and the results are similar to those observed against acid denaturation, what allow us to present a new approach to anti-amyloidogenic drug screening. These activity data obtained here in combination with x-ray diffraction crystallography of the complexes TTR-ligands will be useful to formulate new strategies against the TTR related amyloidosis by the use of small molecules.

SUMÁRIO (ÍNDICE)

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 - O ENOVELAMENTO PROTEÍCO.....	1
1.2 - AGREGAÇÃO PROTEÍCA E AMILOIDOSES	7
1.3 - A TRANSTIRRETINA E SUAS AMILOIDOSES	13
2 – OBJETIVOS.....	41
2.1 - OBJETIVOS GERAIS.....	41
2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1 - REAGENTES	42
3.2 - EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO:	43
3.3 - AGREGAÇÃO DA TTR	43
3.4 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIAMILOIDOGÊNICA DOS COMPOSTOS E CÁLCULO DO IC50.....	43
3.5 - MEDIDAS DE FLUORESCÊNCIA.....	44
3.5.1 - FLUORESCÊNCIA INTRÍNSECA	44
3.5.2 - FLUORESCÊNCIA EXTRÍNSECA	46
3.6 - ESPALHAMENTO DE LUZ.....	47
3.7 - CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTO DESEMPENHO	47
3.8 - LIGAÇÃO AO VERMELHO DO CONGO (VC).....	48
3.9 - ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA (APH).....	49
4 – RESULTADOS.....	50
4.1 - ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV-VIS. E FLUORESCÊNCIA DOS COMPOSTOS AVALIADOS.....	50
4.2 – EFEITO DOS COMPOSTOS SELECIONADOS NA AGREGAÇÃO DA TTR INDUZIDA POR ACIDIFICAÇÃO	53
4.3 - EFEITO DO LUMIRACOXIBE, INDOMETACINA E SULINDACO SOBRE A ESTABILIDADE DA wt E L55P-TTR.....	72
5. DISCUSSÃO	81
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

1. INTRODUÇÃO

1.1 - O ENOVELAMENTO PROTEÍCO

As proteínas são polímeros de aminoácidos ligados sequencialmente por ligações covalentes chamadas de ligação peptídica. Existem mais de 100.000 tipos conhecidos de proteínas. As proteínas fazem parte de todos os seres vivos e desempenham funções fundamentais em todos os sistemas biológicos, seja controlando catalisando reações químicas ou atuando como elemento estrutural na constituição dos organismos e etc...

A síntese de proteínas a partir de seus aminoácidos constituintes se dá pela tradução de uma seqüência de RNA mensageiro, a qual tem início pelo reconhecimento do códon de iniciação e termina com o reconhecimento do códon de término. Este processamento envolve etapas fundamentais que são: (1) ativação dos aminoácidos, que acontece pela ligação ao RNA transportador; (2) iniciação, que é o posicionamento da seqüência de RNA nos ribossomos; (3) alongação, que é o “encaixe” de aminoácidos subseqüentes na cadeia por meio da ligação covalente peptídica; (4) término e liberação da cadeia e (5) enovelamento e processamento pós-traducional (LEHNINGER E COLS., 1993).

A função de uma proteína será determinada pela sua composição, estrutura e localização no organismo, e. Quanto à sua estrutura, esta é alcançada à medida que a proteína se enovela. Compreender os mecanismos exatos do enovelamento protéico ainda é um desafio para a ciência moderna.

É chamada de estrutura nativa a conformação final e funcional de uma proteína. Conforme Anfisen, a estrutura primária, que é a seqüência de aminoácidos da proteína, é responsável pela sua estrutura tridimensional final (ANFISEN, 1973). Existem, além

da estrutura primária, ainda outros três tipos de organização estrutural em proteínas, que são: a estrutura secundária, determinada pelo arranjo dos aminoácidos no espaço e pode ser constituída principalmente de voltas, alfa hélices, fitas e folhas beta; a estrutura terciária, que é o formato tridimensional adotado pela cadeia e a estrutura quaternária, que ocorre quando sub-unidades da mesma proteína são unidas por interações fracas, formando supra estruturas com uma ou várias unidades (LEHNINGER E COLS., 2004).

A estrutura terciária é mantida por um somatório de interações fracas entre os aminoácidos. Elas são formadas entre aminoácidos que podem estar bastante distantes ou vizinhos na cadeia primária. Apesar de serem interações ditas fracas, como pontes de hidrogênio, interações iônicas, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals, o seu somatório é capaz de conferir enorme estabilidade às proteínas permitindo o seu correto funcionamento que está, como já dito anteriormente, diretamente ligado à sua estrutura (CREIGHTON, 1990). Existe ainda uma interação covalente que pode ocorrer em proteínas, que é chamada de pontes dissulfeto que ocorrem entre resíduos do aminoácido cisteína e que conferem grande estabilidade à proteína por serem ligações covalentes e, portanto de alta energia.

Quando existe uma mutação pontual na sequência primária, a formação ou manutenção da estrutura terciária pode ser bastante comprometida, já que as interações fracas entre aminoácidos podem ser modificadas. Este evento pode ser evidenciado por estudos que utilizam mutações pontuais, naturais ou não (FOGUEL E COLS., 1995; BROWN E COLS., 1997).

Da liberação da sequência completa dos aminoácidos pelos ribossomos até o fim do seu processo de enovelamento, o tempo que todos os aminoácidos levariam para atingir sua conformação nativa, se cada um deles experimentasse todas as posições possíveis seria maior do que o tempo de existência da Terra (LEVINTHAL, 1968). Este

paradoxo é conhecido como paradoxo de Levinthal. Hoje em dia, porém, se sabe que os aminoácidos e a cadeia peptídica não experimentam livre e aleatoriamente todas as possíveis conformações, mas são guiados por interações fundamentais que dirigem o processo, formando os intermediários de enovelamento. Desta maneira, o enovelamento é trazido para o tempo da ordem de mili-segundos (KIM & BALDWIN, 1990; DOBSON, 1995; LAZARIDIS AND KARPLUS, 1997).

Atualmente, sabe-se que a proteína em seu estado conhecido como nativo não é uma estrutura fixa e rígida como se pensava antigamente. O estado nativo apresenta pequenas variações de conformação que conferem plasticidade e permitem que a proteína exerça suas funções, porém do ponto de vista energético, são bastante próximos quanto à energia livre (BORGIA E COLS., 2008).

No seu estado nativo a proteína possui o menor mínimo de energia livre, ficando, portanto, segundo a visão mais moderna de funil de enovelamento (Figura 1), aprisionada num mínimo de energia local. Desta forma, os resíduos podem experimentar diversas conformações possíveis, sendo que a conformação final será a mais estável, (DOBSON, 2003).

Nesta mesma representação do enovelamento na forma de funil, existem mínimos de energia transientes onde se encontram os intermediários de enovelamento. Os intermediários de enovelamento estão presentes, geralmente, no enovelamento de proteínas com mais de 100 resíduos. Se por um lado, os intermediários guiam o enovelamento correto da proteína, eles também podem dirigir a reação para o enovelamento incorreto (RODER E COLS., 1997; SANCHEZ E COLS., 2003). De qualquer maneira, estudos sugerem que, no caso de proteínas grandes com mais de um domínio, o enovelamento aconteça de forma independente em diferentes regiões da cadeia (FERSHT, 1999; DINNER E COLS., 2000).

A existência dos intermediários de enovelamento, porém, foi por bastante tempo questionada, principalmente pelas observações feitas acerca do enovelamento de proteínas pequenas e com aparentes dois estados apenas na cinética de enovelamento (Nativo-Desnaturado) e pelo uso de técnicas que não permitiam análises nas escalas de tempo nas quais os intermediários são existentes (JACKSON E COLS., 1991; KRISHNA E COLS., 2004; BROKWEILL E COLS., 2007).

É importante lembrar que o enovelamento protéico ocorre no ambiente celular e que durante todo o evento existe a possibilidade da interação entre a recém formada cadeia polipeptídica e outra molécula do compartimento celular acontecer. Isso porque algumas proteínas podem começar a se enovelar antes da liberação da cadeia completa pelos ribossomos (HARDESTY E COLS., 2001), porém outras só começam a enovelar-se após a liberação no citoplasma e há ainda outras só se enovelam em compartimentos específicos como mitocôndrias ou retículo endoplasmático (BUKAU E COLS., 1998; HARTL E COLS., 2002). Desta maneira, o comportamento de uma cadeia polipeptídica dentro de uma célula viva, onde a colisão entre moléculas deve ser bastante considerada, leva a uma maior complexidade da rota do enovelamento representando um grande desafio para as células, que precisam garantir a formação da proteína nativa e funcional evitando contatos indesejáveis que levam, por exemplo, à formação de agregados. (JAHN E COLS., 2005; CLARK, 2004; GSPONER E VENDRUSCOLO, 2006) (Figura 1).

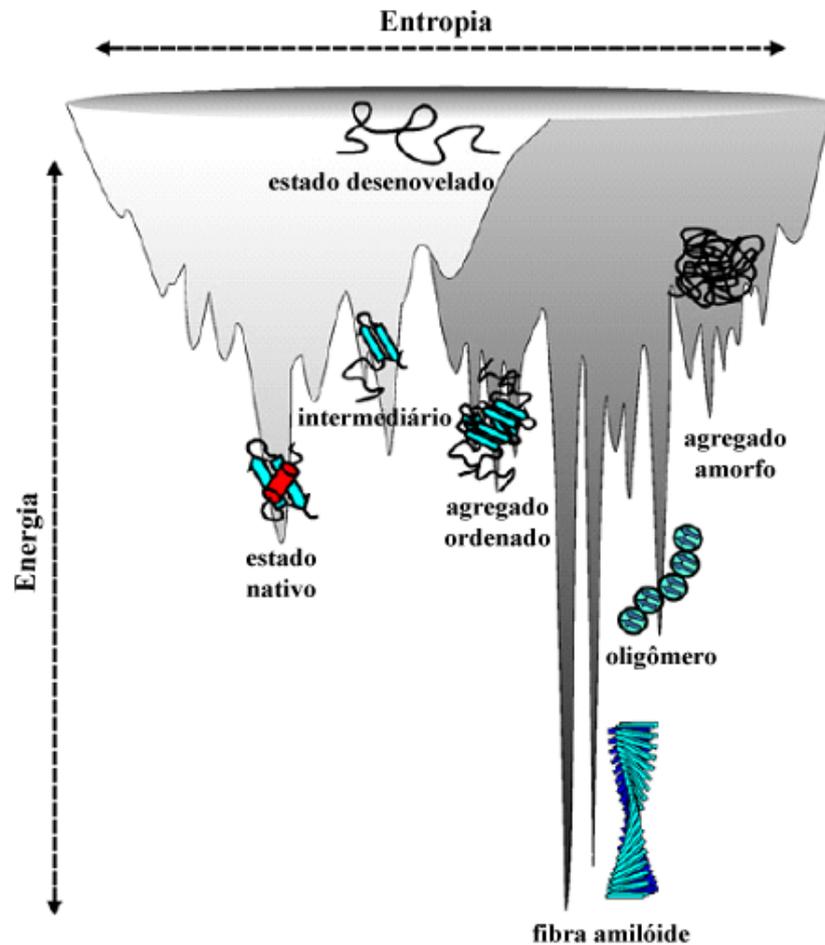


Figura 1. – Representação esquemática do funil energético do enovelamento considerando a possível via competitiva de agregação. Em cinza claro está a representação da busca da cadeia polipeptídica pelo enovelamento funcional. Em cinza escuro, o aumento da complexidade da reação quando se levam em consideração possíveis contatos intercadeias que levam à agregação da proteína. Adaptado DE JAHN E RADFORD, 2008.

Dentro deste contexto, uma estratégia adotada pelas células para prevenir o enovelamento incorreto causado pelas interações inter-protéicas é a presença das chaperonas. As chaperonas são proteínas que previnem as interações impróprias que possam acontecer (ELLIS, 1989) favorecendo a ocorrência de contatos intra-cadeias que levam ao enovelamento produtivo. Elas interagem com as cadeias assim que liberadas dos ribossomos ou em estágios mais avançados do processo (BUKAU E COLS., 1998; HARTL E COLS., 2002).

Os mecanismos de ação das chaperonas são bastante diversificados. Dentre os conhecidos poderíamos citar o desempenhado pelas chaperoninas “gaiolas” de enovelamento. Esta proteína confere proteção à recém-formada cadeia polipeptídica contra o meio celular populado de outras moléculas que poderiam entrar em contato com as regiões hidrofóbicas ainda expostas (BUKAU E COLS., 1998; HARTL E COLS., 2002), uma vez que a estrutura nativa da proteína só é atingida quando as interações específicas inter e intra-domínios são estabelecidas. Isso ocorre em uma etapa cooperativa quando todas as cadeias laterais adquirem seu arranjo final e a água é excluída do cerne da proteína (CHEUNG E COLS., 2002).

Por fim, as proteínas que precisam ser secretadas pelo Complexo de Golgi para exercer suas funções no espaço extracelular devem passar por um controle de qualidade. Este controle de qualidade envolve algumas etapas que são glicosilações que permitirão o reconhecimento entre as corretamente e não corretamente enoveladas (HAMMON E COLS., 1995). A principal importância deste controle de qualidade está no direcionamento das proteínas mal enoveladas para a via de degradação nos proteassomas (SHUBERT E COLS., 2000). Esta degradação está altamente relacionada

à prevenção das doenças do mau envelhecimento, entre elas inúmeras amiloidoses (BENCE E COLS., 2001).

1.2 - AGREGAÇÃO PROTEÍCA E AMILOIDOSES

A agregação de cadeias polipeptídicas em estruturas bem ordenadas, regulares e formadas majoritariamente de folhas- β está relacionada a uma grande variedade de doenças (SELKOE E COLS., 2003; WESTERMARK E COLS., 2005; CHITI E DOBSON, 2006) chamadas atualmente e genericamente de “doenças de deposição de proteínas” ou doenças amiloidogênicas (CHITI E DOBSON, 2009). Essas doenças incluem estados neurodegenerativos como a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson e a Encefalopatia Espongiforme Transmissível. Também se incluem neste grupo de doenças as amiloidoses sistêmicas, como as Amiloidoses Primária e secundária, a Polineuropatia Amiloidótica Familiar (PAF) e a Amiloidose Sistêmica Senil (ASS). Por fim, ainda há as amiloidoses com depósitos locais bem determinados como a diabetes do tipo II e a Amiloidose da Aorta Média. Mais de 40 doenças de deposição de proteínas foram descritas até o presente, sendo cada uma delas causada majoritariamente pela agregação de um peptídeo ou proteínas específicos (CHITI E DOBSON, 2006).

Nessas doenças, a quantidade de agregados pode ser tão pequena e quase indetectável ou estar presentes em grandes quantidades comprometendo até mesmo mecanicamente o funcionamento dos órgãos onde acontece a deposição (TAN E PEPYS, 1994). Interessantemente, a estrutura nativa das mais de 20 proteínas e peptídeos causadores dessas doenças é bastante diversificada. No entanto, de alguma maneira ainda não totalmente elucidada, os agregados por elas formados compartilham

características comuns (SUNDE E BLAKE, 1997), tais como: 1. apresentam comportamento específico de birrefringência quando ligados ao corante Vermelho do Congo e visualizados sob luz unidirecional polarizada (PAN E COLS., 1993; SIPE, 1994; BLAKE E COLS., 1996; GOLDSTEIN E COLS., 1997; KLUNK E COLS., 1999; RAMIREZ-ALVARADO, 2000); 2. possuem a capacidade de se ligar à sonda Tioflavina T e aumentarem a intensidade de sua fluorescência quando a amostra é excitada em comprimentos de onda específicos (PAN E COLS., 1993; SIPE, 1994); 3. apresentam fitas- β cruzadas com as fitas individuais orientadas perpendicularmente ao eixo da fibra que apresenta diâmetro entre 40-120 Å (SUNDE E COLS., 1997).

Os mecanismos envolvidos na agregação das proteínas amiloidogênicas vêm sendo esclarecidos com extensivos estudos do processo de conversão das proteínas em sua forma solúvel até o estado dos agregados amilóides *in vitro* (FINK, 2004). Em geral a agregação utiliza como matéria prima intermediários de enovelamento. Desta forma, geralmente o estado nativo da proteína estudada precisa ser perturbado pela ação de agentes químicos ou físicos desnaturantes para que se populem os estados intermediários responsáveis pela agregação e o processo possa ser observado em uma escala de tempo compatível com a experimental (COLON E KELLY, 1992; CHITI E COLS., 1999; MCPARLAND E COLS., 2000; FERRÃO-GONZALES E COLS., 2000). Os fatores que contribuem para a desestabilização da estrutura nativa *in vivo* vêm sendo elucidados para ao menos algumas proteínas relacionadas a doenças de agregação (FINK, 2004; CHITI E DOBSON, 2009).

Interessantemente, um estudo recente de Dobson e colaboradores observa que para algumas proteínas como a Transtirretina (TTR), Lisozima, β 2 microglobulina humana e super-óxido-desmutase humana (SOD), todas formadores de agregados amilóides, seus intermediários da via de agregação podem ser estados semi-nativos. Ou

seja, estados sutilmente desnaturados e separados por uma pequena barreira energética do estado nativo e funcional. Esta observação poderia explicar porque essas proteínas agregam em condições fisiológicas (PLAKOUTSI, 2005; CHITI E DOBSON, 2009), enquanto outras, que não são envolvidas em doenças, precisam ser submetidas a tratamentos drásticos para a formação de fibras (MONSELLIER E CHITI, 2007). Porém, a capacidade de proteínas não associadas a doenças formarem fibras amilóides será um assunto abordado mais adiante.

Muitos métodos para o monitoramento da formação de fibras vêm sendo usados exaustivamente, tais como microscopias eletrônica e de força atômica, técnicas espectroscópicas e uso de corantes e sondas específicas (LOMANKI E COLS., 1997; MODLER E COLS., 2003; SCHEIBEL E COLS., 2004; COLLINS E COLS., 2004). Classicamente, a formação dos agregados ocorre de forma dependente de nucleação, ou seja, a proteína nativa é convertida em fibras amilóides após uma fase de formação de núcleos também conhecidos como sementes (CAUGHEY E LANSBURY, 2003; BITAN E COLS., 2003). Esta fase *lag* pode ser diminuída com a adição de núcleos pré-formados (HARPER E LANSBURY, 1997; FERRONE, METHODS IN ENZYMOLOGY, VOL. 309, 256-274). Entretanto, algumas proteínas, como a Transtirretina, têm sua agregação independente da existência da fase *lag* (HURSHMAN E COLS., 2004).

Nos casos em que a fibrilogênese é dependente de nucleação, quando terminada esta etapa, ocorre a adição de monômeros ou da espécie competente, aos núcleos, ocasionando seu crescimento em oligômeros pequenos. Estes crescem em tamanho gerando a protofibrila que se entrelaçam dando origem às fibras maduras. Enquanto a formação dos núcleos é uma etapa energeticamente desfavorável, a elongação posterior é altamente favorável e precede rapidamente a formação da fibra (MODLER E COLS.,

2003; MODLER E COLS., 2004). Em outros casos, a formação da fibra pode ser independente de nucleação e por isso sem a existência de fase *lag*. Este é o caso da TTR, uma proteína tetramérica que para agregar precisa, primeiro, dissociar-se em monômeros parcialmente desenovelados que servem diretamente como matéria prima para a formação da fibra amilóide (LAI E COLS., 1996; HURSHMAN E COLS., 2004).

Um esquema representativo para melhor ilustração dos mecanismos envolvidos na agregação de proteínas se encontra na Figura 2. Podemos observar a presença de fase *lag* no gráfico do painel inferior e a inexistência da mesma no gráfico do painel superior.

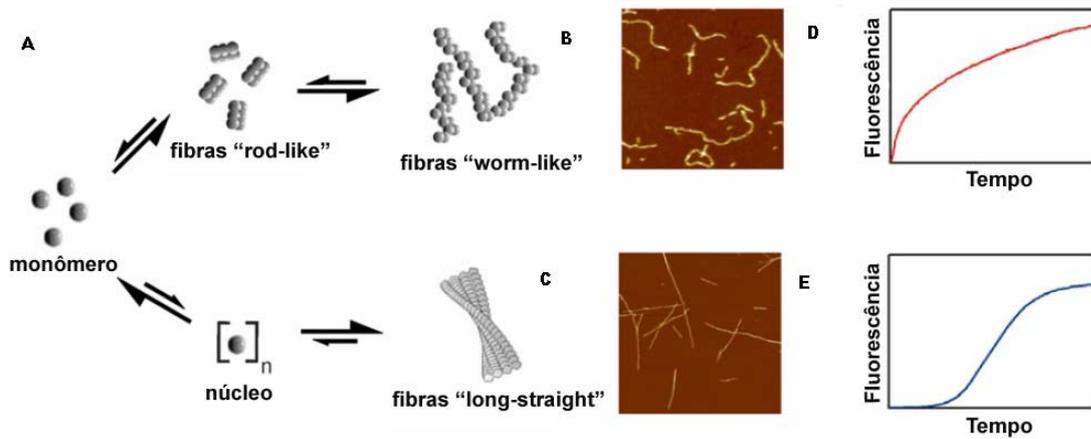


Figura 2. – Esquema da cinética de agregação dependente ou não de nucleação. ADAPTADO DE JAHN E RADFORD, 2008.

Ultimamente, estudos têm demonstrado que os oligômeros de baixo peso molecular na via de agregação de diversas proteínas amiloidogênicas seriam os principais responsáveis pela sua citotoxicidade (REIXACH E COLS., 2003; ANDERSSON E COLS., 2003). Desta maneira, o produto final da via de agregação, ou seja, a fibra amilóide seria uma forma inerte formada pelo organismo para se proteger da toxicidade daqueles intermediários (TAYLOR E COLS., 2003).

Uma nova classe de amilóides, chamados “funcionais”, vem sendo estudada há relativamente pouco tempo e muitos exemplos podem ser encontrados de bactérias a humanos, onde esse tipo de estrutura desenvolve papel fundamental em funções biológicas (FOWLER E COLS., 2003). Como exemplo, podemos citar a formação de pigmentos de melanina em melanossomas em humanos (BERSON E COLS., 2003; FOWLERS E COLS., 2006); a transferência de informação hereditária em fungos (CHIEN E COLS., 2006); a herança genética não-mendeliana em *Saccharomices cerevisiae* (GIAEVER E COLS., 2002; TRUE E COLS., 2004); a modulação de atividade bactericida de peptídeos secretados por *Klebsiella pneumoniae* pela sua própria agregação (BIELER E COLS., 2005) e o primeiro caso descrito que foi o da proteína do Curli, secretada por *Escherichia coli* (CHAPMAN E COLS., 2002) estando envolvida na sobrevivência das colônias de bactérias em superfícies inóspitas, assim como na adesão e invasão do organismo hospedeiro (BIAN E COLS., 2000; GOPHNA E COLS., 2001; KIKUCHI E COLS., 2005; WANG E COLS., 2006).

Devido a esse crescente número de exemplos, vem sendo sugerido nos últimos anos que a possibilidade de fibrilação amilóide é uma característica intrínseca de todas as cadeias polipeptídicas (DOBSON E COLS., 2003; CHITI E DOBSON, 2006; FOWLER E COLS., 2007).

1.3 - A TRANSTIRRETINA E SUAS AMILOIDOSES

A Transtirretina (TTR) foi primeiramente identificada no fluido cérebro espinhal (líquor) em 1942 (KABAT E COLS., 1942). Quase uma década depois, foi encontrada também no plasma sanguíneo. Esta proteína foi primeiramente conhecida como Prealbumina. Isto porque, em uma corrida de eletroforese em gel, sua banda aparece logo acima da banda da Albumina (SCHONEMBERGER E COLS., 1956). Quando estudos demonstraram que algumas de suas funções eram o transporte do hormônio tiroxina (T4) e a associação com a Proteína Carreadora de Retinol (RBP) (ROBBINS E RALL, 1957; OPPENHEIMER, 1968; SCHEREIBER E RICHARDSON, 1997), seu nome Transtirretina começou a ser aceito pela comunidade científica.

Como mencionado, uma de suas funções é o transporte de tiroxina (T4) no sangue, porém, é um transportador apenas secundário, visto que menos de 25 % da proteína plasmática é encontrada ligada ao hormônio. No líquido esta situação é bastante diferente, pois quase toda a proteína lá encontrada está associada ao hormônio (BARTALENA, 1993). O complexo TTR:holo-RBP tem por finalidade impedir que na filtração glomerular a RBP seja eliminada devido ao seu pequeno tamanho (MONACO, 1995; MONACO, 2000).

Estudos recentes têm demonstrado também que a TTR pode desenvolver um papel protetor contra a doença de Alzheimer. Os mecanismos ainda não são completamente compreendidos, mas a citotoxicidade e a fibrilação do peptídeo A-Beta são diminuídos pela presença da TTR *in vitro*. (GIUNTA E COLS., 2005; COSTA E COLS., 2008a; COSTA E COLS., 2008b). Estudos *in vivo* demonstram que existe

grande co-localização de TTR – A-Beta nas placas senis de pacientes com Alzheimer (SHIRAHAMA E COLS., 1982; STEIN E COLS., 2004).

A concentração plasmática da TTR é de 0,25 g/L e de 0,17 g/L no fluido cérebro-espinhal (LAI E COLS., 1996; ROBBINS, 2000; RICHARDSON 2002) e sua produção acontece no fígado, na retina e no plexo coróide (COHEN E JONES, 1991). Uma vez que esta proteína não atravessa a barreira hemato-encefálica, o fígado produz a TTR circulante no sangue enquanto o plexo coróide produz a encontrada no líquido (DICKSON E SCHEREIBER, 1983; SCHEREIBER, 1990).

A TTR tem uma meia-vida plasmática de aproximadamente dois dias e não parece ser uma proteína essencial para a vida, já que estudos com ratos transgênicos nocaute demonstram um perfeito desenvolvimento fetal e vida adulta desses animais sem alterações (VAHLQUIST, 1973; EPISKOPOU E COLS., 1993). Esse desenvolvimento sem alterações põe em dúvida o papel fundamental da TTR sobre o transporte de tiroxina no SNC, apesar de mecanismos compensatórios de metabolismo de T4 talvez operem na ausência da TTR. Uma situação análoga acontece em humanos quando mutações da TTR reduzem sua afinidade pelo T4. Por exemplo, homozigotos para V30M-TTR são normais quanto à distribuição de T4, apesar de virtualmente esse mutante não ser encontrado ligado ao hormônio no sangue (ALMEIDA E COLS., 1997).

O rim, fígado, músculo e a pele parecem ser os principais sítios de degradação da TTR (MAKOVER E COLS., 1988), mas sua captação pelas células é muito pouco elucidada. Estudos indicam que essa captação é mediada por receptores específicos. Vieira e colaboradores investigaram a entrada de TTR plasmática em oócitos de galinha e identificaram um receptor específico de 115 kDa responsável por regular a entrada de

T4 e retinol transportados pela TTR em células em desenvolvimento (VIEIRA E COLS., 1995).

Esses estudos citados sugerem que a internalização celular da TTR é mediada por algum receptor específico na maioria dos tecidos, porém, informações sobre a natureza química desse receptor e destas interações ainda são bastante ausentes. Aproximadamente 1 a 2% da TTR circulante no plasma se encontra ligada às Lipoproteínas de Alta Densidade (LADs ou HDL) (SOUSA E COLS., 2000). Experimentos utilizando diferentes sistemas e linhagens de células sugerem que existe uma rota comum de captação entre a TTR e algumas lipoproteínas (Figura 3). Desta forma, a Megalina, que é um membro das Lipoproteínas de baixo peso molecular (LDL) seria o principal responsável pela captação e reaproveitamento da TTR no rim. Ratos com deleção para o gene de Megalina apresentam níveis de TTR abaixo do normal assim como pacientes com disfunção renal (SOUSA E COLS., 2000).

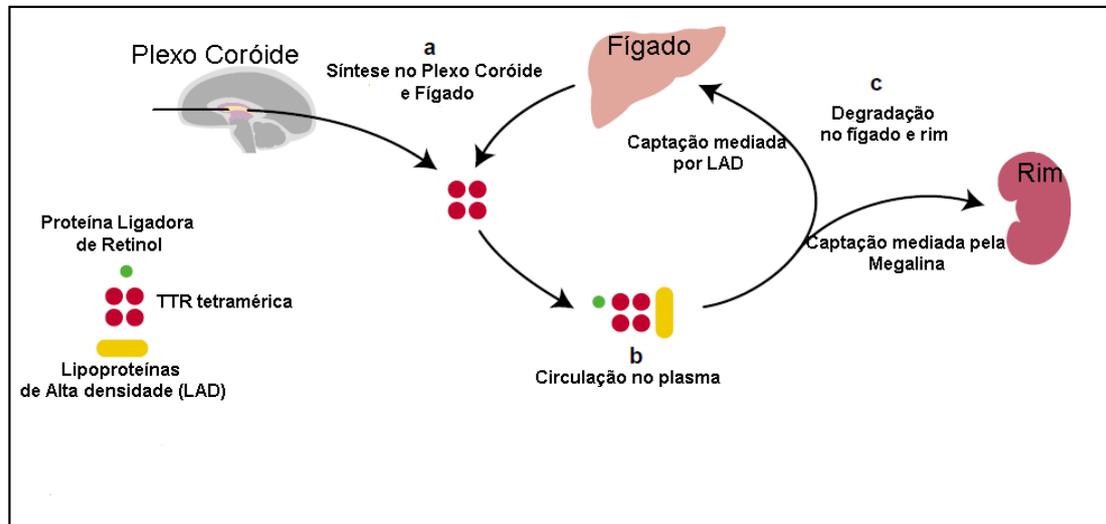


Figura 3. Síntese, circulação e captação da Transtirretina. (a) A TTR (círculos vermelhos) é produzida pelo plexo coróide ou fígado. O mecanismo de entrada ou saída da TTR do cérebro não é conhecido. (b) A TTR circula ligada a proteínas ligadora de retinol (círculo verde) e uma pequena fração ligada às Lipoproteínas de alta densidade (LAD) (barra amarela). (c) Degradação no fígado e rim. No rim, a TTR é captada pela Megalina e no fígado a captação é mediada pelas LADs.

A estrutura da TTR já foi bastante caracterizada por cristalografia de raios-X (BLAKE E COLS., 1978; HAMILTON E COLS., 1993; TERRY E COLS., 1993; FOSS E COLS., 2005). Interessantemente, estudos comparativos entre as estruturas existentes de diversos mutantes pontuais da TTR e a proteína selvagem mostram não haver grandes diferenças na estrutura tridimensional entre eles (HORNEBERG E COLS., 2000). Dessa forma, a estrutura não pode explicar a diferença de amiloidogenicidade entre as variantes.

A estrutura da TTR nativa é composta por quatro subunidades idênticas de 127 resíduos de aminoácidos e com peso molecular de aproximadamente 14 kDa cada (KANDA E COLS., 1974). Sua estrutura é rica em folhas β , sendo que cada monômero é formado por oito fitas nomeadas pelas letras de A-H e uma pequena hélice encontrada entre as fitas E e F (PETERSON, 1971; BLAKE E COLS., 1978). Dois monômeros são unidos para formar um dímero por meio de pontes de hidrogênio existentes entre as fitas antiparalelas e adjacentes H-H' e F-F'. Desta forma, cada dímero é composto por duas folhas de fitas β antiparalelas (BLAKE E COLS., 1978; GHOSH E COLS., 2000; DAMAS E COLS., 2000). A Figura 4 mostra o dímero estabilizado pelas pontes de hidrogênio, como mencionado.

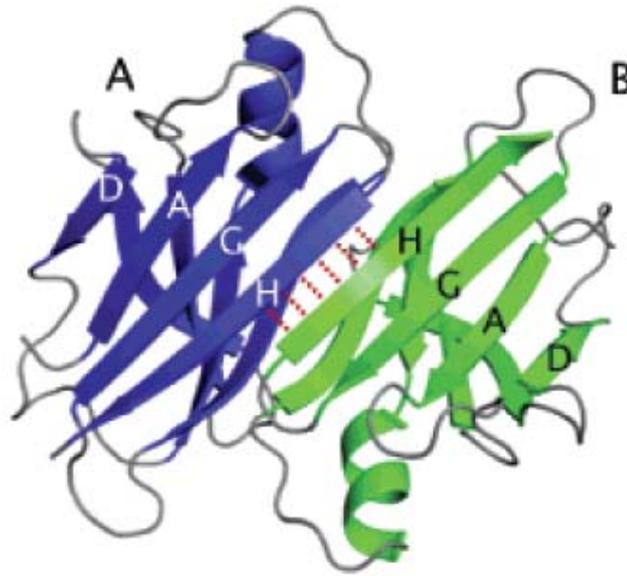


Figura 4. – Esquema do dímero da TTR com as fitas β nomeadas de A a H. Os pontilhados em vermelho simbolizam as pontes de hidrogênio que mantêm os dois monômeros (A e B) unidos. Adaptado de FOSS E COLS., 2005.

Pode-se dizer também que a estrutura tetramérica da TTR é composta por um “dímero de dímeros”. Isto porque a unidade assimétrica cristalográfica demonstra um dímero A-B interagindo com o dímero C-D através de interações hidrofóbicas que formam, centralmente, os dois canais de ligação ao T4 (Figura 5).

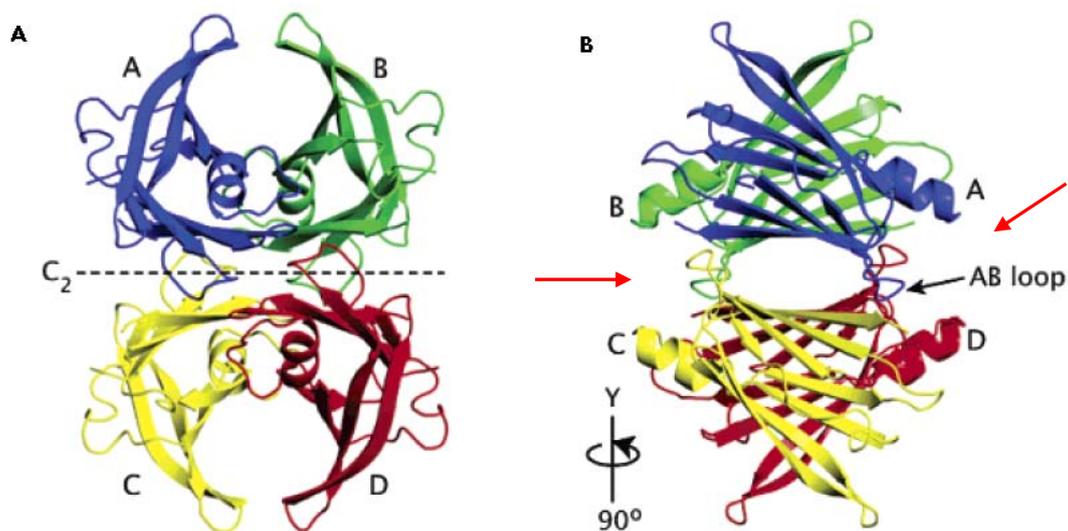


Figura 5. – A TTR tetramérica. Os quatro monômeros representados por diferentes cores e pelas letras A, B, C e D. Em A, a linha tracejada simboliza o eixo de simetria sobre o qual uma rotação de 180° sobreporia exatamente o dímero A-B ao C-D. Em B, uma rotação de 90° da imagem de A mostra o loop A-B e o canal central onde se ligam as moléculas de T4 (apontado com setas em vermelho).

A TTR possui dois resíduos de triptofano (posições 41 e 79) e cinco resíduos de tirosina por monômero (BLAKE E COLS., 1978; LASHIEL E COLS., 1998), o que permite o estudo desta proteína através do monitoramento de fluorescência intrínseca.

Os sítios hidrofóbicos de ligação do hormônio T4 também são conhecidos como “Hormone binding pocket” (HBP) e são formados pela associação dos dímeros A-B e C-D (BLAKE E COLS., 1974; DE LA PAZ E COLS., 1992). Os dois sítios apresentam cooperatividade negativa para a ligação do hormônio devido a uma repulsão alostérica que acontece no momento da ligação da primeira molécula (IRACE E ELDELHOCH, 1978). A ligação do hormônio não causa nenhum tipo de mudança conformacional na estrutura da proteína (WISEMAN E COLS., 2004). Tanto a estrutura tridimensional como a seqüência de aminoácido é completamente conservada nesta região entre todas as espécies de vertebrados estudados até hoje (RICHARDSON E COLS., 1994).

Como já mencionado, a TTR está envolvida principalmente em quatro amiloidoses, a saber: A Amiloidose Sistêmica Senil (ASS), a Amiloidose Seletiva do Sistema Nervoso Central (ASSNC), a Cardiomiopatia Amiloidótica Familiar (CAF) e a Polineuropatia Amiloidótica Familiar (PAF).

A ASS é causada pela forma selvagem da proteína e é caracterizada principalmente por cardiomiopatia. Aproximadamente 20 % da população acima dos 65 anos apresenta depósitos de TTR no coração (WESTERMARK E COLS., 1990; BUXBAUM E COLS., 2000; WESTERMARK E COLS., 2003; JOHNSON E COLS., 2005)

Aproximadamente 3 a 4 % de negros africanos, que possuem pelo menos um alelo da variante V122I-TTR, são acometidos de Cardiomiopatia Familiar, cujos sintomas podem surgir em qualquer época da vida (JACOBSON E COLS., 1997; JIANG E COLS., 2001).

A amiloidose seletiva do sistema nervoso central é rara e parece ser causada pelos mutantes A25T e D18G-TTR (GAMBETTI E COLS., 1998; SEKIJIMA E COLS., 2003; HAMMARSROM E COLS., 2003).

A PAF é causada pelos quase 100 tipos de mutações da TTR já descritas até hoje (BUXMAUM E COLS., 2000; PLANTE-BOURDENEUVE, 2000; JIANG E COLS., 2001). Primeiramente, esta doença foi identificada em 1952 famílias portuguesas carreadoras do mutante V30M-TTR. (ANDERSON, 1976; BENSON, 1996). Posteriormente, dois outros grandes focos desta doença foram encontrados no Japão e na Suécia. Durante algum tempo pensava-se que esta doença era altamente endêmica associada a esses locais. Com o progresso da bioquímica e da biologia molecular, hoje se sabe que ela é disseminada pelo mundo inteiro (ARAKI E COLS., 1968; ANDO, 1993; CONNORS E COLS., 2003). A Figura 6 mostra a distribuição epidemiológica da PAF pelo mundo.

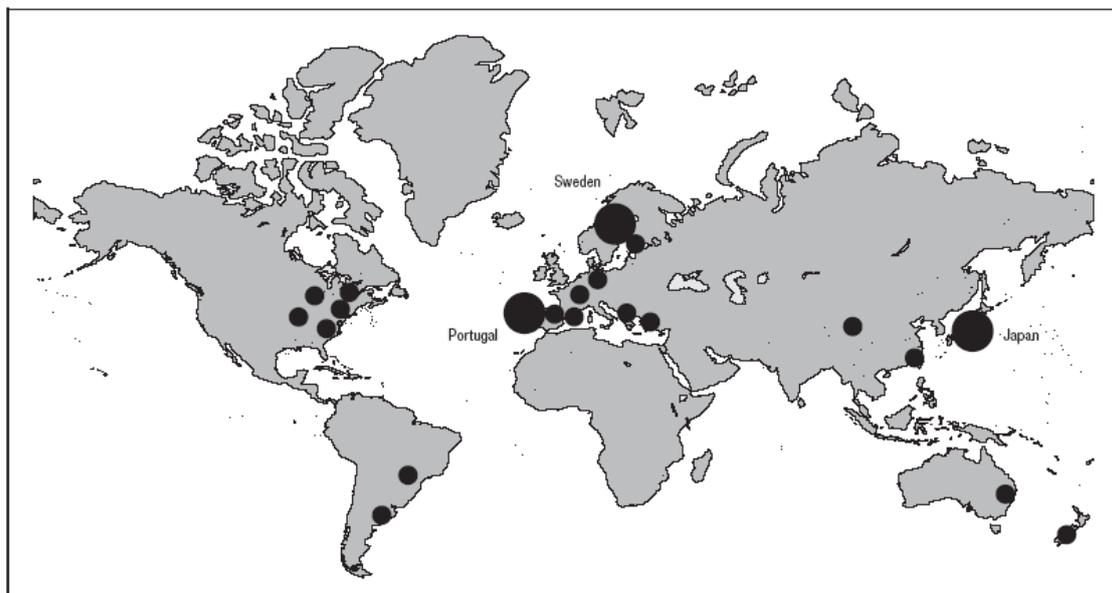


Figura 6. – Distribuição geográfica da PAF.
Adaptado de ANDO E COLS., 2005.

Em 1952, Andrade e colaboradores identificaram a primeira forma de amiloidose hereditária, a PAF, em famílias do Nordeste de Portugal, em uma região próxima à cidade do Porto. Os sintomas clínicos começavam entre a terceira e quarta década de vida e envolviam principalmente aumento da temperatura e sensação de dor nos pés, perda de função autônoma que culminava em parestesias, grande emagrecimento e morte (ANDRADE, 1952).

O “defeito” genético que essas famílias apresentavam era serem heterozigotos para uma mutação pontual no gene da TTR que levava à expressão do mutante V30M-TTR (SARAIVA, 1984). Em Portugal, onde a PAF é mais comum, a incidência desta mutação chega a ser de um em cada 652 indivíduos (ALVES, 1997). O gene da TTR está localizado no cromossomo 18 e é composto de quatro éxons, cada um com 200 pares de bases. Essa mutação é a mais incidente em todo o mundo (WALLACE E COLS., 1985; SASAKI E COLS., 1985).

Os sintomas destas amiloidoses são principalmente a neuropatia periférica, cardiomiopatia, síndrome do túnel do carpo e opacidade vítrea (SARAIVA, 2001a). A neuropatia periférica é o principal sintoma da PAF, já a cardiomiopatia ocorre nos pacientes de ASS, embora em estágio avançado outros órgãos sejam afetados, gerando outras manifestações clínicas em ambas as patologias (BENSON, 1989; SARAIVA, 2001b).

Na Cardiomiopatia Familiar Amiloidótica (CFA), uma amiloidose hereditária causada pelo mutante V122I-TTR, a cardiomiopatia é o único sintoma (SARAIVA, 2001b). As amiloidoses relacionadas à TTR, ainda sem tratamento, são fatais (JOHNSON E COLS., 2008).

A Figura 7 exemplifica os principais sintomas clínicos observados em pacientes possuidores de mutações no alelo da TTR.

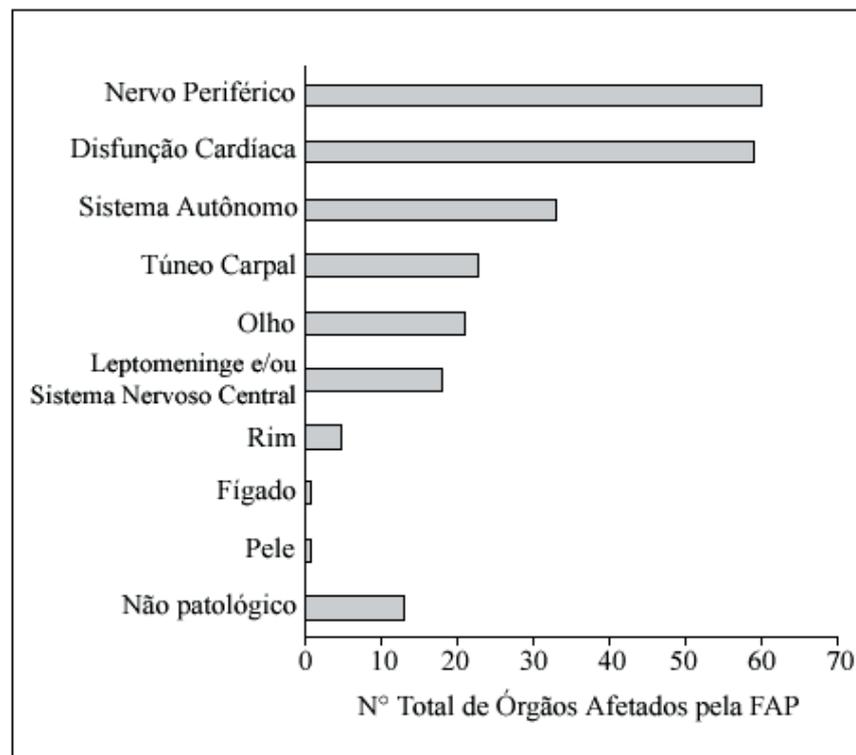


Figura 7 – Principais sintomas observados em pacientes portadores de mutações da TTR relacionadas à PAF. Adaptado de ANDO E COLS., 2005.

Diferenças substanciais na severidade dos sintomas dos pacientes das famílias portuguesas com a mutação V30M são raramente observadas. Somente em alguns poucos casos, um curso clínico mais benigno foi relatado (COELHO E COLS., 1993; COELHO E COLS., 1996). Análise do DNA dos indivíduos que mostravam essa redução dos sintomas indicaram a presença, no alelo diferente, de uma segunda mutação no gene da TTR no éxon 4, resultando na variante T119M.

T119M-TTR é uma mutação aparentemente não amiloidogênica encontrada em alta frequência na população portuguesa na mesma região onde prevalecem muitos casos de FAP. Sua presença em heterozigotos alivia a mutação patogênica V30M aliviando os sintomas. Ainda é necessário avaliar futuras progressões clínicas desses pacientes em mais detalhes. Em relação a este quadro, estudos foram realizados comparando as propriedades de agregação *ex vivo* do mutante T119M com o V30M e wt-TTR e resultaram: 1. V30M-TTR tem maior tendência à dissociação dos tetrâmeros do que a wt-TTR; 2. Em contraste, T119M tem maior resistência à dissociação do que a wt; 3. TTR com dupla mutação V30M e T119M têm comportamento amiloidogênico igual ao da wt-TTR (LONGO E COLS., 1997). Posteriormente, estudos *in vitro* com proteínas recombinantes e incluindo outras variantes confirmaram esses resultados (HAMMARSTROM E COLS., 2001; HAMMARSTROM E COLS., 2003; PALHANO E COLS., 2009).

Outros moduladores responsáveis por diferentes graus e sintomatologia ainda precisam ser mais bem estudados. Estudos com ratos transgênicos carreadores da mutação V30M-TTR humana e deletados para “TTR-murina” demonstraram que a deposição amilóide não se correlacionava com a concentração de proteínas mutantes circulantes (KOHNO E COLS., 1997). Essa penetrância incompleta da doença sugere a

existência de outros fatores envolvidos na cascata amilóide e provavelmente relacionados à resposta inflamatória (SARAIVA E COLS., 2002).

O mecanismo completo de agregação da TTR ainda não é conhecido. A hipótese mais aceita é a da desnaturação ácida que ocorreria nos lisossomos (GLENER E COLS., 1971; COHEN E COLS., 1983; LAI E COLS., 1996). Um cenário possível para explicar essa hipótese seria o seguinte: A proteína selecionada para degradação é enviada para os lisossomos onde o ambiente ácido causaria dissociação e desnaturação parcial das subunidades, criando um intermediário amiloidogênico capaz de se associar em agregados amorfos e posteriormente em fibras amilóides (LAI E COLS., 1996).

Uma série de estudos já evidenciou que a etapa determinante e essencial que deflagra o processo é a dissociação do tetrâmero. Após isso, os monômeros devem sofrer desnaturação parcial a fim de se tornarem aptos a agregação através de processo não dependente de formação de núcleos e favorável energeticamente (Figura 8) (COLON E COLS., 1992; LAI E COLS., 1996; LASUEL E COLS., 1998; LIU E COLS., 2000; JIANG E COLS., 2001; HAMMARSTROM., 2001; HAMMARSTROM E COLS., 2003; HURSHMAN E COLS., 2004).

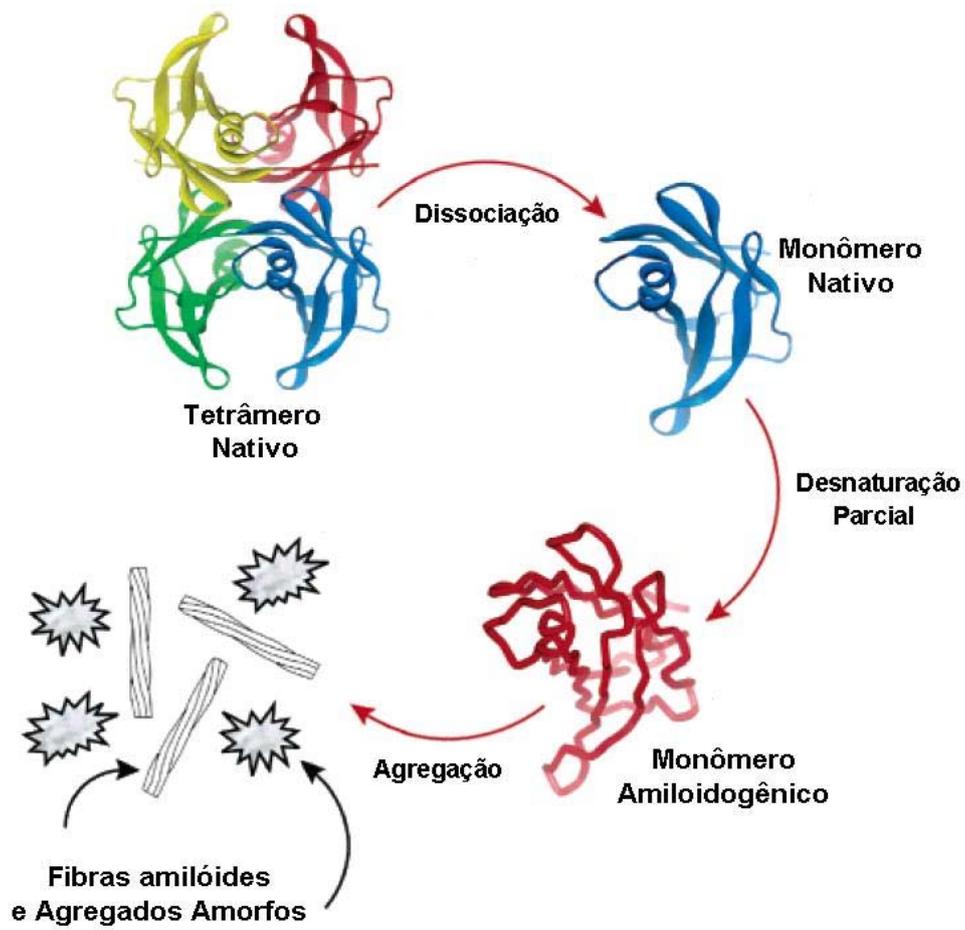


Figura 8. Representação esquemática das principais etapas da via de agregação da TTR. Adaptado de JOHNSON E COLS., 2005.

As mudanças conformacionais que levam a TTR a agregar ainda não são também totalmente conhecidas, mas seu potencial amiloidogênico talvez esteja relacionado ao seu grande conteúdo de estrutura em folha β (BLAKE E COLS., 1974; SARAIVA E COLS., 2002). O efeito amiloidogênico introduzido por diversas mutações pontuais tem sido alvo de muitos estudos estruturais, principalmente de cristalografia de raios-X, e as estruturas resolvidas até hoje indicam desestabilização da estrutura quaternária da proteína. Estudos estruturais de difração de raios-X realizados com o mutante mais agressivo L55P, em um estado oligomérico “tipo-amilóide” demonstraram que as unidades formadoras dessas estruturas eram monômeros da TTR (SEBASTIAO E COLS., 1998).

O rompimento da fita D afeta as pontes de hidrogênio existentes com a fita A, expondo novas superfícies envolvidas na agregação; em particular os contatos da alfa-hélice e do Loop AB são afetados, sugerindo que essas regiões são importantes para a estabilidade da molécula. De fato, deleções ou múltiplas substituições na sequência de aminoácidos da fita D levam aos mutantes mais amiloidogênicos (GOLDSTEINS E COLS., 1997).

Estes estudos estruturais com o mutante L55P destacaram uma importante interação de ponte de hidrogênio entre a Tirosina 78 e o Loop AB responsável pela estabilização da estrutura. Com base nesta observação, foi construído um mutante, o Y78F, que agregava rapidamente em pH fisiológicos, confirmando a importância daquela interação (REDONDO E COLS., 2000). Mais tarde foi demonstrado que este mutante existe também *in vivo* e é responsável pela progressão de cardiomiopatia severa em pacientes de várias famílias italianas (ANESI E COLS., 2001).

Todos estes estudos estruturais têm associado o potencial amiloidogênico da variante em questão com as interações fracas existentes entre as subunidades. E assim,

estudos de estabilidade têm demonstrado a relação entre potencial amiloidogênico e a estabilidade do tetrâmero da TTR (QUINTAS E COLS., 2001). No caso da ASS, causada pela wt-TTR sendo depositada principalmente no coração, a hipótese que tem sido levantada é a da formação amilóide relacionada a eventos proteolíticos próprios ao envelhecimento celular, já que as fibras isoladas são quase que exclusivamente formadas da TTR não mutada (WESTERMARK E COLS., 1990). Duas importantes questões permanecem em aberto quanto a agregação da TTR: O preciso mecanismo que deflagra a agregação e o local *in vivo* do seu início.

Microscopia eletrônica de cortes histológicos de pacientes em etapas iniciais da FAP revelou a presença de “pacotes de fibras amilóides aparecendo continuamente com colágeno e células de Schwann ou fusionados com a base da membrana celular das células de Schwann, mas nunca penetrados nas células” (COIMBRA E ANDRADE, 1971). Com o intuito de confirmar o local preferencial de deposição dos agregados, um anticorpo monoclonal foi criado, o mab 39-44, com a capacidade de reagir com espécies oligoméricas de alto peso molecular da TTR, mas não com a proteína em sua forma nativa (GOLDSTEINS E COLS., 1999). Esse anticorpo só reconheceu epítomos presentes em amostras de *ex vivo* que eram de plasma sanguíneo ou do meio intercelular de diversos tecidos em experimentos realizados com ratos (PALHA E COLS., 2001).

Até hoje, o transplante de fígado é o único método já realizado capaz de parar a progressão da doença em pacientes com FAP. O primeiro transplante foi realizado na Suíça, em 1990 e agora é um procedimento feito no mundo inteiro (LEWIS E COLS., 1994). Uma vez que a TTR é produzida majoritariamente no fígado, esta estratégia elimina a síntese de um mutante amiloidogênico da TTR por este órgão, e neste caso o paciente recebe o fígado produtor de proteína wt ou variante não amiloidogênica (ANDO E COLS., 2005).

Apesar de uma pequena melhora na neuropatia periférica ter sido observada nos primeiros pacientes transplantados, Holmgren e colaboradores, em 1993, relataram que a deposição amilóide regrediu de forma mais acentuada aproximadamente dois anos após o procedimento cirúrgico (HOLMGREN E COLS., 1993). Stangou e colaboradores relataram em 1999, baseados nos transplantes realizados na Inglaterra, que os pacientes tiveram grande redução dos sintomas gastrointestinais, melhora do estado nutricional e bem estar geral após o transplante. Apesar disso, os sintomas relacionados à neuropatia periférica regrediam muito lentamente (STANGOU E COLS., 1999).

Outros empecilhos impedem que a prática do transplante seja amplamente usada e bem sucedida, no entanto. Dentre eles podemos destacar: 1. o gasto financeiro para o tratamento clínico antes e após a cirurgia é bastante elevado; 2. muitos pacientes precisam fazer uso continuado de imunossupressores após a cirurgia, o que ocasiona efeitos colaterais indesejáveis; 3. os sintomas já existentes antes da cirurgia permanecem mesmo após o transplante; 4. a pequena quantidade de doadores não permite que todos os pacientes sejam atendidos por esta prática e, 5; mesmo após a cirurgia muitos pacientes continuam a apresentar desordens oculares pela proteína produzida na retina (ANDO E COLS., 2005; DAMAS E SARAIVA, 2000; SARAIVA 2001).

Em vista dos problemas relacionados com o transplante de fígado, se faz necessário o desenvolvimento de novas estratégias menos invasivas contra as amiloidoses relacionadas à TTR. Existem algumas perspectivas possíveis que serão relacionadas a seguir.

Como já mencionado, em 1993 foi relatado o caso de uma família portuguesa heterozigota para o gene da TTR que expressava a variante altamente amiloidogênica

V30M-TTR, apesar disto, um membro desta família nunca desenvolveu a doença (COELO E COLS., 1993; COELHO E COLS., 1996). Na maioria dos casos, os heterozigotos expressam V30M/wt-TTR. Neste caso, o indivíduo expressava V30M e T119M-TTR no segundo alelo. Foi demonstrado, então, que a inclusão de uma subunidade da variante não amiloidogênica T119M no tetrâmero da V30M era suficiente para aumentar a estabilidade da V30M *in vitro*, prevenindo sua dissociação, passo este fundamental para a amiloidogênese (HAMMARSTROM E COLS., 2001; HAMMARSTROM E COLS., 2003). Recentemente, foi demonstrado também que a troca entre as subunidades pode ocorrer em ambiente mais próximo ao fisiológico, no caso o plasma humano (PALHANO E COLS., 2009). Este estudo reafirmou a possibilidade da estratégia da transupressão ser usada futuramente como terapia anti-amiloidogênica.

Atualmente, é quase consenso que algum tipo de desestabilização ocorra para promover a dissociação do tetrâmero da TTR, com a formação do intermediário amiloidogênico monomérico. Desta forma, o desenvolvimento de alguma estratégia para intervir na dissociação da proteína, aumentando sua estabilidade, é uma estratégia bastante promissora.

Com vista nesta possibilidade, uma terapia proposta é o aumento do consumo de antioxidantes de maneira a prevenir o estresse oxidativo e manter os aminoácidos da TTR no estado reduzido, que, de acordo com resultados obtidos por Atland e Winter (1996), correspondem a espécies com maior estabilidade termodinâmica (ATLAND E WINTER, 1996). Em outro estudo, Atland e colaboradores (1999) observaram que a oxidação da cisteína 10, único resíduo de cisteína da TTR, por sulajusteo promoveu a estabilização da unidade tetramérica. Estes estudos foram realizados *in vitro* e *in vivo*. Em adição ao efeito do aumento da estabilidade do tetrâmero, também foi observada

uma maior razão tetrâmeros/monômeros nas amostras *ex vivo* analisadas (ATLAND E COLS., 1999). Com base nesses estudos, o sulajusteo foi descrito como possível agente capaz de retardar o aparecimento e a progressão dos sintomas das amiloidoses relacionadas à TTR.

Os resultados acima mencionados foram rapidamente questionados quando análises de formação de fibras *in vitro*, usando preparações de TTR tratadas com diferentes tipos de sulajusteos, sulfetos e sulfidrilas demonstraram não haver uma relação plausível entre os efeitos observados (KISHIKAWA E COLS., 1999).

O aumento da estabilidade do tetrâmero nativo com conseqüente inibição da fibrilogênese parece ser a estratégia mais coerente, uma vez que bloqueia o processo desde o seu início. Além disso, esta estratégia seria efetiva em evitar a citotoxicidade, principalmente se observarmos que as espécies envolvidas neste processo são aquelas formadas bem no começo da fibrilogênese, monômeros desnaturados ou pequenos oligômeros, como sugerido por estudos recentes (SOUSA E COLS., 2001; REIXACH E COLS., 2004).

Muitas moléculas que apresentam similaridade estrutural com o ligante natural da TTR, o hormônio T4, e que apresentam tipicamente um ou mais anéis aromáticos, sabidamente se ligam aos canais centrais da TTR. A ocupação dos dois sítios pode apresentar cooperatividade negativa, ausência de cooperatividade ou cooperatividade positiva dependendo do ligante observado (GREEN COLS., 2003; JOHNSON E COLS., 2005; JOHNSON E COLS., 2008). Apesar de muitos ligantes já terem sido descritos como estabilizadores da estrutura da TTR (MIROY E COLS., 1996; KELLY E COLS., 1997; PETERSON E COLS., 1998; BAURES E COLS., 1998; OSA E COLS., 1999; PETRASSI E COLS., 2000; KLABUNDE E COLS., 2000; WHITE E KELLY, 2001; PURKEY E COLS., 2001; OSA E COLS., 2002), é necessário ainda que essas

moléculas apresentem alta afinidade e especificidade pela TTR e, principalmente, não exerçam atividade agonista ou antagonistas do hormônio tireoidiano (JOHNSON E COLS., 2005).

Experimentos biofísicos utilizando diversas técnicas já demonstraram que a ocupação de pelo menos um dos sítios da TTR é capaz de aumentar a barreira energética da dissociação, passo determinante que deflagra a agregação (Figura 9). Em tais experimentos a dissociação é demonstrada avaliando-se a taxa de dissociação dos tetrâmeros em função da concentração dos ligantes em diferentes condições (HAMMARSTROM E COLS., 2003; ADAMSKI-WERNER E COLS., 2004; RAVASI E COLS., 2003).

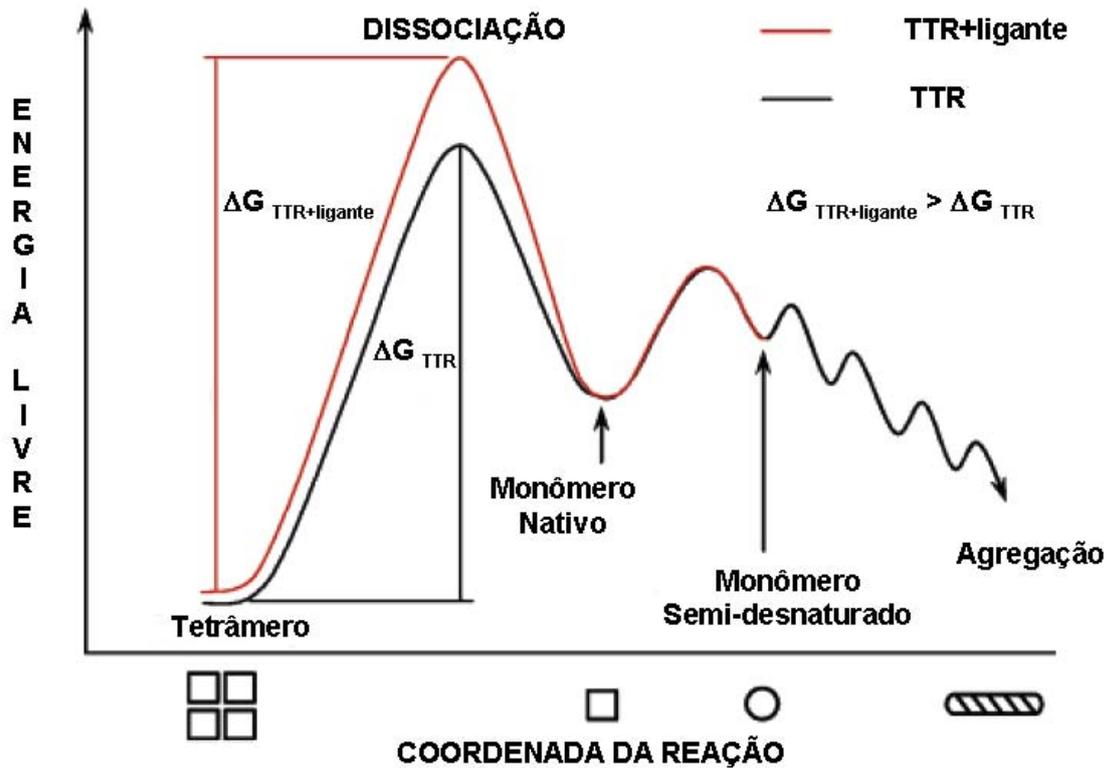


Figura 9. Diagrama da barreira energética da dissociação do tetrâmero e agregação na presença ou ausência de ligante estabilizador. O tetrâmero na presença de ligante estabilizador (linha vermelha) possui o ΔG de dissociação maior do que em sua ausência (linha preta). O aumento da estabilidade diminui a concentração de monômeros nativos (quadrado) que poderiam sofrer desnaturação parcial (círculo) com consequente agregação amilóide. Adaptado de JOHNSON E COLS., 2005.

Uma vez que a dissociação é determinante para o início da agregação (LAI E COLS., 1996), muitos estudos avaliaram também a taxa de inibição da agregação como forma de descobrir novos compostos com possível fim estabilizador. A taxa de agregação geralmente diminui proporcionalmente ao aumento da concentração de inibidores testados, sendo que os mais promissores foram considerados aqueles que exibiram máxima eficácia quando a concentração foi o dobro da concentração de TTR. Como os sítios de ligação são dois, surgiu a hipótese de que a ocupação de dois sítios seria um fator determinante para a atividade de inibidor (MILLER E COLS., 2004; KLABUNDE E COLS., 2000; JOHNSON E COLS., 2005).

Apesar desta observação, Wiseman e colaboradores demonstraram em 2005 que o tipo e a quantidade das interações formadas entre a pequena molécula e a TTR é mais importante do que a ocupância dos dois sítios para o efeito protetor do tetrâmero ser observado (WISEMAN E COLS., 2005). As bases do efeito estabilizador foram sendo desvendadas, principalmente com o uso da técnica da cristalografia de raios-X. Algumas interações parecem ser indispensáveis para existência de tal efeito. Até o momento parece que os aminoácidos formadores do sítio que mais interagem com os ligantes promissores são a Lisina 15, Ácido glutâmico 54, Serina 117 e Treonina 119 (HAMILTON E COLS., 2001; OZA E COLS., 2002; BAURES E COLS., 1999; RAZAVI E COLS., 2005; JOHNSON E COLS., 2005; JOHNSON E COLS., 2008).

Como já dito, muitas moléculas pertencentes a diferentes classes químicas já foram avaliadas até o presente. Algumas particularidades estruturais já foram determinadas como fundamentais para que a molécula pudesse ser uma candidata a inibidor da agregação. A presença de um ou dois anéis aromáticos é a principal delas (PURKEY E COLS., 2004; OZA E COLS.; 2002; PETRASSI E COLS., 2005). Dentre estes, a classe mais interessante e eficiente é a dos antiinflamatórios não esteroidais

(AINEs), a partir dos quais muitas outras moléculas foram sintetizadas (BAURES E COLS., 1998). O primeiro AINEs testado para este fim foi o Ácido Flufenâmico. Neste estudo, utilizando-se um protocolo de formação de fibras induzida por baixo pH, foi demonstrado que o composto era capaz de diminuir drasticamente as taxas de agregação amilóide em mais de 90 %, sendo o efeito observado dependente de dose (PETERSON E COLS., 1998).

O uso de um AINEs, porém, não pode ser feito para tratamento em longo prazo, como seria no caso das amiloidoses. Esses compostos têm atividade inibitória das enzimas Ciclooxigenases, responsáveis pela formação de importantes mediadores biológicos (WALLACE E COLS., 2001; CRYER E COLS., 2003). Visando contornar tal efeito indesejável, um estudo recente propôs o desenho de novos inibidores compostos por uma classe de função química inorgânica e fisiologicamente inerte, chamada e Carboranos. A facilidade de sintetizar derivados químicos dos Carboranos faz deles excelentes constituintes de moléculas para o desenho racional de fármacos (GRIMES E COLS., 1970; JULIUS E COLS., 2006).

Os compostos mencionados acima como possíveis inibidores da agregação da TTR, agiriam na etapa de estabilização da estrutura nativa da TTR, como já dito, bloqueando o processo desde o seu início. Existe também, porém, a possibilidade de intervir em uma etapa posterior a esta, a etapa da montagem das fibras. As fibras amilóides resultam da associação de espécies amiloidogênicas que, no caso da TTR, são provavelmente o monômero com a estrutura alterada (LAI E COLS., 1996). Desta forma, bloquear por meio de compostos químicos ou peptídeos os sítios que promovem a associação entre tais monômeros impediria o crescimento das fibras (DAMAS E SARAIVA, 2000).

Estudos de difração de raios-X realizados por Inouye e colaboradores (1998) com fibras amilóides extraídas da retina de pacientes com PAF revelaram que a unidade formadora das fibras era o monômero de TTR. Os autores não revelam, porém, os detalhes de tais interações (INOUYE E COLS., 1998). O conhecimento dessas regiões de interface é de fundamental importância para o desenvolvimento de agentes capazes de se ligar a tais sítios impedindo o crescimento da fibra. Além disso, é necessário avaliar cuidadosamente se as espécies intermediárias alvos seriam espécies não tóxicas para as células.

Uma outra abordagem é de moléculas para intervir na de agregação é o uso de compostos que possam desestabilizar as fibras após a sua formação. Um composto chamado 4'-deoxi-4'-iododoxorubicina (IDOX) se mostrou eficaz em dissolver as fibras maduras de TTR (PALHA E COLS., 1999). IDOX interage fortemente com as fibras transformando-as em material amorfo.

No caso da Amiloidose Primária, Gianni e colaboradores (1995) relataram que IDOX induziu a reabsorção das fibras pelo organismo (GIANINNI E COS., 1995), apesar disso, em testes clínicos, nem todos os portadores desta doença responderam ao tratamento (MERLINI E COLS., 1999). A eficácia deste composto também foi avaliada frente à doença do Prion em ratos. Retardamento do surgimento dos sintomas assim como aumento do período de sobrevivência foram observados (TAGLIVIANI E COLS., 1997). Mais tarde, foi demonstrado que este composto é cardiotoxico e para tentar criar um análogo não tóxico as interações entre IDOX e o mutante L55P foram avaliadas (SEBASTIÃO E COLS., 2000) As bases moleculares para o efeito do IDOX ainda não foram estabelecidas totalmente.

Finalmente, quando mais for conhecido a respeito do mecanismo relacionado à morte celular nos tecidos acometidos pelos agregados da TTR, inibidores ou moléculas

que neutralizem os efeitos inflamatórios e os efeitos apoptóticos poderão também ser usados para mitigar os efeitos da agregação (SARAIVA E COLS., 2002).

A Figura 10, a seguir, resume o que foi exposto sobre as possíveis terapias ainda em fase de pesquisas.

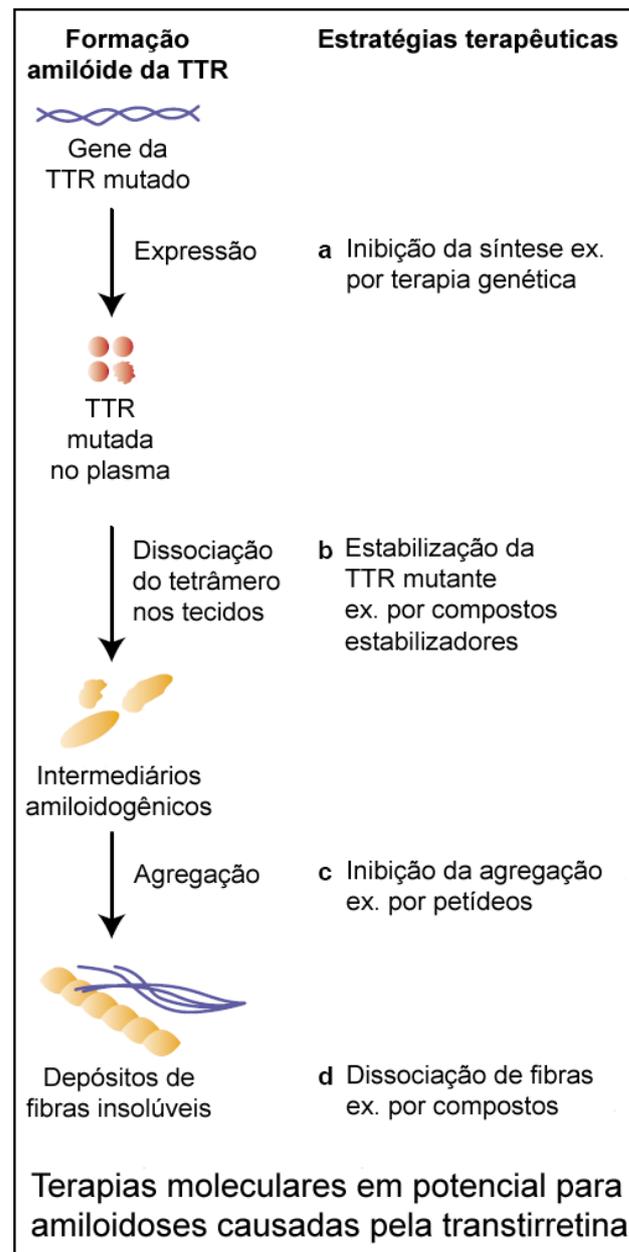


Figura 10. – Possíveis Terapias Moleculares para PAF. (a) inibição da síntese da variante amiloidogênica da TTR; (b) estabilização da TTR em seu estado nativo; (c) inibição da associação do intermediário amiloidogênico; (d) desestabilização e dissociação dos agregados maduros. ADAPTADO DE SARAIVA E COLS., 2002.

A escolha dos compostos utilizados neste estudo foi baseada, principalmente, em dois aspectos: 1. a sua semelhança estrutural com o ligante natural da TTR, a tiroxina, observando o tamanho e a presença de ao menos um anel aromático e 2. o seu uso já conhecido como fármaco para outros fins terapêuticos. O primeiro aspecto foi usado como critério por já haver dados na literatura que apontam a necessidade da presença de pelo menos um anel para que ocorra a interação da TTR com ligantes, interação essa geralmente acompanhada de inibição da agregação (BAURES E COLS., 1998). O segundo aspecto foi observado porque, caso evidenciássemos algum dos compostos como inibidor da agregação da TTR, não seriam necessários testes clínicos adicionais para a introdução do mesmo no mercado.

A Tabela 1 a seguir apresenta, então, os compostos aqui estudados. Colocamos na primeira linha da Tabela a fórmula da tiroxina para melhor comparação.

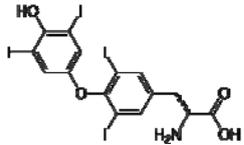
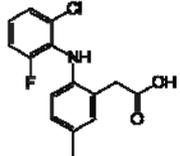
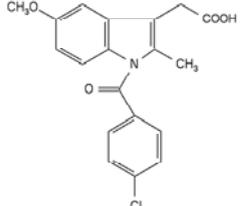
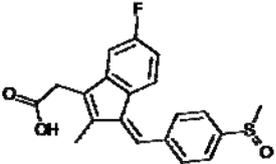
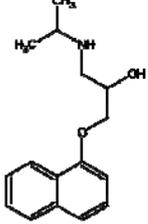
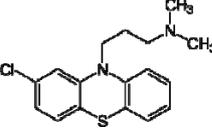
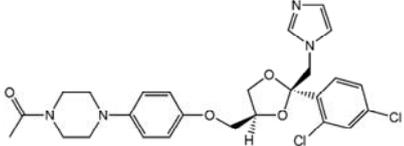
NOME	ESTRUTURA	USO TERAPÊUTICO
Tiroxina		-----
Lumiracoxibe		Antiinflamatório
Indometacina		Antiinflamatório
Sulindaco		Antiinflamatório
Propranolol		Anti-hipertensivo
Clorpromazina		Antipsicótico
Cetoconazol		Antifúngico

Tabela 1 – Compostos químicos usados neste estudo e seus usos terapêuticos.

2 – OBJETIVOS

2.1 - OBJETIVOS GERAIS

1. Avaliar o efeito de compostos com uso terapêutico já conhecido na agregação da proteína amiloidogênica transtirretina utilizando como modelos a wt e L55P-TTR.
2. Estudar a estabilidade conferida pelos compostos promissores aos tetrâmeros da wt e L55P-TTR.

2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar a eficácia dos compostos Lumiracoxibe, Indometacina, Sulindaco, Clorpromazina, Propranolol e Cetoconazol em inibir a cinética de agregação da proteína amiloidogênica transtirretina em sua forma selvagem e mutante L55P-TTR, utilizando a desnaturação ácida e a Alta Pressão Hidrostática (APH) como agentes indutores da agregação;
2. Elucidar mecanismos de ação dos compostos em diminuir as taxas de agregação da proteína *in vitro*;
3. Determinar o IC50 para inibição da agregação de cada composto;
4. Comparar as afinidades dos compostos pelas variantes da TTR estudadas;
5. Avaliar a estabilidade conferida pelos compostos mais promissores quanto inibidores frente à dissociação-desnaturação promovida pela APH à wt e L55P-TTR;

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - REAGENTES

Todos os reagentes usados foram de grau analítico. ANS (8-anilinaftaleno-1-sulfonato) foi comprado da Molecular Probes (Eugene, OR). Água destilada e deionizada foram obtidas a partir de sistemas de purificação Milli-Q (Millipore Corp., Bedford, MA). Os experimentos de agregação foram realizados nos tampões: acetato de sódio 100 mM, KCl 100 mM, pH 4,4; MES 100 mM, KCl 100 mM, pH 5,0 (APH); os experimentos de estabilidade frente à APH em Tris-HCl 100 mM, KCl 100 mM, pH 7,5; os experimentos de deslocamento de ANS em Tris-HCl 100 mM, KCl 100 mM, pH 7,5 ;fosfato de sódio 5 mM NaCl 150 mM pH 7,4 foi usado para medir a ligação ao Vermelho do Congo. Enfatizamos que os tampões Tris e MES foram os únicos usados nos experimentos que envolvem o uso de APH, uma vez que estes mantêm a estabilidade de seus pHs em altas pressões hidrostática. Os compostos usados como inibidores (Cetoconazol, Propranolol, Clorpromazina, Lumiracoxibe, Sulindaco e Indometacina) foram gentilmente cedidos pelo Professor Luis Maurício Lima, da Faculdade de Farmácia da UFRJ. Todos foram pesados e dissolvidos em DMSO para que atingissem a concentração desejada.

3.2 - EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO:

Todos os experimentos foram realizados com transtirretina recombinante, obtida por expressão heteróloga em *E. coli*, como descrito em LAI E COLS., 1996 com pureza > 95% verificada por gel filtração e espectrometria de massa.

3.3 - AGREGAÇÃO DA TTR

Os experimentos de agregação foram realizados como descrito em MIROY E COLS., 1996, incubando-se a TTR na concentração de 3,5 μ M no tampão acetato de sódio. Nas amostras que continham os inibidores, estes eram adicionados antes da proteína ao tubo para completa dissolução. Este procedimento permitia o contato da proteína com os inibidores desde os primeiros momentos da agregação. Controles com o DMSO foram realizados e não se observou efeito deste solvente sobre a agregação.

3.4 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIAMILOIDOGÊNICA DOS COMPOSTOS E CÁLCULO DO IC50

Os dados de atividade dos ligantes foram expressos em percentual de inibição de agregação. Para isso, usamos o protocolo descrito em PETERSON E COLS., 1998. Neste protocolo, considera-se a densidade ótica (400 nm) da amostra de TTR na ausência de inibidores como 100 % de agregação e os percentuais de inibição são calculados com base nos valores de DO na presença dos inibidores. Nos experimentos em que usamos o Vermelho do Congo como sensor de agregação, chamamos de 100 % de agregação a taxa de ligação obtida nas amostras sem os inibidores.

Por definição, o IC50 é a concentração de um composto necessária para 50 % do seu efeito máximo ser observado (GOODMAN E GILMAN'S, Pharmacology, 2008). Os valores de IC50 foram calculados com base nas curvas de dose-resposta, considerando-se como efeito máximo o maior percentual de inibição da agregação observado na presença de cada ligante. Interessantemente, em todos os casos, a máxima inibição foi de aproximadamente 80 %. Desta forma, a concentração de ligante necessária para se obter 40 % de inibição foi chamada de IC50.

3.5 - MEDIDAS DE FLUORESCÊNCIA

As medidas de espectroscopia de fluorescência foram realizadas em um espectrofluorímetro ISS PC1 (ISS Inc., Champaign, IL), contendo como fonte de luz uma lâmpada de xenônio de 300 watts, utilizando-se fendas de 2 mm para excitação e 1 mm para emissão. As medidas foram realizadas com a utilização de cubetas de quartzo de 1 mL. Nos experimentos de alta pressão, foram utilizadas cubetas próprias.

3.5.1 - FLUORESCÊNCIA INTRÍNSECA

A fluorescência intrínseca das proteínas resulta da emissão dos resíduos aromáticos de triptofano, tirosina e fenilalanina. Esses resíduos, quando excitados em um determinado comprimento de onda, absorvem energia e emitem fluorescência, que é medida a um ângulo de 90°. A emissão dos triptofanos é a que mais contribui para o espectro de emissão da proteína. Além disto, a fluorescência emitida pelo grupamento indol dos resíduos de triptofano é bastante sensível às mudanças de polaridade do meio em que se encontra, permitindo, assim, avaliar o grau de exposição dos triptofanos, relacionando-á às mudanças nas estruturas terciária e quaternária das proteínas.

Assim, o máximo de emissão de fluorescência deste resíduo depende diretamente da polaridade do ambiente em que o mesmo se encontra, podendo variar de 320 nm a 355 nm (WEBER, 1987). Quando o resíduo de triptofano se encontra em um meio mais hidrofóbico, como o interior das proteínas, o máximo de emissão fica em comprimentos de onda menores e mais energéticos (em torno de 320nm). Entretanto, quando o triptofano se torna mais exposto ou em ambiente mais polar, ou seja, em maior contato com o solvente, o máximo de emissão se desloca para comprimentos de onda maiores e menos energéticos (em torno de 355 nm) (WEBER, 1987). Em nosso trabalho, utilizamos, principalmente, a espectroscopia de fluorescência intrínseca dos resíduos de triptofano, excitando-se as amostras em 280 nm e medindo a emissão de fluorescência entre 300 e 400 nm. As intensidades de emissão em cada comprimento de onda formam um espectro que pode ser também interpretado pelo cálculo da energia média da emissão na condição avaliada, no nosso caso, a presença dos diferentes ligantes e temperaturas, através da medida do centro de massa espectral $\langle v \rangle$ em nanômetros, calculado pela equação [1]:

$$\langle v \rangle = \frac{\sum v_i \cdot F_i}{\sum F_i}$$

onde $\langle v \rangle$ representa o valor de centro de massa espectral em número de onda e F_i é a fluorescência emitida no número de onda v_i .

Em outros casos, o efeito de uma determinada condição desnaturante sobre a proteína pode também ser representado pelo grau de desnaturação ou extensão da reação, representado por α e calculado pela equação [2]:

$$\alpha = \frac{(v_i - v_0)}{(v_d - v_0)}$$

onde v_i é o valor de centro de massa em uma determinada condição, v_0 é o centro de massa da proteína enovelada (estado inicial) e v_d é o valor de centro de massa da proteína desnaturada (estado final).

3.5.2 - FLUORESCÊNCIA EXTRÍNSECA

As medidas de fluorescência extrínseca desta dissertação foram feitas com o uso da sonda fluorescente 1,8 anilino naftaleno sulfonado (ANS). Esta sonda se liga a sítios hidrofóbicos de macromoléculas e tem a intensidade de sua fluorescência aumentada em até 200 vezes quando ligada a essas regiões em relação a quando se encontra livre em solução aquosa (PETERSON E COLS., 1975).

O ANS foi diluído em água Mili Q e dosado por espectrofotometria, medindo-se a absorvância em 350 nm e utilizando-se como coeficiente de extinção molar o valor de $4,95 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (WEBER E COLS., 1964).

Para medir sua fluorescência nas condições experimentais, as amostras foram excitadas em 370 nm e as intensidades lidas de 400 a 600 nm. A área sob o espectro formado foi usada como medida do valor da intensidade da emissão. Em todos os experimentos a proteína foi incubada na presença de 10 μM de ANS por 10 minutos, só então as medidas começavam a ser feitas. A cada adição dos ligantes, aguardávamos mais 10 minutos antes da próxima medida.

Sabidamente, esta sonda, nas concentrações estudadas, se liga aos sítios da tiroxina tendo sua fluorescência aumentada em até 200 vezes relativamente à sua fluorescência em tampão aquoso (WEBER E COLS., 1974; PETERSON E COLS., 1975). Sendo assim, pretendíamos observar o seu deslocamento dos sítios pelo decaimento de sua fluorescência, possibilitando-nos comparar as afinidades dos compostos pela proteína.

Para calcular o percentual de ANS deslocado ao longo do experimento, a seguinte fórmula matemática foi usada (equação 3):

$$D=100-[(F_0-F)/(F_0-F_b)] \times 100$$

Onde D é o percentual de ANS deslocado; F_0 é a intensidade de fluorescência do ANS livre em tampão; F é a intensidade de fluorescência do ANS em determinada concentração de ligante e F_b é a fluorescência inicial do complexo TTR:ANS.

3.6 - ESPALHAMENTO DE LUZ

As medidas de espalhamento de luz refletem o tamanho das partículas em solução. A amostra deve ser excitada em um comprimento de onda em que a absorção é mínima e o espalhamento será diretamente proporcional ao tamanho da partícula. Desta forma, é possível monitorar o grau de agregação das partículas observando o aumento relativo dos valores de espalhamento de luz.

As medidas de espalhamento de luz foram realizadas excitando-se as amostras em 400 nm e a luz espalhada coletada em um ângulo de 90° da luz incidente pela integração das intensidades em uma janela entre 385-415 nm. A área sob o espectro obtido neste intervalo foi calculada pelo programa Vinci (ISS Inc.) e comparada ao valor de espalhamento de luz inicial (EL_0). A razão (EL/EL_0) foi utilizada para se avaliar a extensão da agregação das amostras.

3.7 - CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTO DESEMPENHO

Os experimentos de cromatografia líquida foram realizados com o intuito de avaliar o estado oligomérico da TTR durante a sua cinética de agregação na presença dos ligantes. Foi usada uma coluna de exclusão molecular, GPC 300, acoplada a um sistema de HPLC, contendo detectores de absorvância e fluorescência (Shimadzu, Japão).

O sistema foi previamente equilibrado com um tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM KCl 100 mM pH 7,5) e o fluxo utilizado foi de 0,5 mL/min. O volume de injeção das amostras foi de 50 µL em cada corrida. A eluição das amostras foi monitorada pelo acompanhamento da emissão de fluorescência no comprimento de onda fixo de 330 nm (com a excitação programada para 280 nm) e a absorbância em 280 nm.

3.8 - LIGAÇÃO AO VERMELHO DO CONGO (VC)

Para confirmar os dados de agregação obtidos por medida das densidades óticas, usamos o corante específico para amilóide VC. Neste tipo de ensaio, o corante foi diluído em tampão CRBB para a concentração de 10 µM. As amostras foram diluídas para que atingissem a concentração final de 1 µM. Desta maneira, em todos os casos a razão molar de proteína para corante foi de 1:10. As amostras foram incubadas por 30 minutos e homogeneizadas em um “vortex” previamente à leitura da absorbância.

A densidade óptica das amostras foi medida nos comprimentos de onda de 470 e 540 nm em um espectrofotômetro. A fórmula (equação 4):

$$VC = (A_{540}/25295) - (A_{470}/46306)$$

foi usada para calcular a quantidade de moléculas de VC ligadas por molécula de proteína. Nesta equação, VC é a concentração de vermelho do Congo ligada; A_{540} é a absorbância da amostra no comprimento de onda = 540 nm; A_{470} é a absorbância da amostra no comprimento de onda = 470 nm; 25295 é o coeficiente de extinção molar do VC ligado aos agregados amilóides e 46306 quando livre em solução.

3.9 - ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA (APH)

Nos experimentos em que a APH foi utilizada como perturbador de estrutura de proteínas, as amostras foram acondicionadas dentro de uma cubeta de quartzo em forma de garrafa vedada com um tubo de polietileno compressível, capaz de equalizar a pressão entre o meio hidrostático (etanol absoluto) e a amostra. O etanol é utilizado, pois possui índice de refração igual ao do quartzo, o que permite as medidas espectroscópicas (PALADINI & WEBER, 1981). Esta cubeta é acomodada em uma célula de alta pressão constituída de aço vascomax temperado contendo três janelas óticas de safira. As janelas óticas permitem o acompanhamento das mudanças espectroscópicas mesmo sob pressão (PALADINI & WEBER, 1981). A célula é então acoplada através de uma abertura superior a um gerador de pressão (HIP 50000, HIP, EUA) capaz de gerar até 50.000 psi (3.447 bar). Este gerador é formado por um pistão, duas válvulas e um manômetro por onde podemos regular a pressão exercida sobre a amostra. Nos experimentos nos quais o efeito do aumento da pressão hidrostática sobre a TTR foi avaliado, a pressão foi aumentada em passos de 0,2 kbar. As amostras foram incubadas por 10 minutos em cada passo de pressão antes que as medidas fossem feitas. Nos experimentos em que medimos a agregação induzida por APH, as amostras eram submetidas à APH (3,2 kbar) por 60 minutos. Após este período, a pressão retirada e as medidas de espalhamento de luz acompanhadas ao longo do tempo.

Nos experimentos onde foi feito o cálculo de $p_{1/2}$, que é o valor de pressão necessário para causar metade do efeito observado na condição desejada, o cálculo foi feito pela equação da sigmóide, usada para ajustar a curva do grau de desnaturação (α) em relação à pressão e considerando-se $\alpha = 0,5$.

4 – RESULTADOS

4.1 - ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV-VIS. E FLUORESCÊNCIA DOS COMPOSTOS AVALIADOS

Visto que, em geral, moléculas com anéis aromáticos apresentam propriedades espectroscópicas bastante acentuadas, avaliamos primeiramente as características de absorção e fluorescência em solução aquosa do Lumiracoxibe (LUM), Indometacina (IND), Sulindaco (SUL), Clorpromazina (CLO), Propranolol (PRO) e Cetoconazol (CET) nos comprimentos de ondas que pretendíamos trabalhar. Os espectros de absorbância estão na Figuras 11A e os de emissão de fluorescência na Figura e 11B. Essa análise era fundamental, uma vez que, utilizaríamos a fluorescência e a absorbância para avaliarmos, respectivamente, a estabilidade e agregação da TTR na presença destes compostos.

Para obtermos os espectros de absorbância, diluímos os compostos em água na concentração de 10 μ M. Como podemos observar na Figura 11A, todos os compostos absorvem luz em comprimentos de onda menores que 350 nm. Esse dado foi determinante para escolhermos o comprimento de onda de 400 nm avaliar a agregação da TTR, pois, assim as leituras de agregação não seriam influenciadas pela presença dos compostos.

Para medirmos a emissão de fluorescência, as mesmas amostras e condições foram utilizadas. Excitamos as amostras no comprimento de onda de 280 nm e coletamos as intensidades de 300 a 400 nm.

Como podemos observar no painel B, há dois grupos bem distintos de compostos quanto à emissão de fluorescência. A IND (—) e SUL (—) não apresentam fluorescência significativa nesta região do espectro. CET (—), CLO (—), PRO (—) e

LUM (→) apresentam espectro pronunciado nesta faixa de comprimento de comprimento de onda, o que certamente comprometeria os estudos de fluorescência na sua presença.

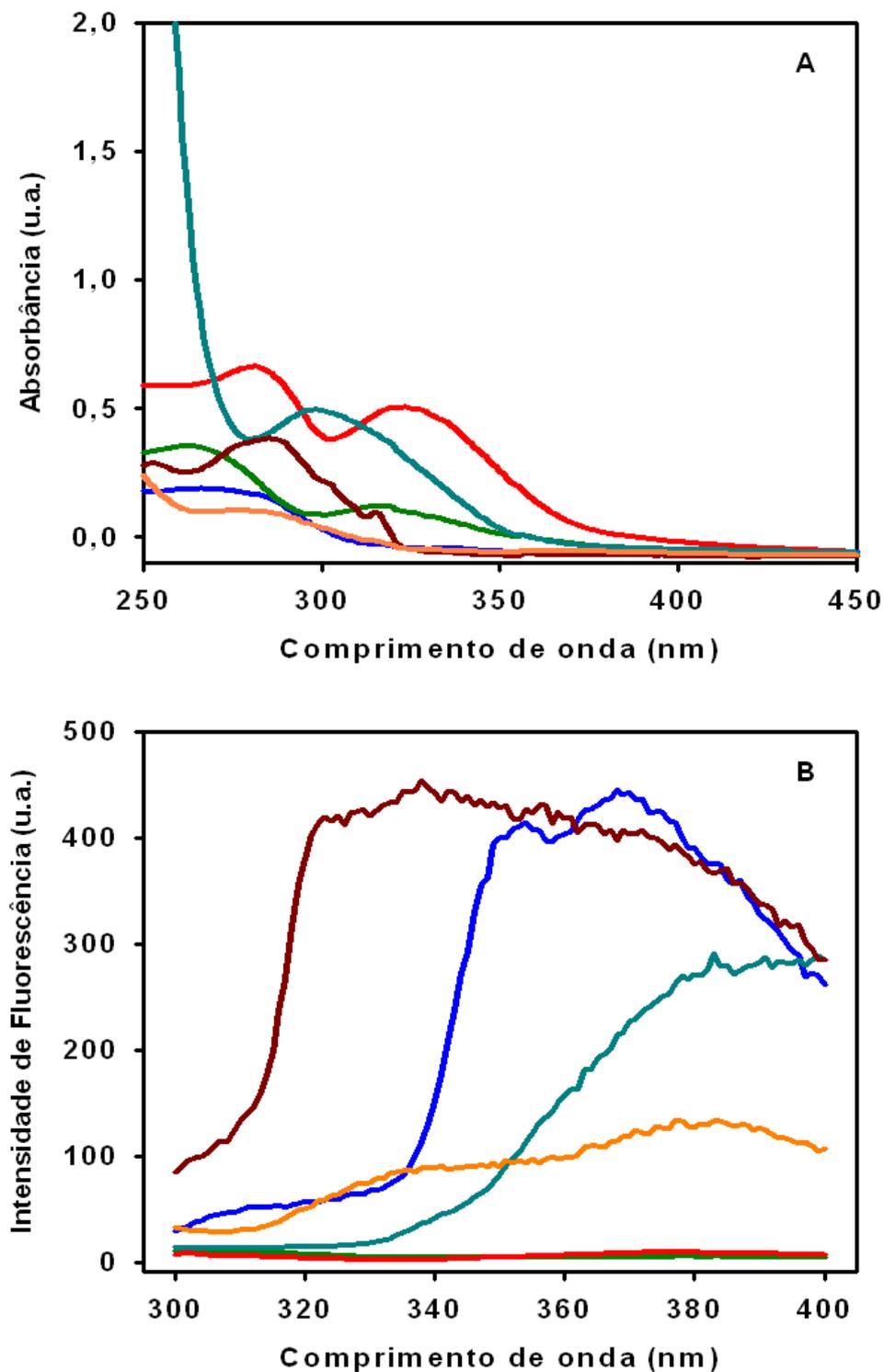


Figura 11 – Espectros de emissão de fluorescência e absorção dos compostos estudados: Indometacina (—), Sulindaco (—), Cetoconazol (—), Clorpromazina (—), Propranolol (—) e Lumiracoxibe (—). A concentração usada foi de 10 μM . Os compostos foram diluídos em água mili Q. Os espectros de fluorescência foram obtidos com a excitação em 280 nm e a intensidade coletada na faixa de comprimento de onda mostrada na figura. (A) Espectros de absorbância e (B) espectros de emissão de fluorescência.

4.2 – EFEITO DOS COMPOSTOS SELECIONADOS NA AGREGAÇÃO DA TTR INDUZIDA POR ACIDIFICAÇÃO

A cinética de agregação da TTR induzida por acidificação já é bastante conhecida, e interessantemente, é diferente de outras proteínas amiloidogênicas, não sendo dependente da formação de núcleos ou sementes (HUMASHMAN E COLS., 2004) e que resulta na ausência de fase *lag*. Além disso, sabe-se que o pH 4,4 promove o início da agregação da proteína que provavelmente se dá pela dissociação do tetrâmero com formação de um intermediário amiloidogênico monomérico (LAI E COLS., 1996). Ao final de 72 h a 37 °C, a reação de agregação encontra o equilíbrio (COLON E COLS., 1992; MCCUTCHEN E COLS., 1993).

Para avaliarmos a eficácia dos compostos enquanto inibidores da agregação da TTR, realizamos uma varredura inicial em pH ácido conforme mencionado, pois, por mecanismos ainda não elucidados, moléculas pertencentes ao mesmo grupo e classe química podem apresentar diferentes potenciais de inibição da agregação (Miller E COLS., 2004). Utilizamos como modelos a TTR selvagem (wt) e a variante L55P, altamente amiloidogênica. Neste experimento, as proteínas (3,5 µM) foram incubadas em pH 4,4, a 37 °C por 72 h na ausência ou presença dos ligantes (8 ou 35 µM, razão proteína:composto de ~ 1:2 e 1:10). Ao final deste período, a agregação foi medida com base na densidade ótica a 400 nm (Figura 12A e B) ou ligação de Vermelho de Congo (Figura 2C e D). O Vermelho de Congo vem sendo usado como marcador específico para confirmar a presença de agregados do tipo amilóides em solução ou em cortes histológicos em combinação com a microscopia para confirmar a presença de depósitos (METHODS IN ENZYMOLOGY, volume 309).

Conforme observado na Figura 12, alguns compostos se mostraram eficazes e outros não enquanto inibidores da agregação da TTR. CLO, PRO e CET, mesmo na razão 1:10, não foram capazes de inibir a agregação da TTR, ao passo que LUM, IND e SUL mostraram efeito pronunciado e dependente da dose. A ordem de eficiência observada entre os inibidores foi a mesma para as duas proteínas estudadas, conforme a seguir: Lumiracoxibe > Indometacina > Sulindaco.

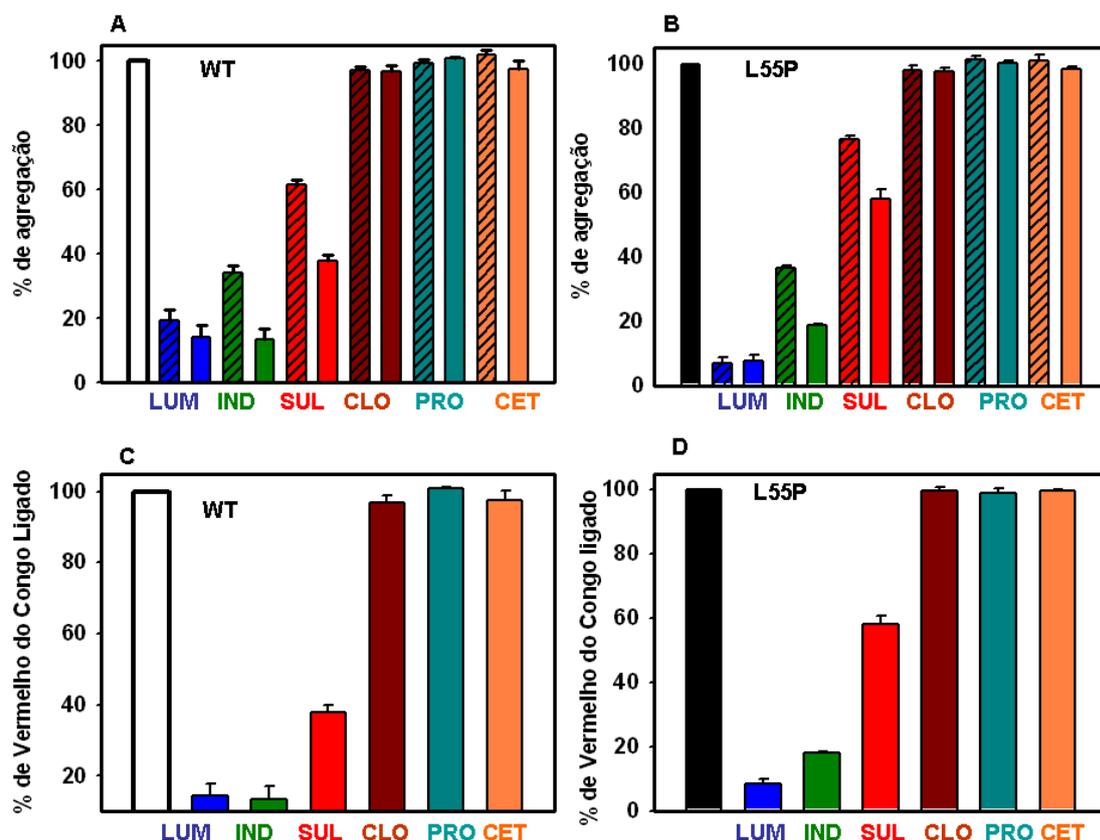


Figura 12 – Varredura inicial dos compostos candidatos a inibidores da agregação da TTR. Os painéis A e B mostram o resultado da varredura inicial com os 6 compostos testados nas concentrações de 8 (barras hachuradas) e 35 μM (barras cheias). Nestes painéis, a porcentagem de inibição foi calculada com base na densidade ótica das amostras a 400 nm e considerando-se como 100 % de agregação a D.O. das amostras agregadas na ausência dos compostos. Os painéis C e D mostram a ligação do vermelho do congo das amostras incubadas com 35 μM dos compostos. A concentração de proteína foi de 3,5 μM . Em todos os casos as amostras ficaram incubadas em pH 4,4 por 72 h a 37 °C. Os painéis da esquerda são referentes à wt-TTR e os da direita à L55P. Para todos os painéis: (□) wt, (■) L55P, (■) Lumiracoxibe, (■) Indometacina, (■) Sulindaco, (■) Clorpromazina, (■) Propranolol, (■) Cetoconazol.

Ao observarmos que moléculas semelhantes estruturalmente, como é o caso das apresentadas até agora, causavam diferentes efeitos na agregação da wt e da L55P-TTR, resolvemos investigar se tal diferença ocorria por mecanismos específicos de cada molécula ou se o simples evento de ligação ao sítio de tiroxina seria suficiente para inibir a agregação desta proteína. Para isso, lançamos mão de um conhecido ligante do sítio da tiroxina, o 1,8 anilinaftaleno sulfonado (ANS) (PETERSON E COLS., 1975) e realizamos o ensaio de agregação, conforme descrito anteriormente, na sua presença.

Conforme visto na Figura 13, o ANS na concentração de 35 μ M não foi capaz de inibir a agregação da proteína selvagem (painel A) ou da L55P (painel B). Este resultado sugere que a simples ligação ao canal da tiroxina não é o único requerimento necessário para que haja inibição da agregação da TTR. Além da ligação ao canal da tiroxina, talvez seja necessário que o composto faça interações mais fortes e específicas que impeçam a dissociação dos tetrâmeros com a posterior mudança conformacional que leva à formação do intermediário amiloidogênico.

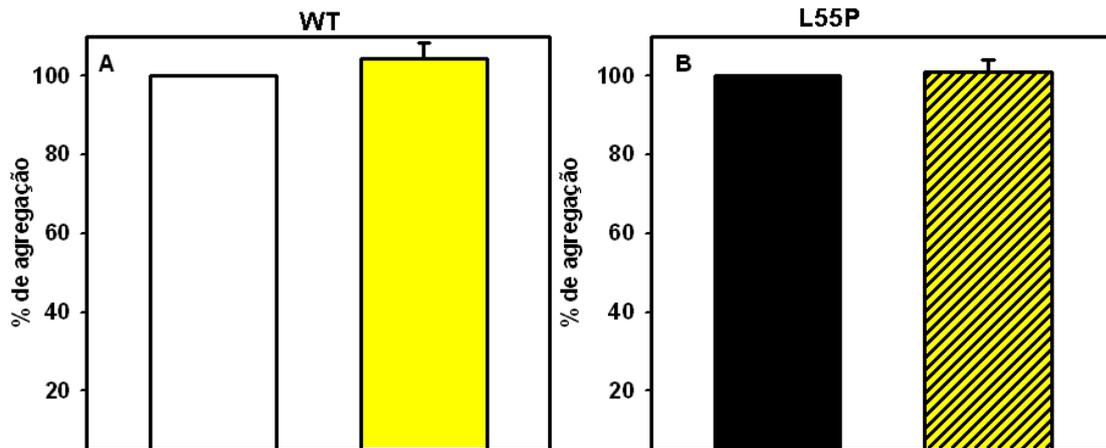


Figura 13. ANS não foi capaz de inibir a agregação da TTR. A wt (painel A) e a L55P (painel B) foram incubadas na ausência ou na presença de 35 μ M de ANS (wt:ANS, amarelo; L55P:ANS, amarelo hachurado) em pH 4,4, 37 °C. Após 72 h, a densidade ótica em 400 nm foi medida como indicador de agregação. A D.O. da amostra agregada na ausência do ANS foi tida como 100 % de agregação (barra branca ou preta, wt e L55P, respectivamente).

A partir desta varredura inicial de compostos, continuamos nossos estudos com os três compostos mais promissores, a saber, Lumiracoxibe, Indometacina e Sulindaco. Partimos então, para experimentos onde a concentração destes ligantes foi alterada de forma crescente (curva dose-resposta).

Através destes experimentos, é possível se obter os valores de IC₅₀ dos compostos estudados. O valor de IC₅₀ é a concentração necessária para se obter 50 % do efeito esperado, no nosso caso, 50 % de inibição da agregação.

Como observado na Figura 14, o aumento da concentração dos ligantes é acompanhado de um maior efeito inibitório, tanto no caso da wt (painel A) quanto no caso da L55P (painel B). Em todos os casos, observamos que existe uma concentração a partir da qual não existe aumento do efeito inibitório.

O composto Lumiracoxibe, no caso das duas proteínas, exerce seu máximo efeito quando na concentração de 7 μ M (razão 1:2, proteína:LUM) onde inibe 78 % da agregação. A Indometacina inibiu aproximadamente 75% da agregação, porém na concentração de 35 μ M (razão 1:10, proteína:IND). O composto Sulindaco, que se mostrou menos eficiente até o momento, teve o seu máximo efeito observado em concentrações diferentes para as duas proteínas, sendo capaz de inibir 61 % da agregação da proteína selvagem na concentração de 35 μ M (razão de 1:10, proteína:SUL). No caso da L55P-TTR, o composto mostrou-se bastante ineficiente, inibindo apenas 40 % da agregação na concentração de 14 μ M, não mostrando aumento do efeito mesmo, quando na concentração de 50 μ M (Figura 14B).

Mais uma vez, a ordem de eficácia dos inibidores observada para as duas proteínas foi: Lumiracoxibe > Indometacina > e Sulindaco. A Tabela 2 resume os valores de IC₅₀ obtidos através das curvas de dose-resposta realizadas:

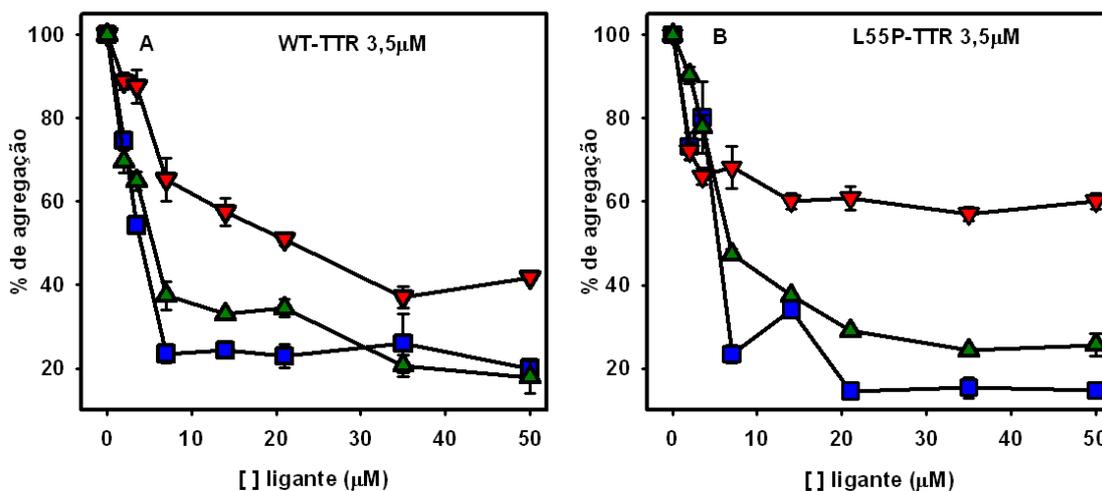


Figura 14 – Curva de dose-resposta dos compostos mais promissores como inibidores da agregação. As proteínas wt (painel A) e L55P (painel B) foram colocadas para agregar em pH 4,4 por 72 h a 37 °C. Após este tempo, a D.O. em 400 nm foi medida para se avaliar a extensão da agregação. A amostra agregada na ausência de qualquer ligante foi tida como 100 % de agregação. Em ambos os casos a concentração de proteína foi de 3,5 μM e a dos ligantes variou de 0 a 50. Os símbolos representam: Lumiracoxibe (■), Indometacina (▲) e sulindaco (▼).

	IC50 WT-TTR	IC50 L55P-TTR
+ LUMIRACOXIBE	5,20 μM	7,40 μM
+ INDOMETACINA	8,40 μM	11,70 μM
+ SULINDACO	--	--

Tabela 2. Valores de IC50 dos inibidores de agregação. Os valores de IC50 foram extraídos do ajuste das curvas de dose-resposta demonstradas na Figura 3, e representam a concentração necessária para **Lumiracoxibe** e **Indometacina** exercerem 50 % de seu efeito máximo (considerando-se como máximo 80 % de inibição). Não foi possível calcular os valores relativos ao **Sulindaco**, pois este composto não atingiu mais de 50 % de eficácia.

Uma vez caracterizadas as concentrações mínimas necessárias de inibidores para inibir a agregação da wt e da L55P, decidimos realizar uma cinética de agregação na presença dos compostos. Para tal, incubamos a wt na concentração de 3,5 μM e a L55P na concentração de 1 μM na presença de 8 μM e 2 μM dos inibidores, respectivamente (razão de 1:2 proteína:ligante), de inibidores nas condições já descritas. Foi necessário diminuir a concentração da L55P para 1 μM , pois em concentrações maiores não seria possível monitorar as primeiras horas do processo de agregação devido à magnitude da rapidez do processo.

Na Figura 15, painéis A e B, vemos o resultado do experimento ao longo das 72 h de incubação. Os compostos LUM, IND e SUL, de fato, modificam a cinética de agregação das proteínas, inibindo-a, onde, mais uma vez, os dois primeiros se mostraram mais efetivos.

O dado mais interessante desta cinética, porém, só é observado quando comparamos as primeiras cinco horas da agregação das proteínas estudadas (Figura 15C e 15D). No caso da wt, não é possível ver efeito dos compostos nas primeiras horas da agregação e todas as curvas se sobrepõem. Já a agregação da L55P mostra claramente efeito acentuado dos três compostos, já nas primeiras horas da agregação. Este dado pode ter relevância no entendimento dos mecanismos de inibição causados pelos ligantes para as diferentes proteínas e, nos próximos experimentos, buscaremos entender os possíveis motivos para este fato.

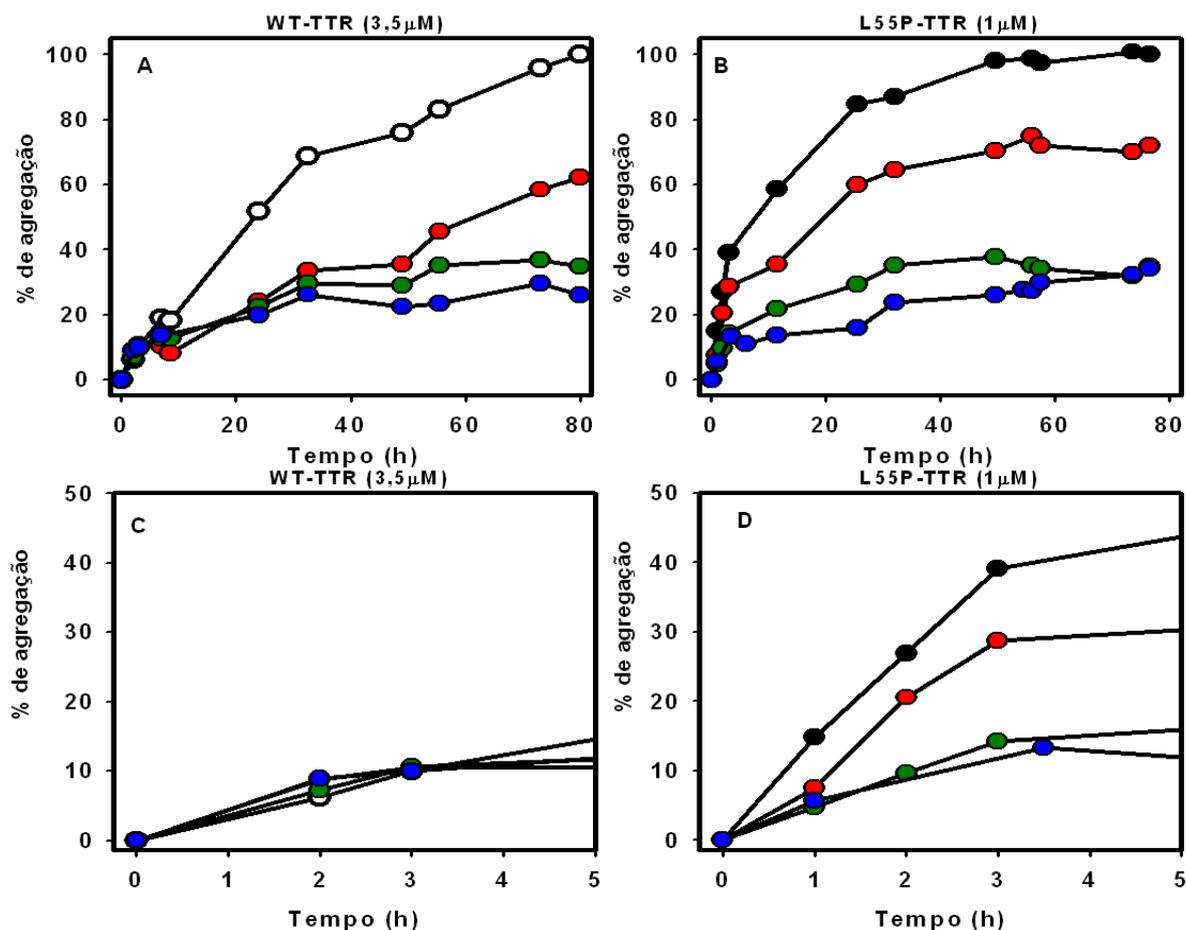


Figura 15 – Cinética de agregação da TTR na presença dos inibidores. A wt (○) (3,5 μM) e L55P (●) (1 μM) foram incubadas na ausência ou presença de 8 ou 2 μM de ligantes, respectivamente. LUM (●), IND (●) e SUL (●). Nos tempos indicados nos gráficos a D.O. em 400 nm foi medida. Os painéis A e B representam a cinética ao longo das 72 h do experimento. Nos painéis C e D estão ampliadas as primeiras cinco horas do mesmo experimento para melhor visualização desta fase da cinética.

Observada a cinética de agregação na presença dos ligantes, resolvemos então avaliar se seria possível intervir no processo, caso adicionássemos os inibidores após o seu início. Isto porque, conhecidamente, a TTR necessita dissociar para em seguida sofrer uma mudança conformacional indispensável para o início da sua agregação em condições ácidas. Desta forma, nos questionamos a respeito do mecanismo de ação dos compostos. Seriam seus efeitos observados mesmo após a dissociação da TTR?

Incubamos então três amostras de cada variante da TTR (3,5 μM) nas condições ácidas já descritas. A uma delas, adicionamos o composto (35 μM) no tempo zero da cinética (símbolos coloridos cheios) e na outra amostra adicionamos os compostos 20 horas após o início do experimento (símbolos coloridos com vazados em preto). A terceira das amostras agregou na ausência de inibidores (símbolos vazios, wt; pretos, L55P). O mesmo conjunto de experimentos foi repetido com o LUM (painéis A e B), IND (C e D) e SUL (E e F). wt-TTR (painéis A, C e E) e L55P (painéis B, D e F). Os resultados obtidos encontram-se na Figura 16.

Em relação à wt, é bastante evidente que LUM e IND atuaram no processo de agregação, mesmo quando adicionados 20 h após o início da cinética (painéis A e C, símbolos coloridos com vazados de preto) causando ainda uma inibição de aproximadamente 40%, com exceção da amostra que recebeu o tratamento com o Sulindaco. Esse resultado é compreensível devido à baixa eficiência deste composto em inibir a agregação.

Analisando agora os resultados do mesmo experimento feito com a L55P-TTR (painéis B, D e F), vemos uma diferença no comportamento das amostras. Nenhum dos três inibidores apresentou qualquer efeito sobre a agregação desta variante quando adicionados após o tempo de 20 h, ao passo que foram bastante efetivos quando presentes desde o início da cinética de agregação. Isto sugere que, no caso da L55P-

TTR, a dissociação seguida de mudança conformacional tem início nos primórdios da incubação em meio ácido, e que, os compostos precisam estar presentes desde o início do processo para preveni-la. No caso da wt, as mudanças na estrutura quaternária e terciária seriam mais lentas e por isso os compostos efetivos por mais tempo.

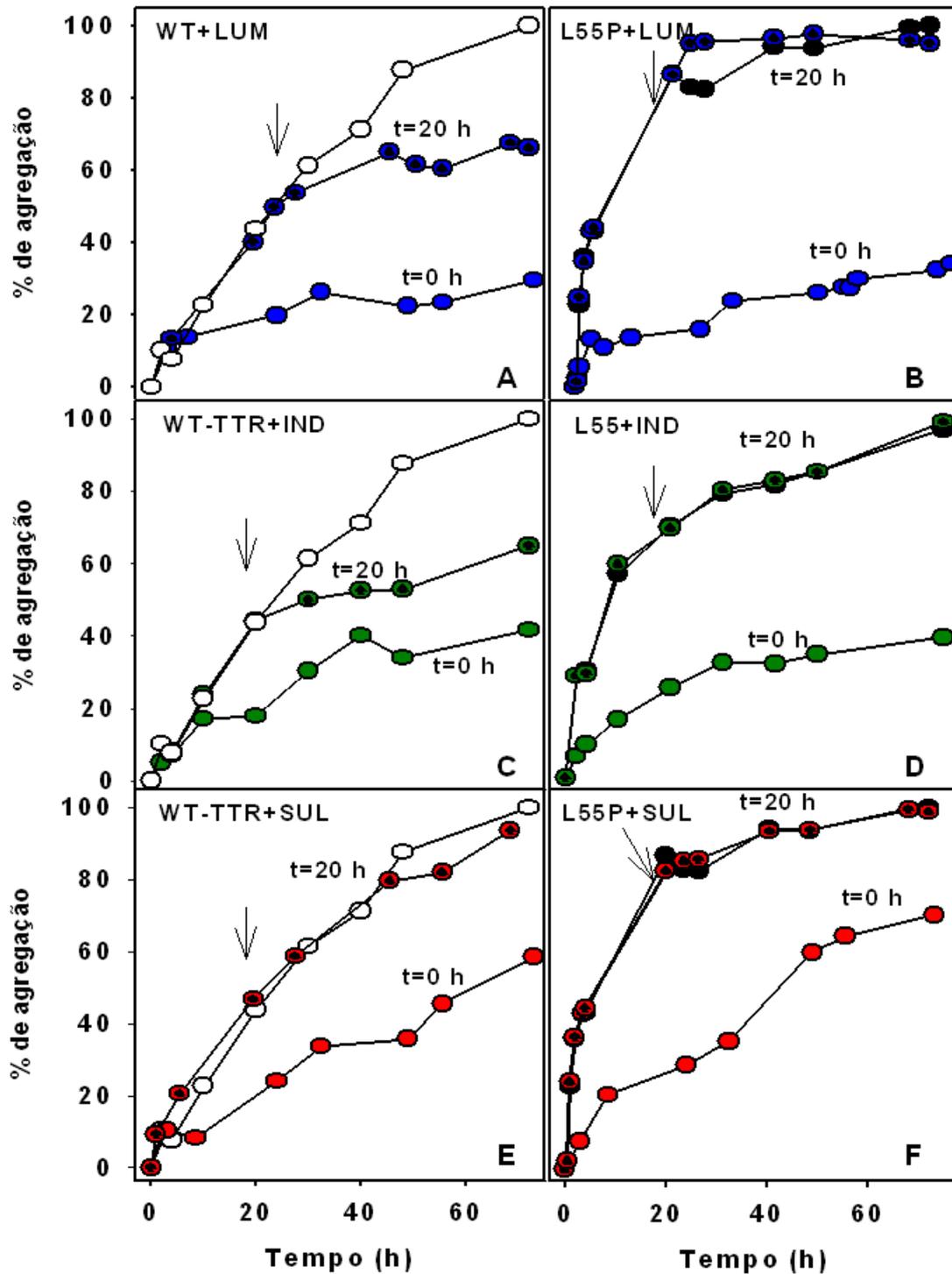


Figura 16 – Diferente efeito dos ligantes sobre a agregação da wt e L55P. A wt (○) (painéis da esquerda) e a L55P (●) (painéis da direita) foram incubadas a 3,5 μ M nas condições de agregação na ausência de qualquer ligante, na presença de 35 μ M de LUM (●), IND (●) ou SUL (●) adicionados no tempo 0 (símbolos cheios) ou adicionados no tempo 20 horas (símbolos coloridos vazados de preto). A agregação foi monitorada por medida da densidade ótica em 400 nm.

O resultado acima mencionado, e, de certa forma, inesperado para nós, nos levantou o interesse de investigar o motivo de diferente comportamento dos compostos sobre a wt e a L55P-TTR. Para este fim, usamos a estratégia da gel filtração, que permite separar espécies de diferentes tamanhos. Através desses experimentos, pretendíamos mapear cada uma das espécies presentes ao longo da cinética de agregação da wt e da L55P-TTR.

Incubamos então, a wt e a L55P-TTR nas condições de agregação a 3,5 μ M e nos tempos indicados na Figura 17, injetamos uma alíquota em uma coluna de gel filtração. O perfil de eluição de algumas das amostras pode ser visualizado nos painéis B e C (wt e L55P, respectivamente).

Conforme visto nos painéis B e C, no início da cinética há apenas um pico que elui em 6 min que corresponde aos tetrâmeros da TTR. Esse pico vai perdendo amplitude com o decorrer da cinética, sugerindo o desaparecimento dos tetrâmeros das duas proteínas.

Com base nas intensidades máximas de fluorescência de cada um dos picos do cromatograma, calculamos o percentual de tetrâmeros presentes ao longo da cinética (Figura 17A), considerando a intensidade do pico no tempo zero como 100%.

Conforme visto no painel A, após 10 h de agregação, não são mais detectados tetrâmeros da proteína L55P, ao passo que neste mesmo tempo ainda estão presentes 50% de tetrâmeros da wt. Infelizmente não foi possível visualizar nesta coluna o pico correspondente aos agregados, talvez pelo seu extenso tamanho. Estes resultados explicariam a ineficiência dos compostos avaliados em inibir a agregação da variante L55P quando adicionados 20 h após o início da cinética, já que neste tempo inexistem tetrâmeros.

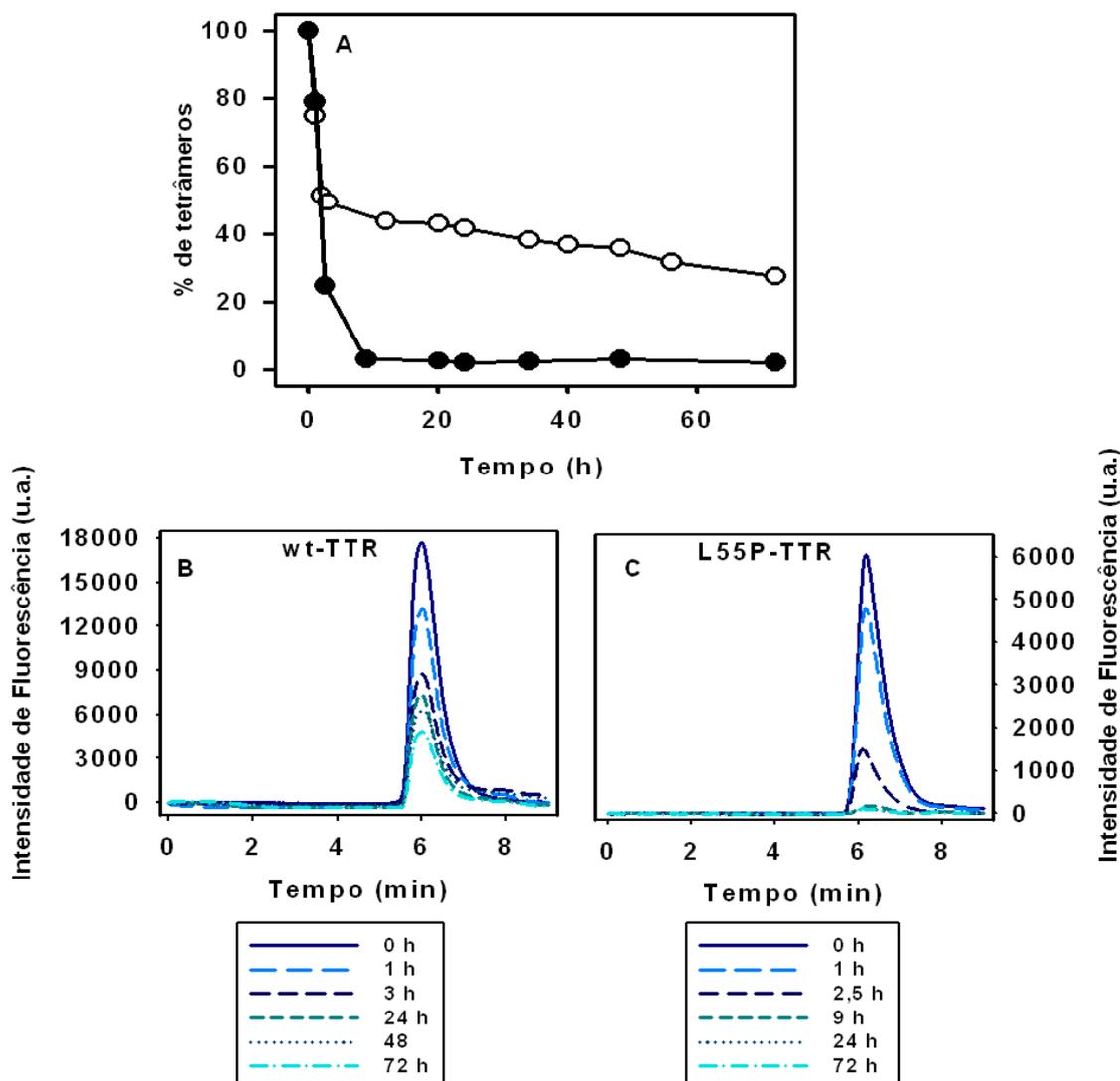


Figura 17 – Desaparecimento dos tetrâmeros ao longo da cinética de agregação da wt e da L55P-TTR. O painel A representa o percentual de tetrâmeros presentes em solução da wt (○) e da L55P-TTR (●) ao longo das 72 horas de agregação. Estes percentuais foram calculados com base nas intensidades máximas de fluorescência dos picos dos cromatogramas mostrados em B e C. Estes cromatogramas foram obtidos injetando-se alíquotas de 100 μ L das amostras postas para agregar a 3,5 μ M, pH 4,4 a 37°C. A coluna utilizada foi a GPC 300 e a emissão de fluorescência foi monitorada a 330 nm ao longo da corrida.

Os resultados observados anteriormente sugerem que os inibidores se ligam aos tetrâmeros da TTR, mais especificamente no canal de T4, e previnem a agregação da proteína. Para confirmar esta hipótese, utilizamos um mutante construído da proteína selvagem que existe somente na forma de monômero nas faixas de concentrações estudadas (M-TTR). Este mutante monomérico possui estrutura secundária e terciária e perfil de agregação idêntico à wt-TTR (JIANG E COLS., 2001).

No que diz respeito às condições experimentais, ajustamos a concentração de M-TTR para 14 μM . Esta concentração foi escolhida por ser equivalente a 3,5 μM de wt-TTR, no que diz respeito à quantidade de monômeros. Da mesma forma, a concentração de inibidores foi elevada para 32 μM , mantendo-se assim a mesma razão proteína: inibidor (~1:2).

Depois de incubadas por 72 h nas mesmas condições de agregação estudadas até o momento, as amostras foram avaliadas quanto à sua agregação pela D.O. em 400 nm. Como observamos na Figura 18, nenhum dos três ligantes, LUM, IND e SUL foram capazes de inibir a agregação do M-TTR. Este resultado confirma que os inibidores se ligam apenas ao canal de T4 presente apenas nos tetrâmeros, estabilizando-os e prevenindo a dissociação e formação do intermediário amiloidogênico.

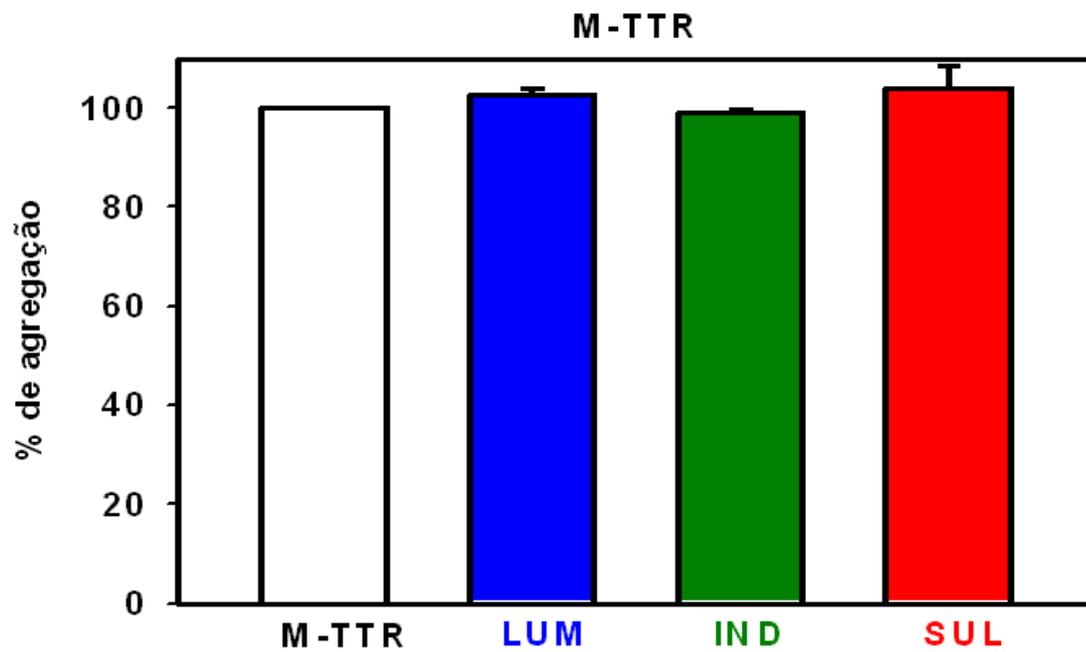


Figura 18 – Efeito dos inibidores na agregação do M-TTR. O M-TTR foi incubado na concentração de 14 μM na ausência (barra branca) ou na presença de 32 μM de inibidores (barras coloridas) em pH 4,4 por 72 h a 37 °C. A agregação foi medida com base na densidade óptica medida em 400 nm ao fim de 72 horas de agregação.

O próximo passo foi avaliar a afinidade dos compostos pela TTR. Para isso, usamos a sonda ANS. A sonda hidrofóbica 8-anilino naftaleno sulfonato de potássio (ANS) é conhecida por ter sua fluorescência aumentada em até 200 vezes quando ligada a regiões hidrofóbicas de macromoléculas (GITLER, 1972). No caso da TTR, esta molécula sabidamente liga-se ao canal de T4 resultando em um grande aumento de sua fluorescência (PETERSON E COLS., 1975). A ligação dos compostos neste mesmo canal levaria ao deslocamento do ANS com concomitante decaimento de sua fluorescência.

Primeiramente, realizamos uma curva de titulação de ANS com a wt e a L55P-TTR para determinar qual seria a mínima concentração necessária para saturar os sítios de interação TTR-ANS. Neste experimento mostrado na Figura 19A, incubamos a wt e a L55P-TTR a temperatura ambiente, pH 7,5 na concentração de 1 μ M e adicionamos concentrações crescente de ANS. A emissão de fluorescência foi então monitorada nos comprimentos de onda entre 400 e 600 nm (inserto Figura 19A).

Conforme visto na Figura 19A, as duas proteínas apresentam afinidades semelhantes ao ANS. Na concentração de aproximadamente 10 μ M de ANS forma-se um platô que indica a saturação.

Visto que a menor concentração necessária para saturar a ligação TTR-ANS foi de 10 μ M, usamos esta concentração para realizar o experimento de cálculo da afinidade dos ligantes observando o deslocamento da sonda através do decréscimo de sua fluorescência. Para isso, incubamos a proteína na concentração de 1 μ M na presença de 10 μ M de ANS por 15 min a 25 °C, pH 7,5. À esta solução foram acrescentadas alíquotas de LUM, IND e SUL e a fluorescência do ANS era então avaliada nos comprimentos de onda já mencionados.

. Como mostram as Figuras 19B e C, LUM deslocou aproximadamente 80 % do ANS, enquanto que IND e SUL deslocaram apenas 40 % da sonda. Este resultado sugere que o primeiro ligante tem uma afinidade maior pela proteína. Interessantemente, a ordem de afinidade observada foi a mesma para a wt e para a L55P-TTR e, a saber, $LUM > IND = SUL$.

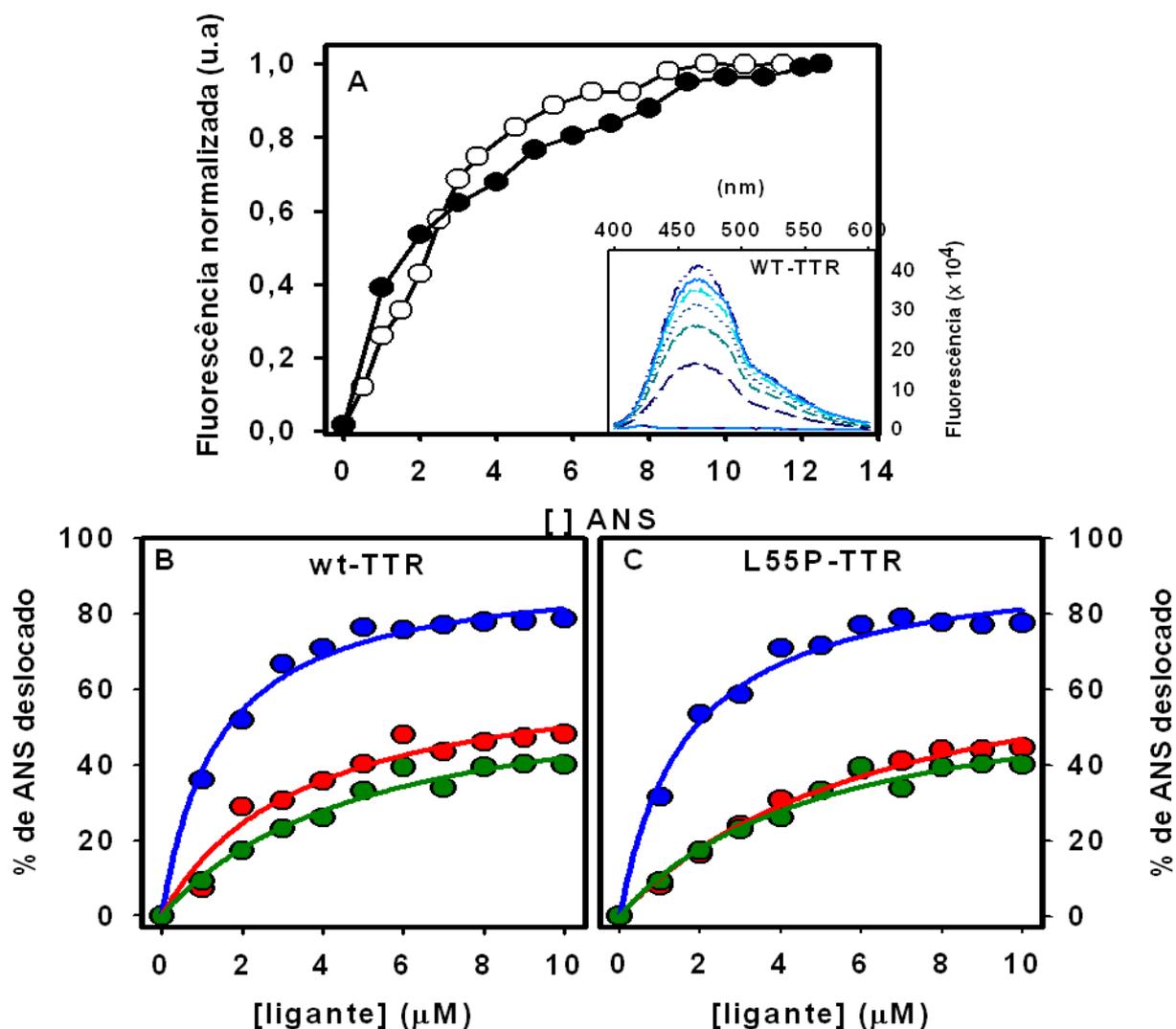


Figura 19 – Titulação de ANS e medição das afinidades dos compostos pela TTR. O painel A mostra a curva de titulação do ANS realizada com a wt (○) ou a L55P-TTR (●). No inserto estão mostrados os espectros do ANS para a wt. Os painéis B e C mostram a % de ANS deslocado a medida que concentrações crescentes de Lumiracoxibe (●), Indometacina (●) e Sulindaco (●) foram adicionados à solução. (B) wt-TTR e (C) L55P-TTR. Em todos os casos, o comprimento de onda usado para excitar a amostra foi de 370 nm e a fluorescência foi varrida de 400 a 600 nm. A concentração de proteínas foi de 1 μM. A temperatura foi 25 °C e o pH 7,5.

4.3 - EFEITO DO LUMIRACOXIBE, INDOMETACINA E SULINDACO SOBRE A ESTABILIDADE DA wt E L55P-TTR

Como já dito anteriormente, a alta pressão hidrostática (APH) é uma ferramenta peculiar e muito usada em nosso laboratório para o estudo de agregação, estabilidade e enovelamento de sistemas protéicos (FERRÃO-GONZALES E COLS., 2000; FOGUEL E SILVA, 2004; FOGUEL E COLS., 2003). Especialmente no caso da TTR, a alta pressão atua como um agente indutor da formação de agregados amilóides, pois induz a formação de um intermediário tetramérico muito propenso a agregação em condições de pH próximas à fisiológicas, e que foi chamado por nós de T₄* (FERRÃO-GONZALES E COLS., 2000).

Os estudos descritos na literatura, e também nesta dissertação, sobre a ação dos ligantes na agregação e estabilidade da TTR, foram obtidos usando-se como agente perturbador da estrutura da proteína a desnaturação ácida. Nesta sessão, descreveremos os efeitos dos inibidores na estabilidade da wt e da L55P-TTR usando a APH como agente perturbador.

Com o uso desta ferramenta também, é possível calcular a variação de volume ligada à dissociação-desnaturação na presença dos diferentes ligantes e relacionar o efeito inibidor da agregação com a estabilização da estrutura quaternária e terciária. Para tal, avaliamos o maior ou menor grau de exposição dos triptofanos pelas medidas de variação da energia total do centro de massa espectral dos triptofanos.

A TTR possui dois resíduos de triptofanos, que estão presentes nas posições 41 e 79 da cadeia primária, sendo que o triptofano 41 é o que mais contribui para a emissão de fluorescência estudada.

Já foi descrito pelo nosso grupo que quando submetida ao tratamento com a APH, a wt-TTR e variantes sofrem dissociação seguida de desnaturação parcial dos monômeros. (FERRÃO-GONZALES E COLS., 2000; FERRÃO-GONZALES E COLS., 2003).

Resolvemos então, avaliar qual seria o ganho de estabilidade causado pela ligação dos inibidores ao sítio da tiroxina. Para isso, submetemos a wt e a L55P-TTR a um ciclo de pressão a 1 e 37 °C, pH 7,5 na presença ou ausência do Sulindaco e da Indometacina, sendo a concentração de proteína 1 μ M e a de ligantes 10 μ M (Figura 20). Escolhemos a temperatura de 1 °C porque essa temperatura sabidamente favorece a dissociação da TTR e 37 °C por ser uma temperatura de relevância fisiológica.

Utilizamos para os estudos de estabilidade por fluorescência esses dois inibidores, pois eles são os únicos avaliados por nós que não interferem na emissão de fluorescência dos triptofanos (Figura 11). Além disso, desejávamos comparar a estabilidade com o efeito inibitório e esses dois ligantes, apesar de terem sua estrutura química bastante semelhante, apresentam atividades bastante diferentes quanto em relação à inibição da agregação.

Os painéis da figura 20 mostram o perfil de dissociação-desnaturação de 1 μ M da wt-TTR na ausência ou na presença de 10 μ M de IND ou SUL. Os painéis A e C mostram os experimentos feitos a 37 °C e os painéis B e D mostram os experimentos realizados a 1 °C. Como Utilizamos o deslocamento do centro de massa espectral do triptofano para avaliar a dissociação-desnaturação da proteína (painéis A e B). Nos painéis C e D estão os dados expressos em extensão da reação (α).

Conforme observado, nas duas condições avaliadas, os dois compostos aumentaram a estabilidade da proteína frente ao agente desnaturante. No entanto, quando o experimento é realizado a 37 °C, fica mais difícil de visualizar o efeito

protetor dos compostos, uma vez que nesta temperatura a dissociação-desnaturação da proteína é parcial, mesmo na ausência de aditivos. A 1° C, a proteína perde estabilidade, passando a desnaturar em pressões menores. A 1 °C o $p_{1/2}$ de desnaturação na ausência dos compostos é de 980 bar, ao passo que a 37 °C é de 2.257 bar, mostrando claramente o papel da diminuição da temperatura na estabilidade da TTR (Tabela 3).

Conforme visto na Tabela 4, na presença de IND e SUL os valores de $p_{1/2}$ foram respectivamente, 2,607 e 1,240 bar, quando o experimento é realizado a 1 °C. O valor de $p_{1/2}$ de desnaturação obtido na presença de IND mostra claramente a estabilização causada por este ligante à proteína. Este dado corrobora a maior eficiência deste composto em inibir a agregação da proteína em relação ao SUL. Os valores de $p_{1/2}$ obtidos quando o experimento foi feito a 37 °C não demonstram tão claramente o efeito protetor dos compostos quanto a 1 °C e são de 2,867 e 2,540 bar na presença de IND e SUL respectivamente.

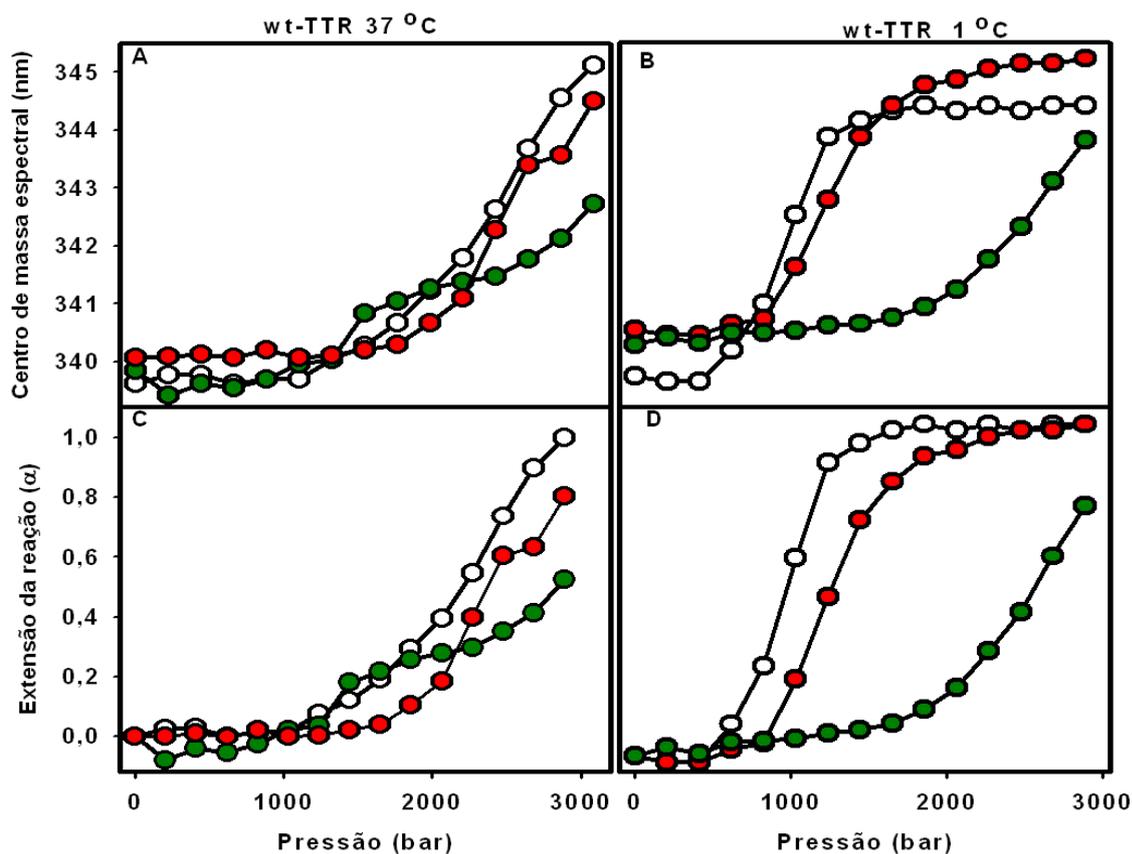


Figura 20 – Perfil de dissociação-desnaturação da WT-TTR na presença dos ligantes. A wt-TTR foi incubada na concentração de 1 μM na ausência (\circ) ou na presença de 10 μM de Sulindaco (\bullet) e Indometacina (\bullet), a 37 $^{\circ}\text{C}$ (painel A) ou 1 $^{\circ}\text{C}$ (painel B) e em pH 7,5. A cada incremento de pressão, a reação era equilibrada por 10 minutos. Após este tempo a fluorescência foi coletada de 300 a 400 nm, com a excitação programada para 280 nm. O centro de massa espectral foi usado para avaliar a reação de desnaturação. Tanto o Sulindaco quanto a Indometacina foram eficientes em aumentar a estabilidade da proteína frente à APH.

Amostra pH 7,5	$P_{1/2}$ (bar) 37 $^{\circ}\text{C}$	$P_{1/2}$ (bar) 1 $^{\circ}\text{C}$
WT-TTR 1 μM	2.257	980
+ INDO 10 μM	2.867	2.607
+ SUL 10 μM	2.540	1.240

Tabela 4. Valores de $p_{1/2}$ de desnaturação da wt-TTR:ligantes. Os valores de $p_{1/2}$ foram obtidos através do ajuste da curva de extensão da reação (α) (Figura 8, painéis C e D).

Realizamos o mesmo experimento descrito na Figura 20B (1°C) com a variante L55P-TTR. Este variante apresenta uma grande instabilidade frente à APH desnaturando em pressões bem menores do que a wt-TTR (FERRÃO-GONZALES E COLS., 2003).

Conforme visto na Figura 21, os compostos Indometacina e Sulindaco foram capazes de estabilizar fortemente o L55P contra a dissociação-desnaturação induzida pela APH. Esta estabilização pode ser também vista na Tabela 5 que apresenta os valores de $p_{1/2}$ e de energia livre de Gibbs (ΔG).

Enquanto na ausência dos inibidores o $p_{1/2}$ do L55P foi de 514 bar, na presença de 10 μ M Indometacina e Sulindaco foi de, respectivamente, 1.824 e 932 bar.

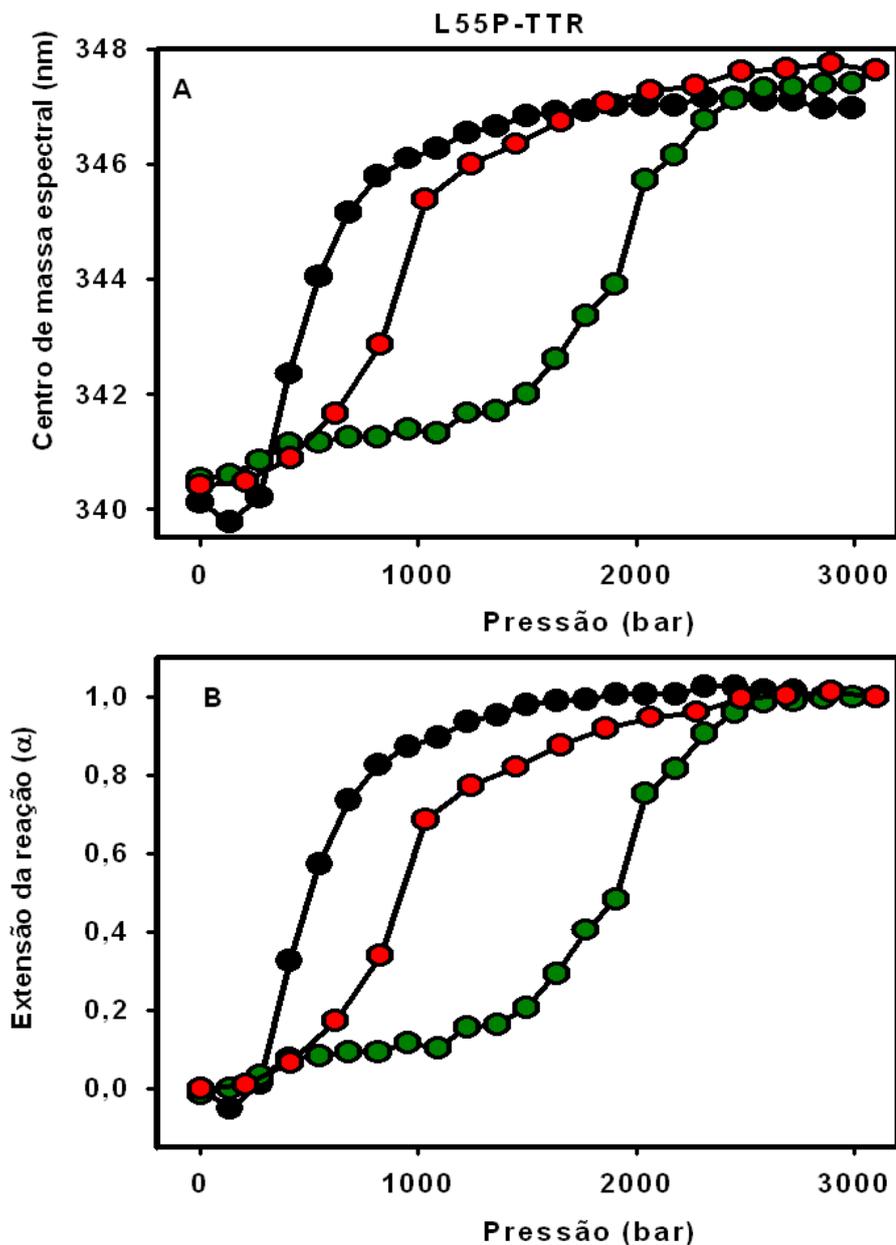


Figura 21 – Efeito dos compostos na dissociação-desnaturação induzida por APH a 1°C. A L55P-TTR foi incubada na concentração de 1 μM na ausência (●) ou na presença de 10 μM de Sulindaco (●) e Indometacina (●) a 1 °C, pH 7,5. A cada incremento de pressão, a fluorescência foi coletada de 300 a 400 nm, com a excitação em 280 nm. Em A estão os valores brutos em nanômetros e em B estão os valores expressos em extensão da reação (α), obtidos através da equação 3.

Amostra - pH7,5	P_{1/2} (bar)	ΔG
L55P 1μM	514	-24,6
+ INDO 10 μM	1.824	-35,3
+ SUL 10 μM	932	-32,4

Tabela 5. Valores de p_{1/2} e ΔG dos complexos L55P-TTR:ligantes.

Estudos anteriores mostraram que a APH promove uma mudança conformacional na wt-TTR que culmina em um intermediário amiloidogênico tetramérico, o T₄* (FERRÃO-GONZALES E COLS., 2000). Este intermediário é altamente propenso a agregação em pH 5 e 37 °C, sendo que após de 30 min do retorno à pressão atmosférica, a proteína forma agregados amilóides.

Com vista ao exposto, resolvemos avaliar qual seria o efeito dos ligantes na agregação induzida por APH. Para isso, submetemos a wt e a L55P-TTR na concentração de 3,5 e 1 μM respectivamente, a 3 kbar, 37 °C, pH5, por 60 min na ausência ou na presença dos inibidores de agregação, após este tempo a pressão foi removida e os valores de espalhamento de luz foram acompanhados como forma de medir a agregação.

Conforme visto na Figura 22, na ausência dos compostos os valores de espalhamento de luz aumentam 10 e 17 vezes após a descompressão da wt e da L55P respectivamente. A L55P, conforme esperado, agrega bem mais do que a wt-TTR, principalmente se lembrarmos que a concentração de wt foi de 3,5 vezes maior que a da variante.

Nos painéis A e B (wt-TTR) a concentração de inibidores foi de 8 e 35 μM (aproximadamente 2 e 10 vezes respectivamente a concentração usada de proteína).

Observamos que na razão de 1:2 de proteína:ligante, LUM foi mais efetivo em inibir a agregação do que IND e SUL. O espalhamento de luz aumentou apenas 2 vezes na presença de LUM, 4 vezes na presença de IND e 5 vezes na presença de SUL. Quando a razão de proteína:ligante foi a de 1:10 a inibição aconteceu de forma bastante semelhante entre os três ligantes, chegando a ser de quase total no caso do LUM E IND.

Nos painéis C e D vemos o resultado do mesmo experimento feito com o variante L55P. Sendo a razão de proteína ligante de 1:2 (painel C), SUL praticamente não apresentou efeito inibitório, e o espalhamento de luz na sua presença aumentou 16 vezes. LUM continuou sendo o mais eficiente, e em seguida a IND. A mesma ordem de eficiência foi observada no painel D (razão de 1:10 de proteína:ligante). Na presença de LUM a agregação foi completamente inibida ao passo que, na presença de IND o espalhamento de luz aumentou em torno de 8 vezes e na presença de SUL aumentou 10 vezes.

Em todos os ensaios a ordem de eficácia observada se manteve a seguinte:
LUM>IND>SUL.

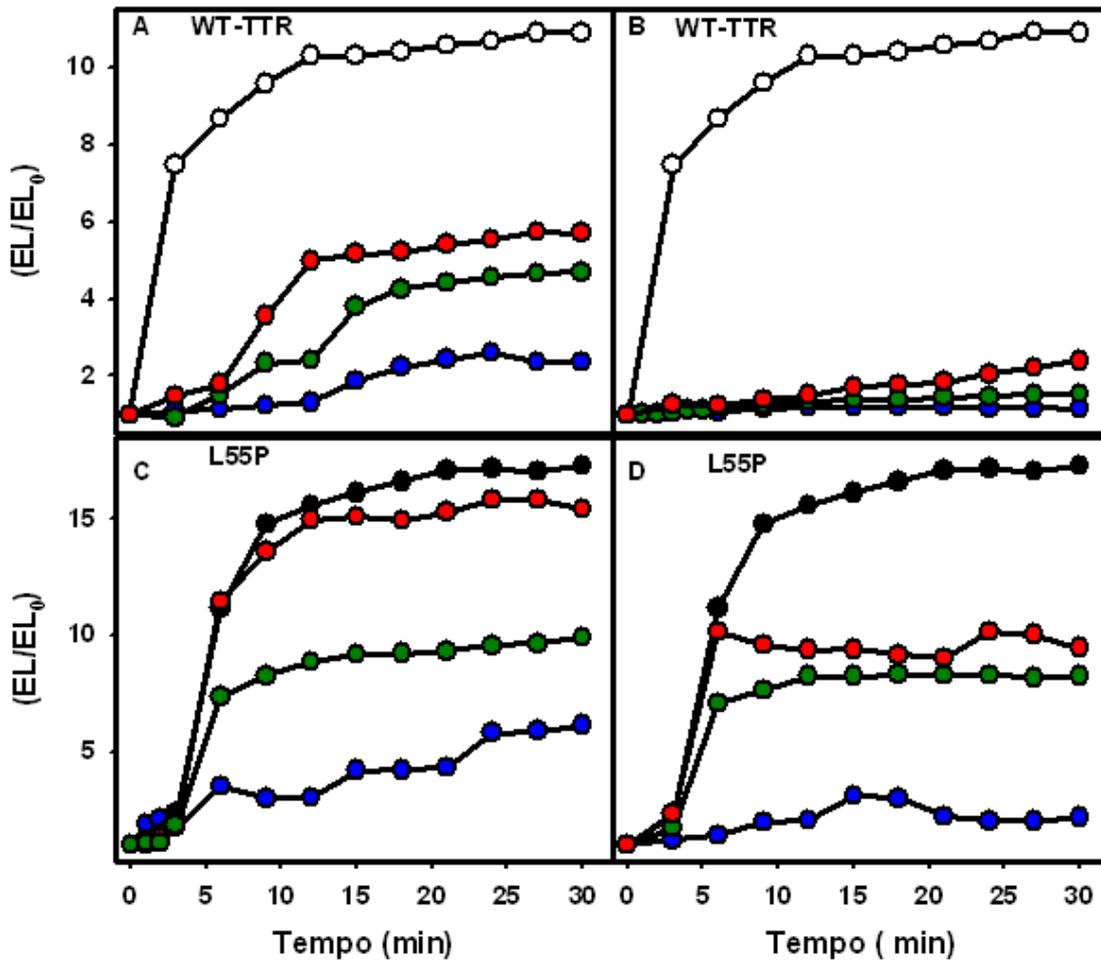


Figura 22 – Efeito dos compostos na agregação induzida por APH. As amostras de wt a 3,5 μM e L55P a 1 μM foram pressurizadas na ausência (wt (\circ); L55P-TTR (\bullet)) ou na presença de LUM(\bullet), IND (\bullet) e SUL (\bullet) nas concentrações de 8 e 35 μM (painéis A e B respectivamente) e 2 e 10 μM (painéis C e D respectivamente). As condições experimentais são: 37 $^{\circ}\text{C}$ e pH 5. As amostras são pressurizadas a 3 kbar por 60 minutos. Após este tempo a pressão é retirada e o espalhamento de luz medido até 30 minutos excitando-se as amostras em 400 nm e a luz emitida de 385 a 415 nm para monitorar a agregação.

5. DISCUSSÃO

Atualmente, já se conhecem mais de 25 proteínas cujo depósito extracelular está envolvido em amiloidoses (DOBSON, 2003; SELKOE, 2003; DE LORENZI E COLS., 2004), o que justifica a busca por tratamento para essas doenças que tendem a aumentar em importância à medida que a expectativa de vida média da população vai aumentando.

A agregação protéica tem início pelo mau enovelamento ou desnaturação parcial de uma proteína funcional, culminando na formação dos agregados tóxicos (LAI E COLS., 1996; KELLY E COLS., 1997; GUIJARRO E COLS., 1998; MCPARLAND E COLS., 2000; DUMOLIN E COLS., 2003). Estudos bastante recentes têm demonstrado que esta desnaturação parcial, no caso de proteínas estruturadas, pode ser bastante sutil, não requerendo grandes mudanças na conformação da proteína (CHITI E DOBSON., 2009). Exceção a esta regra é a proteína do príon que requer grandes rearranjos de estrutura secundária previamente à sua agregação (PRUSINER, 1998).

Muitos estudos têm sido feitos por diferentes grupos de pesquisa para elucidar os mecanismos moleculares que expliquem as amiloidoses. Hoje em dia, já se conhece vários aspectos envolvidos com a agregação protéica *in vitro* e mesmo *in vivo*. No entanto, apesar desses esforços, não existe ainda cura para nenhuma dessas doenças (JOHNSON E COLS., 2008).

No que diz respeito às amiloidoses causadas pela TTR, o único tratamento efetivo e já adotado para tratar a PAF é o transplante de fígado. Neste procedimento, é realizada a troca do fígado produtor da TTR variante e amiloidogênica por um fígado que produz a proteína selvagem (HOLMGREN E COL., 1991; HOLMGREN E COLS., 1993). Devido à falta de doadores e a outros problemas associados ao transplante de

órgão, esta cirurgia não pode ser realizada em larga escala para atender a todos os pacientes de PAF (ANDO, 2005). Além disso, o transplante não é uma terapia possível para a ASS, visto que esta doença é causada pelo acúmulo da wt-TTR em pacientes idosos (DUBREY E COLS., 1997; YAZAKI E COLS., 2000). Mesmo nos indivíduos transplantados não é possível se eliminar os depósitos presentes, sendo apenas possível retardar a deposição de novos agregados.

Uma alternativa para o transplante e que vêm sendo bastante estudada, é o desenvolvimento de compostos que possam atuar em diferentes etapas do processo que leva à agregação. No caso da TTR, estas etapas seriam: 1. O bloqueio da produção da proteína alvo; 2. Aumento da taxa de degradação; 3. O aumento da estabilidade da proteína nativa; 4. Diminuição da taxa de agregação e 5. A desestabilização dos agregados já existentes aumentando sua dissociação e degradação (Figura 23) (SARAIVA, 2002; SACCHETTINI E KELLY, 2002; COHEN E DOBSON, 2003).

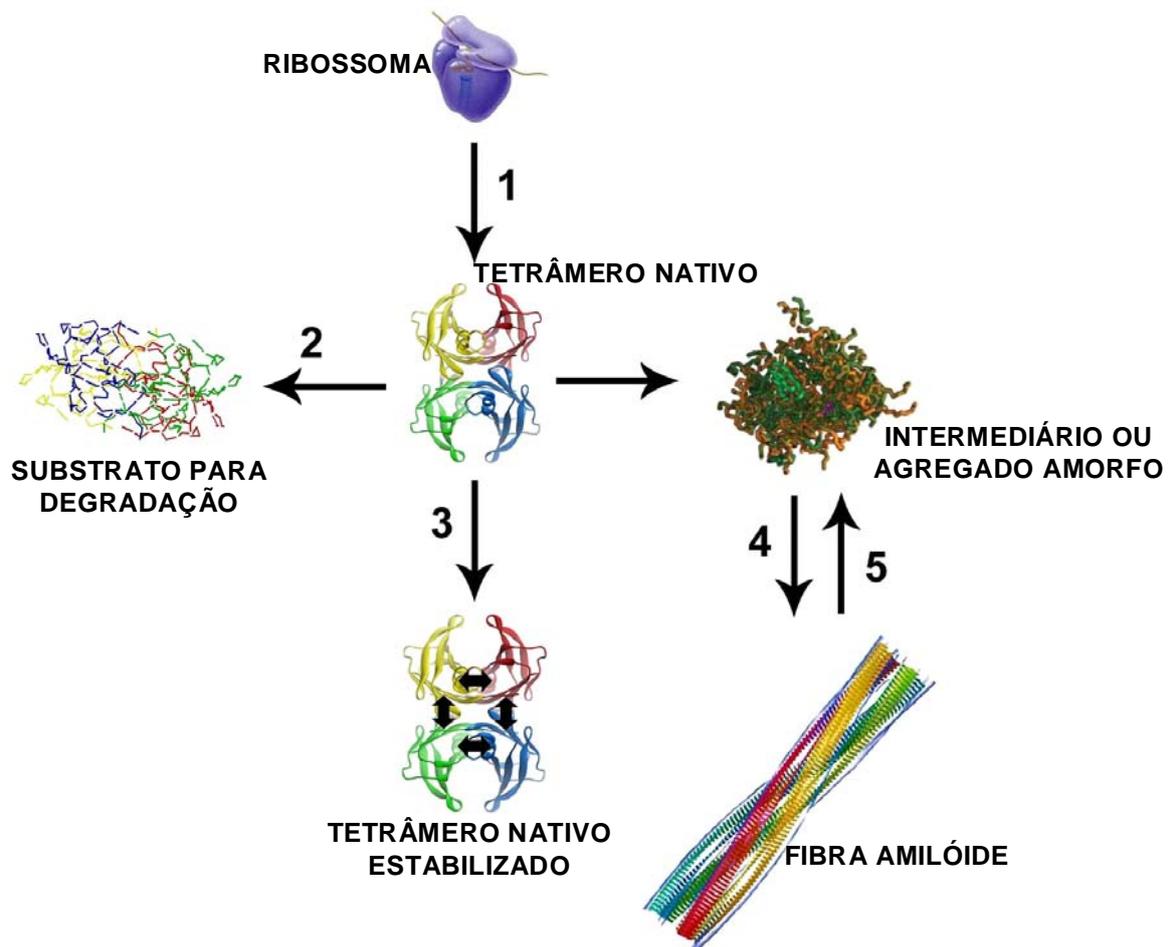


Figura 23. Possíveis estratégias para intervenção terapêutica. (1) inibição da síntese da proteína alvo (TTR); (2) aumento da taxa de degradação pela célula; (3) estabilização da proteína em sua estrutura nativa; (4) bloqueio da formação da fibra; (5) desestabilização e degradação da fibra.

Diversas classes de compostos químicos já foram testadas nessas diferentes etapas citadas e usando como modelo de agregação diferentes proteínas ou peptídeos (ALTLAND E COLS., 1999; YANG E COLS., 1999; SEBASTIAO E COLS., 2000; KLABUNDE E COLS., 2000; CONWAY E COLS., 2002; FERRAO_GONZALES E COLS., 2005; EHRNHOEFER E COLS., 2008; BAURES E COLS., 2008).

No caso da doença de Parkinson, recentemente foi demonstrado que determinados tipos de flavonóides, como a Baicaleína, que é muito encontrado em chás tradicionalmente presentes na alimentação chinesa, foram capazes tanto de inibir a formação como desfazer os agregados já existentes desta proteína *in vitro* (ZHU E COLS., 2004). Este mesmo composto já havia sido estudado também pela suas atividades anticancerígenas e antialérgicas (SHIE E COLS., 2000; IKEZOE E COLS., 2001). Em um estudo semelhante, avaliando também a inibição e a dissociação dos agregados, Hirohata e colaboradores demonstraram que os antiinflamatórios não esteroidais Ibuprofeno, Aspirina, Sulfeto de Sulindaco, Flurbiprofeno, Cetoprofeno e Diclofenaco sódico apresentaram de maneira dependente de dose os mesmos efeitos observados para o flavonóide mencionado (HIROHATA E COLS., 2007; EHRNHOEFER E COLS., 2008).

A doença de Alzheimer (AD), que tem como uma de suas principais características a formação de agregados do peptídeo A-Beta, pode ter seu curso acelerado devido a mutações na proteína precursora do peptídeo, a APP. Essas mutações aumentam a taxa de clivagem da APP levando ao maior acúmulo de agregados (HOWLETT, 1999; YANG, 2001; FINDEIS, 2002). Apesar da sequência exata de eventos que desencadeiam os sintomas da doença ainda estarem em debate, é cada vez mais aceito que a resposta inflamatória causada pelo acúmulo dos agregados, com conseqüente ativação das células da microglia, proliferação de astrócitos e aumento dos níveis de proteínas ligadas ao estresse oxidativo é fundamental para o agravamento dos

sintomas (GOLDE E COLS., 2002). Desta maneira, muitos compostos antiinflamatórios em uso continuado têm sido apontados com protetores contra os sintomas da AD, visto que estes compostos combatem tais respostas inflamatórias (AKYIAMA E COLS., 2000; SELKOE E COLS., 2001).

Em relação à degradação dos agregados já formados, podemos citar o caso do composto 4'-deoxy-4'-iododoxorubicin (IDOX). Este composto se mostrou efetivo em desfazer fibras da proteína TTR, transformando-os em agregados amorfos e não tóxicos, mas, infelizmente, o IDOX é cardiotoxico (PALHA E COLS., 2000). A interação deste composto com espécies oligoméricas da variante L55P da TTR vêm sendo estudada para permitir o desenvolvimento de um composto similar não tóxico (SEBASTIAO E COLS., 2000). Vale ressaltar que um composto capaz de desfazer fibras já formadas poderia ser útil no tratamento de amiloidoses causadas por diferentes proteínas amiloidogênicas, já que as fibras apresentam morfologia semelhante. No entanto, face à recente observação de que as fibras maduras não seriam tóxicas, mas sim espécies protetoras, é necessário que se revise tal estratégia (REIXACH E COLS., 2003; ANDERSSON E COLS., 2003).

O mau enovelamento que ocorre no retículo endoplasmático é altamente controlado pelo complexo sistema chaperonas-proteassoma. Já o desvio da rota produtiva que ocorre em etapas posteriores à secreção celular é mais difícil de ser contornado. Além disso, o processo de degradação de proteínas e agregados diminui muito com as doenças e principalmente com a idade (COHEN E KELLY, 2003). Nestes casos, a estabilização do estado nativo da proteína pelo uso de “chaperones químicos” é uma estratégia vantajosa, especialmente em relação à amiloidogenicidade da TTR, e esta estratégia vem sendo amplamente estudada.

Todas as mutações da TTR descritas até hoje e relacionadas à PAF diminuem a estabilidade dos tetrâmeros ou aumentam a taxa de dissociação e, conseqüentemente, a amiloidogenicidade (HAMMASTROM E COLS., 2002). A busca por uma molécula que estabilize a estrutura nativa da TTR, aumentando a barreira energética que leva à dissociação, teve início pela observação da inexistência de agregação da TTR no fluido cérebro espinhal. Neste fluido, mais de 90 % da TTR encontra-se ligada ao hormônio T4 e nem mesmo o seu mutante mais agressivo, L55P-TTR é capaz de agregar no SNC (MIROY E COLS., 1996; PETERSON E COLS., 1998).

Desde que foi demonstrado pela primeira vez que o Ácido Flufenâmico, um antiinflamatório não esteroideal (AINE), foi capaz de abolir quase completamente a agregação da TTR *in vitro* (PETERSON E COLS., 1998), dezenas de compostos candidatos a inibidores de agregação da TTR já foram testados e mostraram prevenir eficazmente a agregação desta proteína, mesmo após longos períodos de incubação (MIROY E COLS., 1996; KELLY E COLS., 1997; PETERSON E COLS., 1998; BAURES E COLS., 1998; OSA E COLS., 1999; PETRASSI E COLS., 2000; KLABUNDE E COLS., 2000; WHITE E KELLY, 2001; PURKEY E COLS., 2001; OSA E COLS., 2002). Apesar de todos estes estudos, ainda não se chegou a um composto realmente eficaz para fins terapêuticos, principalmente pelos seguintes motivos: 1) os compostos avaliados até hoje se ligam também a outras proteínas plasmáticas e desta forma a concentração utilizada deveria ser bastante elevada para atingir o alvo específico, ou seja, a TTR (DAMAS E SARAIVA, 2000; SACCHETTINI E KELLY, 2002); 2) os ligantes mais promissores avaliados até hoje são da classe dos (AINEs) ou derivativos destes. Desta forma, estes compostos apresentam atividade inibidora das enzimas ciclooxigenases. Ciclooxigenases são enzimas responsáveis pela formação de importantes mediadores biológicos, como as prostaglandinas. Essa inibição

continuada pode causar severos efeitos colaterais, como irritação gastrointestinal, úlceras e sangramentos, além da diminuição da produção desses mediadores que desempenham importantes funções biológicas (WALLACE, 2001; CRYER, 2001).

Diferente dos compostos químicos mencionados, Green e colaboradores relataram em 2005 que o flavonóide Genisteína, presente em abundância na soja, foi eficiente em inibir a agregação da wt, V30M e V122I-TTR *in vitro* (GREEN E COLS., 2005). Neste trabalho foi demonstrado que a Genisteína é altamente seletiva para a TTR em relação a outras proteínas plasmáticas e possui por ela grande afinidade. Apesar de promissora, a Genisteína pode influenciar diversas vias metabólicas de forma não desejável, como por exemplo, a inibição da ação das tirosinoquinases (POLKOWISKI E COLS., 2000; RAVINDRANATH e COLS., 2004) e por isso são necessários indispensáveis testes clínicos adicionais para uso em longo prazo.

Neste trabalho, testamos seis compostos como possíveis inibidores da agregação da TTR, usando a proteína selvagem e o mutante mais amiloidogênico descrito até a data, o L55P-TTR, como modelos. Todos eles, já foram ou são ainda usados para outros fins terapêuticos conforme mostra a Tabela 1 na Introdução. Indometacina e Sulindaco já foram estudados como inibidores da agregação da TTR, porém, apenas estudos iniciais foram realizados demonstrando sua ação (BAURES E COLS., 2008). Lumiracoxibe, Clorpromazina, Cetoconazol e Propranolol não haviam ainda sido avaliados como inibidores da agregação da TTR.

Demonstramos que os seis compostos escolhidos, apesar de sua semelhança estrutural, não proporcionaram a mesma taxa de inibição da agregação da wt ou da L55P-TTR. Diferentemente do que é sugerido por alguns autores de que a presença de pelo menos dois anéis aromáticos e um número mínimo de grupamentos (OH) seriam suficientes para configurar um bom inibidor da agregação da TTR (PORAT E COLS.,

2006), apenas três dos compostos avaliados com essas características apresentaram atividade (LUM, IND e SUL), ao passo que CLO, PRO e CET não foram efetivos em bloquear a agregação. Este dado pode ter relevância para o desenho racional de fármacos eficientes para o uso terapêutico nas amiloidoses causadas pela TTR.

Ainda em relação à especificidade do mecanismo de ação dos compostos, alguns estudos têm sugerido que a ocupância de pelo menos um dos sítios de ligação do hormônio tiroxina seria suficiente para causar o efeito inibitório (WISEMAN E COLS., 2004). Esta idéia tem sido confrontada por estudos demonstrando que interações específicas devem se estabelecer entre o composto e a proteína para ser o efeito inibitório observado (BAURES E COLS., 1999; JOHNSON E COLS., 2008).

A sonda hidrofóbica ANS, nas concentrações estudadas por nós, se liga aos dois sítios do hormônio (WERBER E COLS., 1974; PETERSON E COLS., 1975), mas, como demonstrado pelo ensaio de agregação, este ligante não foi capaz de inibir a agregação da wt-TTR nem mesmo sutilmente (Figura 13), o que nos permite concordar com a segunda hipótese mencionada, reafirmando que interações específicas entre a proteína e o ligante devem existir para que ocorra o efeito inibitório. Seria interessante determinar a estrutura da TTR ligada ao ANS para tentarmos identificar os aminoácidos envolvidos nessa ligação e compará-la com a estrutura da TTR complexada aos ligantes efetivos enquanto inibidores.

A maioria dos estudos que avaliaram a eficiência dos inibidores se detiveram a observar apenas o ponto final da extensão de agregação das variantes da TTR na ausência ou presença dos compostos em estudo, e, a partir daí, a taxa de inibição foi inferida (MIROY E COLS., 1996, PETERSON E COLS., 1998; OSA E COLS., 2002). Ao acompanharmos a cinética completa de agregação durante as 72 h, descobrimos que existe uma diferença entre os efeitos dos inibidores sobre a agregação da wt e da L55P,

efeito este que pensamos estar relacionado ao diferente perfil de dissociação-agregação destas duas proteínas. Ao investigarmos esta hipótese, acompanhando pela gel filtração as espécies presentes ao longo da cinética de agregação das duas proteínas, concluímos que a diferença de ação dos compostos sobre a agregação das proteínas se deve à presença ou não de tetrâmeros em solução. De fato esses compostos só são eficientes enquanto inibidores quando ligados ao tetrâmero da TTR. Uma vez dissociados gerando monômeros, os compostos não foram mais capazes de agir (Figura 16).

Como já foi dito, os eventos iniciais que deflagram a agregação da TTR em condições ácidas, envolvem a dissociação do tetrâmero em monômeros parcialmente desenovelados, para, em seguida, acontecer a formação das fibras (LAI E COLS., 1996). Mesmo tendo demonstrado que o alvo principal desses três inibidores seria o tetrâmero nativo da TTR, poderiam estar ocorrendo ainda outros mecanismos de inibição. Ou seja, além de se ligar ao tetrâmero das duas proteínas, os compostos poderiam estar impedindo a ida do monômero dissociado à conformação amiloidogênica e/ou impedindo a formação de fibras em etapas posteriores (HOWLETT E COLS., 1999; YANG e COLS., 2005; PORAT E COLS., 2006). Desta maneira, caso os compostos estivessem impedindo a ida do monômero dissociado à conformação amiloidogênica e/ou prevenindo a formação de fibras, observaríamos efeito inibitório dos ligantes quando estes fossem incubados com o monômero engenheirado da TTR (M-TTR). Isto não foi visto (Figura 18), o que nos permite afirmar que a ligação ao tetrâmero nativo é o mecanismo de inibição da agregação dos compostos aqui estudados.

Uma vez que a concentração plasmática da TTR no sangue é considerada alta (3,6 μM), a concentração de compostos promissores como inibidores deverá ser ajustada de modo a ser suficiente para prevenir sua dissociação *in vivo* (SACCHETTINI

E KELLY, 2002). Além disso, pode acontecer a ligação à outras proteínas plasmáticas de forma inespecífica. Observamos em nossos experimentos que LUM possui grande afinidade pela wt e pela L55P-TTR, enquanto SUL e IND são menos afins (Figura 19). Podemos sugerir com estes dados de afinidade em conjunto com os dados de dose-resposta obtidos pelas curvas de concentração que o maior efeito do LUM em baixas concentrações (Figura 14) se dá pela ocupação dos dois sítios de T4 logo nas primeiras concentrações adicionadas, já que a ocupância dos dois sítios é um requisito importante para uma maior estabilização da estrutura da proteína (HAMMARSTROM E COLS., 2003; GREEN E COLS., 2003).

A grande maioria dos estudos de agregação *in vitro* com a TTR usa o tratamento ácido prolongado (72 – 96 h) como forma de induzir a fibrilogênese. Este protocolo apresenta o inconveniente do longo período de incubação para se poder observar a extensão máxima da reação de agregação. Em se tratando do *screening* de uma grande biblioteca, seria desejável a descrição de um protocolo mais rápido. Com o intuito de aperfeiçoar esse tipo de protocolo, Dolado e colaboradores em 2005 usaram o mutante altamente amiloidogênico da TTR, o Y78F-TTR que agrega em cerca de 1,5 h em pH 4,2. (DOLADO E COLS., 2005). Infelizmente, este protocolo tem a desvantagem de utilizar um variante raramente encontrado naturalmente, além de um pH extremamente ácido (pH 4,2), o que pode modificar a estrutura química dos compostos por protonação.

Em nosso laboratório, a ferramenta da APH tem sido amplamente usada para estudar o envelhecimento e o processo de agregação de diferentes sistemas protéicos (FERRÃO-GONZALES E COLS., 2003; ISHIMARU E COLS., 2003; CORDEIRO E COLS., 2004) Em 2000, nosso grupo mostrou que após um ciclo de pressão e descompressão em pH 5 - 5,6 a 37°C a wt, V30M e a L55P-TTR formavam agregados

amilóides em menos de 30 min (FERRÃO-GONZALES E COLS., 2000). Sendo o pH utilizado neste ensaio mais próximo ao fisiológico do que o que vem sendo usado (pH 4,4) e o tempo necessário para a formação dos agregados bastante reduzido (cerca de 20-30 minutos), adotamos este protocolo para avaliar a eficácia dos compostos em inibir este tipo de agregação. O resultado obtido (Figura 22) foi totalmente de acordo com aqueles já observados quando o agente indutor foi o baixo pH. A mesma ordem de eficácia foi observada para LUM, IND e SUL quando comparamos os dados de APH (Figura 22) e baixo pH (Figura 12). Este resultado sugere o uso da APH como uma nova metodologia para o *screening* de compostos antiamiloidogênicos, possibilitando o teste de vários deles em um curto espaço de tempo e em condições experimentais um pouco mais próximas das fisiológicas.

IND e SUL apresentaram-se como o melhor e pior inibidores da agregação da TTR induzida por APH baixo pH, respectivamente. Quando avaliamos suas fórmulas químicas, vemos que a principal diferença entre eles é a substituição de um átomo de cloro por um de flúor e a presença de um átomo de Enxofre no Sulindaco. A ausência de emissão de fluorescência nos comprimentos de onda nos quais o triptofano emite nos permitiu avaliar a estabilidade conferida por eles à TTR.

Utilizando a APH como agente perturbador, observamos que IND estabiliza a estrutura da wt-TTR de tal forma que nem mesmo na temperatura de 1°C a proteína foi desnaturada pela pressão (Figura 20). Já o SUL proporcionou grande estabilização, porém não impediu a desnaturação induzida por APH. Os valores de $p_{1/2}$ obtidos na presença de IND e SUL foram 2.607 e 1.240 bar, respectivamente. A ordem de estabilidade foi a mesma observada nos experimentos de agregação: wt:IND > wt:SUL > wt. Sabendo da formação do intermediário amiloidogênico da wt-TTR após o tratamento com a pressão, o T_4^* , caracterizado pelo nosso grupo, poderíamos imaginar

que os compostos pudessem estar impedindo a sua formação e por isso a agregação frente à APH estaria sendo inibida. Uma outra possibilidade é que, em sendo o T_4^* mais instável que o T_4 , esses compostos estariam prevenindo a dissociação do T_4^* em monômeros amiloidogênicos. Este dado reforça a idéia da relação inversa existente entre amiloidogenicidade da variante com sua estabilidade termodinâmica, onde o ganho de estabilidade diminui a amiloidogenicidade (FERRÃO-GONZALES E COLS., 2000; FERRÃO-GONZALES E COLS., 2003; HAMMARSTROM E COLS., 2006).

Para tentar elucidar as bases estruturais da diferença no efeito antiamiloidogênico e estabilizador de IND e SUL observados sobre a TTR, em colaboração com o professor Luís Maurício da Faculdade de Farmácia, resolvemos as estruturas cristalográficas dos complexos wt-TTR:IND e wtTTR:SUL. Por opção nossa, esses dados não foram incorporados na seção de Resultados desta dissertação, uma vez que a minha participação nesses experimentos foi apenas na fase final, ou seja, a de interpretação dos dados.

A estrutura global da TTR se manteve praticamente inalterada pela ligação dos dois compostos, apresentando uma mudança muito sutil ($< 0,5 \text{ \AA}$) nos desvios das distâncias dos $C\alpha$ entre as sobreposições das estruturas, usando a forma “apo” como referência (Figura 24).

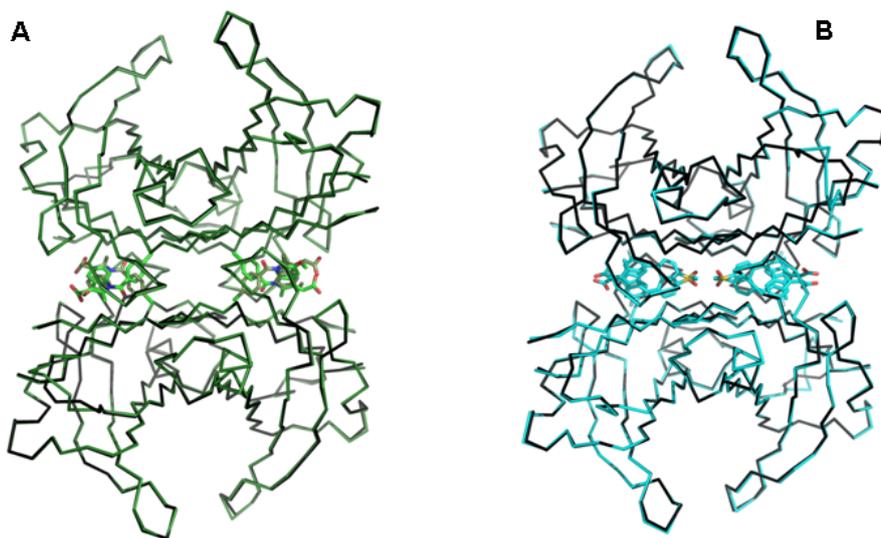


Figura 24. Efeito dos ligantes sobre a estrutura global da TTR. A estrutura cristalográfica da wt-TTR na forma “apo” encontra-se em preto e sobreposta à estrutura do complexo wt-TTR:IND (painel A, verde) e wt-TTR:SUL (painel B, azul). Observe a presença dos ligantes em seus dois possíveis modos de ligação no sítio do T4 e a perfeita superposição das formas apo e holo, indicando ausência de mudanças.

Uma observação mais detalhada do sítio de interação dos compostos revela que o número de interações existentes entre wtTTR:IND é superior em relação ao complexo wtTTR:SUL, além das distâncias de tais interações serem menores no primeiro caso, sendo assim mais robustas. No total, existem três interações principais entre IND e a wt-TTR, a saber: uma interação de hidrogênio com a Lys 15 (2,7 Å), uma interação de van der Walls entre o cloro da IND e a hidroxilas da Ser 117 (3,2 Å) e Thr 119 (2,8 Å). Em relação ao SUL, a única interação existente é uma ponte inônica formada entre o carboxílico do SUL e a amina da Lys 15 (3,66 Å) (FIGURA 25). Outras interações como van der Walls e hidrofóbicas ainda tomam parte no reconhecimento desses ligantes pela TTR. Essas interações ocorrem de modo similar em ambos os canais de T4, onde são encontrados IND e SUL.

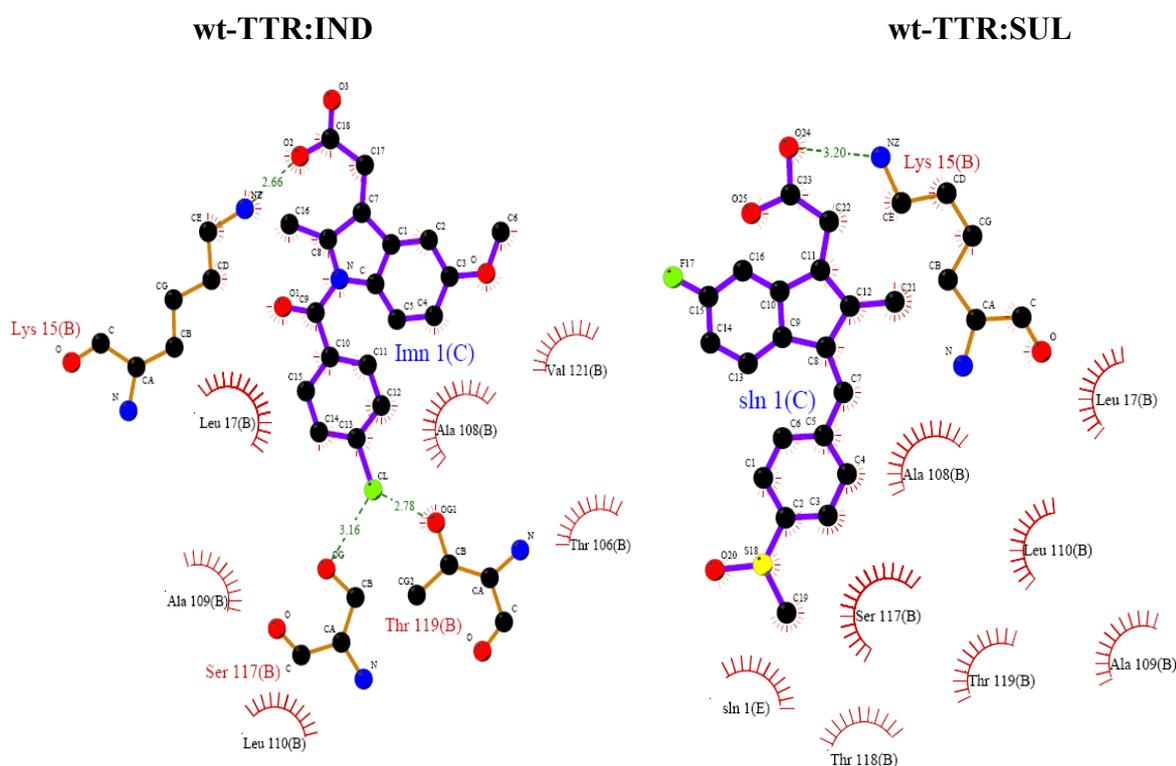


Figura 25. Esquemas das interações dos ligantes IND (esquerda) e SUL (direita) com os aminoácidos formadores do sítio da Tiroxina. Gerado pelo programa computacional Lig plot (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/ligplot/ligplot.html>). (WALLACE E COLS., 1995).

Este aumento de estabilidade foi mais notório no caso do mutante L55P-TTR, assim como mais visível a diferença de eficácia entre os dois ligantes. Este mutante tem sua taxa de dissociação mais acelerada em relação à wt-TTR, como demonstrado por nós, frente ao baixo pH (Figura 17) ou frente a outros agentes químicos desnaturantes (HAMMARSTROM E COLS., 2002). Como demonstramos ao longo desta dissertação que o momento crucial para a ação dos compostos é a prevenção da etapa de dissociação dos tetrâmeros, fica claro o motivo de tal efeito observado.

Sendo então, mais uma vez demonstrado que estabilidade e amiloidogenicidade estão diretamente relacionadas, tanto o desenho de fármacos mais eficientes e específicos como alguma outra forma de estabilizar a estrutura nativa da TTR parece ser uma busca interessante para a cura das amiloidoses relacionadas a esta proteína.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**A**

ANFINSEN, C. B. (1973). **Principles that govern the folding of protein chains.** *Science*, **181**, 223-230.

ARAKI, S.; MAWATARI, S.; OHTA, M.; NAKAJIMA, A.; KUROIWA, Y. (1968). **Polyneuritic amyloidosis in a Japanese family.** *Arch Neurol*, **18**, 593-602.

B

BALDWIN, R. L. (1975). **Intermediates in protein folding reactions and the mechanism of protein folding.** *Annu Rev Biochem*, **44**, 453-475.

BARTALENA, L.; ROBBINS, J. (1993). **Thyroid hormone transport proteins.** *Clin Lab Med*, **13**, 583-598.

BASKAKOV, I. V.; LEGNAME, G.; BALDWIN, M. A.; PRUSINER, S. B.; COHEN, F. E. (2002). **Pathway complexity of prion protein assembly into amyloid.** *J Biol Chem*, **277**, 21140-21148.

BAURES, P. W.; OZA, V. B.; PETERSON, S. A.; KELLY, J. W. (1999). **Synthesis and evaluation of inhibitors of transthyretin amyloid formation based on the non-steroidal anti-inflammatory drug, flufenamic acid.** *Bioorg Med Chem*, **7**, 1339-1347.

BAURES, P. W.; PETERSON, S. A.; KELLY, J. W. (1998). **Discovering transthyretin amyloid fibril inhibitors by limited screening.** *Bioorg Med Chem*, **6**, 1389-1401.

BENCE, N. F.; SAMPAT, R. M.; KOPITO, R. R. (2001). **Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation.** *Science*, **292**, 1552-1555.

BENSON, M. D.; WALLACE, M. R. (1989). **Genetic amyloidosis: recent advances.** *Adv Nephrol Necker Hosp*, **18**, 129-137.

BERSON, J. F.; THEOS, A. C.; HARPER, D. C.; TENZA, D.; RAPOSO, G.; MARKS, M. S. (2003). **Proprotein convertase cleavage liberates a fibrillogenic fragment of a resident glycoprotein to initiate melanosome biogenesis.** *J Cell Biol*, **161**, 521-533.

BIELER, S.; ESTRADA, L.; LAGOS, R.; BAEZA, M.; CASTILLA, J.; SOTO, C. (2005). **Amyloid formation modulates the biological activity of a bacterial protein.** *J Biol Chem*, **280**, 26880-26885.

BITAN, G.; KIRKITADZE, M. D.; LOMAKIN, A.; VOLLERS, S. S.; BENEDEK, G. B.; TEPLow, D. B. (2003). **Amyloid beta -protein (Abeta) assembly: Abeta 40 and**

Abeta 42 oligomerize through distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 330-335.

BLAKE, C. C.; GEISOW, M. J.; OATLEY, S. J.; RÉRAT, B.; RÉRAT, C. (1978). **Structure of prealbumin: secondary, tertiary and quaternary interactions determined by Fourier refinement at 1.8 Å.** *J Mol Biol*, **121**, 339-356.

BLAKE, C. C.; GEISOW, M. J.; SWAN, I. D.; 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 Mol Biol*, **88**, 1-12.

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.

BROCKWELL, D. J.; RADFORD, S. E. (2007). **Intermediates: ubiquitous species on folding energy landscapes?** *Curr Opin Struct Biol*, **17**, 30-37.

BUKAU, B.; HORWICH, A. L. (2002). **The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines.** *Cell*, **92**, 351-366.

BUXBAUM, J. N., TAGOE, C. E. (2000). **The genetics of the amyloidoses.** *Annu Rev Med*, **51**, 543-569.

C

CALAMAI, M.; CHITI, F.; DOBSON, C. M. (2005). **Amyloid fibril formation can proceed from different conformations of a partially unfolded protein.** *Biophys J*, **89**, 4201-4210.

CAUGHEY, B.; LANSBURY, P. T. (2003). **Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders.** *Annu Rev Neurosci*, **26**, 267-298.

CHAPMAN, M. R.; ROBINSON, L. S.; PINKNER, J. S.; ROTH, R.; HEUSER, J.; HAMMAR, M.; NORMARK, S.; HULTGREN, S. J. (2002). **Role of Escherichia coli curli operons in directing amyloid fiber formation.** *Science*, **295**, 851-855.

CHEUNG, M. S.; GARCÍA, A. E.; OMUCHIC, J. N. (2002). **Protein folding mediated by solvation: water expulsion and formation of the hydrophobic core occur after the structural collapse.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 685-690.

CHITI, F.; DOBSON, C. M. (2006). **Protein misfolding, functional amyloid, and human disease.** *Annu Rev Biochem*, **75**, 333-366.

CHITI, F.; DOBSON, C. M. (2009). **Amyloid formation by globular proteins under native conditions.** *Nat Chem Biol*, **5**, 15-22.

CHITI, F.; WEBSTER, P.; TADDEI, N.; CLARK, A.; STEFANI, M.; RAMPONI, G.; DOBSON, C. M. (1999). **Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils.** *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 3590-3594.

CLARK, P. L. (2004). **Protein folding in the cell: reshaping the folding funnel.** *Trends Biochem Sci*, **29**, 527-534.

CLEARY, J. P.; WALSH, D. M.; HOFMEISTER, J. J.; SHANKAR, G. M.; KUSKOWSKI, M. A.; SELKOE, D. J.; ASHE, K. H. (2005). **Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function.** *Nat Neurosci*, **8**, 79-84.

COHEN, A. S.; JONES, L. A. (1991). **Amyloidosis.** *Curr Opin Rheumatol*, **3**, 125-138.

COLLINS, S. R.; DOUGLASS, A.; VALE, R. D.; WEISSMAN, J. S. (2004). **Mechanism of prion propagation: amyloid growth occurs by monomer addition.** *PLoS Biol*, **2**, e321.

COLON, W.; KELLY, J. W. (1992). **Partial denaturation of transthyretin is sufficient for amyloid fibril formation in vitro.** *Biochemistry*, **31**, 8654-8660.

CONNORS, L. H.; LIM, A.; PROKAEVA, T.; ROSKENS, V. A.; COSTELLO, C. E. (2003). **Tabulation of human transthyretin (TTR) variants, 2003.** *Amyloid*, **10**, 160-184.

COSTA, R.; FERREIRA-DA-SILVA, F.; SARAIVA, M. J.; CARDOSO, I. (2008). **Transthyretin protects against A-beta peptide toxicity by proteolytic cleavage of the peptide: a mechanism sensitive to the Kunitz protease inhibitor.** *PLoS ONE*, **3**, e2899.

COSTA, R.; GONÇALVES, A.; SARAIVA, M. J.; CARDOSO, I. (2008). **Transthyretin binding to A-Beta peptide--impact on A-Beta fibrillogenesis and toxicity.** *FEBS Lett*, **582**, 936-942.

CREIGHTON, T. E. (1987). **Protein structure. Stability of alpha-helices.** *Nature*, **326**, 547-548.

CREIGHTON, T. E. (1990). **Protein folding.** *Biochem J*, **270**, 1-16.

D

DAMAS, A. M.; SARAIVA, M. J. (2000). **TTR amyloidosis-structural features leading to protein aggregation and their implications on therapeutic strategies.** *J Struct Biol*, **130**, 290-299.

DICKSON, P. W.; HOWLETT, G. J.; SCHREIBER, G. (1982). **Metabolism of prealbumin in rats and changes induced by acute inflammation.** *Eur J Biochem*, **129**, 289-293.

DINNER, A. R.; SALI, A.; SMITH, L. J.; DOBSON, C. M.; KARPLUS, M. (2000). **Understanding protein folding via free-energy surfaces from theory and experiment.** *Trends Biochem Sci*, **25**, 331-339.

DOBSON, C. M. (1995). **Finding the right fold.** *Nat Struct Biol*, **2**, 513-517.

DOBSON, C. M. (2003). **Protein folding and misfolding.** *Nature*, **426**, 884-890.

DOBSON, C. M. (2004). **Principles of protein folding, misfolding and aggregation.** *Semin Cell Dev Biol*, **15**, 3-16.

E

ELLIS, R. J.; HEMMINGSEN, S. M. (1989). **Molecular chaperones: proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures.** *Trends Biochem Sci*, **14**, 339-342.

ELLIS, R. J.; VAN DER VIES, S. M.; HEMMINGSEN, S. M. (1989). **The molecular chaperone concept.** *Biochem Soc Symp*, **55**, 145-153.

EPISKOPOU, V.; MAEDA, S.; NISHIGUCHI, S.; SHIMADA, K.; GAITANARIS, G. A.; GOTTESMAN, M. E.; ROBERTSON, E. J. (1993). **Disruption of the transthyretin gene results in mice with depressed levels of plasma retinol and thyroid hormone.** *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**, 2375-2379.

F

FERRÃO-GONZALES, A. D.; SOUTO, S. O.; SILVA, J. L.; FOGUEL, D. (2000). **The preaggregated state of an amyloidogenic protein: hydrostatic pressure converts native transthyretin into the amyloidogenic state.** *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 6445-6450.

FOGUEL, D.; SILVA, J. L. (2004). **New insights into the mechanisms of protein misfolding and aggregation in amyloidogenic diseases derived from pressure studies.** *Biochemistry*, **43**, 11361-11370.

FOGUEL, D.; SUAREZ, M. C.; FERRÃO-GONZALES, A. D.; PORTO, T. C.; PALMIERI, L.; EINSIEDLER, C. M.; ANDRADE, L. R.; LASHUEL, H. A.; LANSBURY, P. T.; KELLY, J. W.; SILVA, J. L. (2003). **Dissociation of amyloid fibrils of alpha-synuclein and transthyretin by pressure reveals their reversible nature and the formation of water-excluded cavities.** *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**, 9831-9836.

FOGUEL, D.; WEBER, G. (1995). **Pressure-induced dissociation and denaturation of allophycocyanin at subzero temperatures.** *J Biol Chem*, **270**, 28759-28766.

FOSS, T. R.; KELKER, M. S.; WISEMAN, R. L.; WILSON, I. A.; KELLY, J. W. (2005). **Kinetic stabilization of the native state by protein engineering: implications for inhibition of transthyretin amyloidogenesis.** *J Mol Biol*, **347**, 841-854.

FOSS, T. R.; WISEMAN, R. L.; KELLY, J. W. (2005). **The pathway by which the tetrameric protein transthyretin dissociates.** *Biochemistry*, **44**, 15525-15533.

FOWLER, D. M.; KOULOV, A. V.; ALORY-JOST, C.; MARKS, M. S.; BALCH, W. E.; KELLY, J. W. (2006). **Functional amyloid formation within mammalian tissue.** *PLoS Biol*, **4**, e6.

FOWLER, D. M.; KOULOV, A. V.; BALCH, W. E.; KELLY, J. W. (2007). **Functional amyloid--from bacteria to humans.** *Trends Biochem Sci*, **32**, 217-224.

G

GAMBETTI, P.; RUSSO, C. (1998). **Human brain amyloidoses.** *Nephrol Dial Transplant*, **13**, 33-40.

GHOSH, M.; MEERTS, I. A.; COOK, A.; BERGMAN, A.; BROUWER, A.; JOHNSON, L. N. (2000). **Structure of human transthyretin complexed with bromophenols: a new mode of binding.** *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **56**, 1085-1095

GIAEVER, G.; CHU, A. M.; NI, L.; CONNELLY, C.; RILES, L.; VÉRONNEAU, S.; DOW, S.; LUCAU-DANILA, A.; ANDERSON, K.; ANDRÉ, B.; ARKIN, A. P.; ASTROMOFF, A.; EL-BAKKOURY, M.; BANGHAM, R.; BENITO, R.; BRACHAT, S.; CAMPANARO, S.; CURTISS, M.; DAVIS, K.; DEUTSCHBAUER, A.; ENTIAN, K.D.; FLAHERTY, P.; FOURY, F.; GARFINKEL, D.J.; GERSTEIN, M.; GOTTE, D.; GÜLDENER, U.; HEGEMANN, J. H.; HEMPEL, S.; HERMAN, Z.; JARAMILLO, D. F.; KELLY, D. E.; KELLY, S. L.; KÖTTER, P.; LABONTE, D.; LAMB, D. C.; LAN, N.; LIANG, H.; LIAO, H.; LIU, L.; LUO, C.; LUSSIER, M.; MAO, R.; MENARD, P.; OOI, S.L.; REVUELTA, J. L.; ROBERTS, C. J.; ROSE, M.; ROSS-MACDONALD, P.; SCHERENS, B.; SCHIMMACK, G.; SHAFER, B.; SHOEMAKER, D. D.; SOOKHAI-MAHADEO, S.; STORMS, R. K.; STRATHERN, J. N.; VALLE, G.; VOET, M.; VOLCKAERT, G.; WANG, C. Y.; WARD, T. R.; WILHELMY, J.; WINZELER, E. A.; YANG, Y.; YEN, G.; YOUNGMAN, E.; YU, K.; BUSSEY, H.; BOEKE, J. D.; SNYDER, M.; PHILIPPSSEN, P.; DAVIS, R. W.; JOHNSTON, M. (2002). **Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome.** *Nature*, **418**, 387-391.

GIUNTA, S.; VALLI, M. B.; GALEAZZI, R.; FATTORETTI, P.; CORDER, E. H.; GALEAZZI, L. (2005). **Transthyretin inhibition of amyloid beta aggregation and toxicity.** *Clin Biochem*, **38**, 1112-1119.

GOSAL, W. S.; MORTEN, I. J.; HEWITT, E. W.; SMITH, D. A.; THOMSON, N. H.; RADFORD, S. E. (2005). **Competing pathways determine fibril morphology in the self-assembly of beta2-microglobulin into amyloid.** *J Mol Biol*, **351**, 850-864.

GSPONER, J.; VENDRUSCOLO, M. (2006). **Theoretical approaches to protein aggregation.** *Protein Pept Lett*, **13**, 287-293.

H

HAMILTON, J. A.; BENSON, M. D. (2001). **Transthyretin: a review from a structural perspective.** *Cell Mol Life Sci*, **58**, 1491-1521.

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 1.7-Å resolution.** *J Biol Chem*, **268**, 2416-2424.

HAMMARSTRÖM, P.; JIANG, X.; HURSHMAN, A. R.; POWERS, E. T.; KELLY, J. W. (2002). **Sequence-dependent denaturation energetics: A major determinant in amyloid disease diversity.** *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 16427-16432.

HAMMARSTRÖM, P.; SCHNEIDER, F.; KELLY, J. W. (2001). **Trans-suppression of misfolding in an amyloid disease.** *Science*, **293**, 2459-2462.

HANES, D.; ZECH, L. A.; MURRELL, J.; BENSON, M. D. (1996). **Metabolism of normal and Met30 transthyretin.** *Adv Food Nutr Res*, **40**, 149-155.

HARDESTY, B.; KRAMER, G. (2001). **Folding of a nascent peptide on the ribosome.** *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **66**, 41-66.

HARPER, J. D.; LANSBURY, P. T. JR. (1997). **Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins.** *Annu Rev Biochem*, **66**, 385-407.

HARTL, F. U.; HAYER-HARTL, M. (2002). **Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein.** *Science*, **295**, 1852-1858.

HOLMGREN, G.; ERICZON, B. G.; GROTH, C. G.; STEEN, L.; SUHR, O.; ANDERSEN, O.; WALLIN, B. G.; SEYMOUR, A.; RICHARDSON, S.; HAWKINS, P. N.; E COLS. (1993). **Clinical improvement and amyloid regression after liver transplantation in hereditary transthyretin amyloidosis.** *Lancet*, **341**, 1113-1116.

HURSHMAN, A. R.; WHITE, J. T.; POWERS, E. T.; KELLY, J. W. (2004). **Transthyretin aggregation under partially denaturing conditions is a downhill polymerization.** *Biochemistry*, **43**, 7365-7381.

I

IRACE, G.; EDELHOCH, H. (1978). **Thyroxine-induced conformational changes in prealbumin.** *Biochemistry*, **17**, 5729-5733.

J

JACKSON, S. E.; FERSHT, A. R. (1991). **Folding of chymotrypsin inhibitor 2. 1. Evidence for a two-state transition.** *Biochemistry*, **30**, 10428-10435.

JACOBSON, D. R.; PAN, T.; KYLE, R. A.; BUXBAUM, J. N. (1997). **Transthyretin ILE20, a new variant associated with late-onset cardiac amyloidosis.** *Hum Mutat*, **9**, 83-85.

JAHN, T. R.; RADFORD, S. E. (2005). **The Yin and Yang of protein folding.** *FEBS J*, **272**, 5962-5970.

JIANG, X.; BUXBAUM, J. N.; KELLY, J. W. (2001). **The V122I cardiomyopathy variant of transthyretin increases the velocity of rate-limiting tetramer dissociation, resulting in accelerated amyloidosis.** *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**, 14943-14948.

JOHNSON, S. M.; CONNELLY, S.; WILSON, I. A.; KELLY, J. W. (2008). **Toward optimization of the linker substructure common to transthyretin amyloidogenesis inhibitors using biochemical and structural studies.** *J Med Chem*, **51**, 6348-6358.

JOHNSON, S. M.; WISEMAN, R. L.; SEKIJIMA, Y.; GREEN, N. S.; ADAMSKI-WERNER, S. L.; KELLY, J. W. (2005). **Native state kinetic stabilization as a strategy to ameliorate protein misfolding diseases: a focus on the transthyretin amyloidoses.** *Acc Chem Res*, **38**, 911-921.

K

KABAT, E. A.; MOORE, D. H.; LANDOW, H. (1942). **An electrophoretic study of the protein components in cerebrospinal fluid and their relationship to the serum proteins.** *J Clin Invest*, **21**, 571-577.

KANDA, Y.; GOODMAN, D. S.; CANFIELD, R. E.; MORGAN, F. J. (1974). **The amino acid sequence of human plasma prealbumin.** *J Biol Chem*, **249**, 6796-6805.

KAY, L. E. (2005). **NMR studies of protein structure and dynamics.** *J Magn Reson*, **173**, 193-207.

KAYED, R.; HEAD, E.; THOMPSON, J. L.; MCINTIRE, T. M.; MILTON, S. C.; COTMAN, C. W.; GLABE, C. G. (2003). **Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis.** *Science*, **300**, 486-489.

KIM, P. S.; BALDWIN, R. L. (1990). **Intermediates in the folding reactions of small proteins.** *Annu Rev Biochem*, **59**, 631-660.

KISILEVSKY, R. (1996). **Anti-amyloid drugs: potential in the treatment of diseases associated with aging.** *Drugs Aging*, **8**, 75-83.

KISILEVSKY, R.; FRASER, P. (1996). **Proteoglycans and amyloid fibrillogenesis.** *Ciba Found Symp*, **199**, 58-67, discussion 68-72, 90-103.

KLABUNDE, T.; PETRASSI, H. M.; OZA, V. B.; RAMAN, P.; KELLY, J. W.; SACCHETTINI, J. C. (2000). **Rational design of potent human transthyretin amyloid disease inhibitors.** *Nat Struct Biol*, **7**, 312-321.

KLUNK, W. E.; JACOB, R. F.; MASON, R. P. (1999). **Quantifying amyloid by congo red spectral shift assay.** *Methods Enzymol*, **309**, 285-305.

KORZHNEV, D. M.; KLOIBER, K.; KANELIS, V.; TUGARINOV, V.; KAY, L. E. (2004). **Probing slow dynamics in high molecular weight proteins by methyl-TROSY NMR spectroscopy: application to a 723-residue enzyme.** *J Am Chem Soc*, **126**, 3964-3973.

KORZHNEV, D. M.; SALVATELLA, X.; VENDRUSCOLO, M.; DI NARDO, A. A.; DAVIDSON, A. R.; DOBSON, C. M.; KAY, L. E. (2004). **Low-populated folding intermediates of Fyn SH3 characterized by relaxation dispersion NMR.** *Nature*, **430**, 586-590.

L

LAI, Y. C.; FEUDEL, U.; GREBOGI, C. (1996). **Scaling behavior of transition to chaos in quasiperiodically driven dynamical systems.** *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics*, **54**, 6070-6073.

LAKOUTSI, G.; BEMPORAD, F.; CALAMAI, M.; TADDEI, N.; DOBSON, C. M.; CHITI, F. (2005). **Evidence for a mechanism of amyloid formation involving molecular reorganisation within native-like precursor aggregates.** *J Mol Biol*, **351**, 910-922.

LAZARIDIS, T.; KARPLUS, M. (1997). **“New view” of protein folding reconciled with the old through multiple unfolding simulations.** *Science*, **278**, 1928-1931.

LEVINTHAL, M.; SCHIFF, J. A. Studies of Sulfate Utilization by Algae. (1968). **Identification of Thiosulfate as a Major Acid-Volatile Product Formed by a Cell-Free Sulfate-Reducing System From Chlorella.** *Plant Physiol*, **43**, 555-562.

LINDORFF-LARSEN, K.; ROGEN, P.; PACI, E.; VENDRUSCOLO, M.; DOBSON, C. M. (2005). **Protein folding and the organization of the protein topology universe.** *Trends Biochem Sci*, **30**, 13-19.

M

- MATOUSCHEK, A.; KELLIS, J. T. JR; SERRANO, L.; FERSHT, A. R. (1990). **Mapping the transition state and pathway of protein folding by protein engineering.** *Nature*, **343**, 601-602.
- MCPARLAND, V. J.; KAD, N. M.; KALVERDA, A. P.; BROWN, A.; KIRWIN-JONES, P.; HUNTER, M. G.; SUNDE, M.; RADFORD, S. E. (2000). **Partially unfolded states of beta(2)-microglobulin and amyloid formation in vitro.** *Biochemistry*, **39**, 8735-8746.
- MILLER, S. R.; SEKIJIMA, Y.; KELLY, J. W. (2004). **Native state stabilization by NSAIDs inhibits transthyretin amyloidogenesis from the most common familial disease variants.** *Lab Invest*, **84**, 545-552.
- MIROY, G. J.; LAI, Z.; LASHUEL, H. A.; PETERSON, S. A.; STRANG, C.; KELLY, J. W. (1996). **Inhibiting transthyretin amyloid fibril formation via protein stabilization.** *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 15051-15056.
- MODLER, A. J.; FABIAN, H.; SOKOLOWSKI, F.; LUTSCH, G.; GAST, K.; DAMASCHUN, G. (2004). **Polymerization of proteins into amyloid protofibrils shares common critical oligomeric states but differs in the mechanisms of their formation.** *Amyloid*, **11**, 215-231.
- MODLER, A. J.; GAST, K.; LUTSCH, G.; DAMASCHUN, G. (2003). **Assembly of amyloid protofibrils via critical oligomers--a novel pathway of amyloid formation.** *J Mol Biol*, **325**, 135-148.
- MONACO, H. L. (2000). **The transthyretin-retinol-binding protein complex.** *Biochim Biophys Acta*, **1482**, 65-72.
- MONACO, H. L.; RIZZI, M.; CODA, A. (1995). **Structure of a complex of two plasma proteins: transthyretin and retinol-binding protein.** *Science*, **268**, 1039-1041.
- MONSELLIER, E.; CHITI, F. (2007). **Prevention of amyloid-like aggregation as a driving force of protein evolution.** *EMBO Rep*, **8**, 737-742.
- MONSELLIER, E.; RAMAZZOTTI, M.; DE LAURETO, P. P.; TARTAGLIA, G. G.; TADDEI, N.; FONTANA, A.; VENDRUSCOLO, M.; CHITI, F. (2007). **The distribution of residues in a polypeptide sequence is a determinant of aggregation optimized by evolution.** *Biophys J*, **93**, 4382-4391.
- MUNAR-QUÉS, M.; SALVA-LADARIA, L.; MULET-PERERA, P.; SOLÉ, M.; LÓPEZ-ANDREU, F. R.; SARAIVA, M. J. (2000). **Vitreous amyloidosis after liver transplantation in patients with familial amyloid polyneuropathy: ocular synthesis of mutant transthyretin.** *Amyloid*, **7**, 266-269.

N

NEUWEILER, H.; DOOSE, S.; SAUER, M. (2005). **A microscopic view of miniprotein folding: enhanced folding efficiency through formation of an intermediate.** *Proc Natl Acad Sci USA*, **102**, 16650-16655.

O

OPPENHEIMER, J. H. (1968). **Role of plasma proteins in the binding, distribution and metabolism of the thyroid hormones.** *N Engl J Med*, **278**, 1153-1162.

OZA, V. B.; PETRASSI, H. M.; PURKEY, H. E.; KELLY, J. W. (1999). **Synthesis and evaluation of anthranilic acid-based transthyretin amyloid fibril inhibitors.** *Bioorg Med Chem Lett*, **9**, 1-6.

OZA, V. B.; SMITH, C.; RAMAN, P.; KOEPF, E. K.; LASHUEL, H. A.; PETRASSI, H. M.; CHIANG, K. P.; POWERS, E. T.; SACHETTINI, J.; KELLY, J. W. (2002). **Synthesis, structure, and activity of diclofenac analogues as transthyretin amyloid fibril formation inhibitors.** *J Med Chem*, **45**, 321-332.

P

PACE, C. N. (1990). **Measuring and increasing protein stability.** *Trends Biotechnol*, **8**, 93-98.

PALADINI, A. A. JR; WEBER, G. (1981). **Pressure-induced reversible dissociation of enolase.** *Biochemistry*, **20**, 2587-2593.

PALHA, J. A.; BALLINARI, D.; AMBOLDI, N.; CARDOSO, I.; FERNANDES, R.; BELLOTTI, V.; MERLINI, G.; SARAIVA, M. J. (2000). **4'- iodo-4'-deoxydoxorubicin disrupts the fibrillar structure of transthyretin amyloid.** *Am J Pathol*, **156**, 1919-1925.

PALHANO, F. L.; LEME, L. P.; BUSNARDO, R. G.; FOGUEL, D. (2009). **Trapping the Monomer of a Non-amyloidogenic Variant of Transthyretin: exploring its possible use as a therapeutic strategy against transthyretin amyloidogenic diseases.** *J Biol Chem*, **284**, 1443-1453.

PEPYS, M. B.; RADEMACHER, T. W.; AMATAYAKUL-CHANTLER, S.; WILLIAMS, P.; NOBLE, G. E.; HUTCHINSON, W. L.; HAWKINS, P. N.; NELSON, S. R.; GALLIMORE, J. R.; HERBERT, J. E COLS. (1994). **Human serum amyloid P component is an invariant constituent of amyloid deposits and has a uniquely homogeneous glycostructure.** *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 5602-5606.

PETERSON, P. A. (1971). **Studies on the interaction between prealbumin, retinol-binding protein, and vitamin A.** *J Biol Chem*, **246**, 44-49.

R

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**, 2817-2822.

RICHARDSON, S. J.; ALDRED, A. R.; LENG, S. L.; RENFREE, M. B.; HULBERT, A. J.; SCHREIBER, G. (2002). **Developmental profile of thyroid hormone distributor proteins in a marsupial, the tammar wallaby *Macropus eugenii*.** *Gen Comp Endocrinol*, **125**, 92-103.

ROBBINS, J. (2000). **Editorial: new ideas in thyroxine-binding globulin biology.** *J Clin Endocrinol Metab*, **85**, 3994-3995.

ROBBINS, J.; RALL, J. E.; PETERMANN, M. L. (1957). **Thyroxine-binding by serum and urine proteins in nephrosis; qualitative aspects.** *J Clin Invest*, **36**, 1333-1342.

RODER, H.; COLÓN, W. (1997). **Kinetic role of early intermediates in protein folding.** *Curr Opin Struct Biol*, **7**, 15-28.

S

SÁNCHEZ, I. E.; KIEFHABER, T. (2003). **Hammond behavior versus ground state effects in protein folding: evidence for narrow free energy barriers and residual structure in unfolded states.** *J Mol Biol*, **327**, 867-884.

SARAIVA, M. J. (2001). **Transthyretin amyloidosis: a tale of weak interactions.** *FEBS Lett*, **498**, 201-203.

SARAIVA, M. J. (2001). **Transthyretin mutations in hyperthyroxinemia and amyloid diseases.** *Hum Mutat*, **17**, 493-503.

SARAIVA, M. J. (2002). **Hereditary transthyretin amyloidosis: molecular basis and therapeutical strategies.** *Expert Rev Mol Med*, **4**, 1-11.

SCHEIBEL, T. (2004). **Amyloid formation of a yeast prion determinant.** *J Mol Neurosci*, **23**, 13-22.

SCHONENBERGER, M.; SCHULTZE, H. E.; SCHWICK, G. (1956). **A prealbumin of human serum.** *Biochem Z*, **328**, 267-284.

- SCHREIBER, G.; ALDRED, A. R.; JAWOROWSKI, A.; NILSSON, C.; ACHEN, M. G.; SEGAL, M. B. (1990). **Thyroxine transport from blood to brain via transthyretin synthesis in choroid plexus.** *Am J Physiol*, **258**, 338-345.
- SCHREIBER, G.; RICHARDSON, S. J. (1997). **The evolution of gene expression, structure and function of transthyretin.** *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **116**, 137-160.
- SCHULER, B. (2005). **Single-molecule fluorescence spectroscopy of protein folding.** *Chemphyschem*, **6**, 1206-1220.
- SEKIJIMA, Y.; HAMMARSTRÖM, P.; MATSUMURA, M.; SHIMIZU, Y.; IWATA, M.; TOKUDA, T.; IKEDA, S.; KELLY, J. W. (2003). **Energetic characteristics of the new transthyretin variant A25T may explain its atypical central nervous system pathology.** *Lab Invest*, **83**, 409-417.
- SELKOE, D. J. (2003). **Folding proteins in fatal ways.** *Nature*, **426**, 900-904.
- SHIRAHAMA, T.; SKINNER, M.; WESTERMARK, P.; RUBINOW, A.; COHEN, A. S.; BRUN, A.; KEMPER, T. L. (1982). **Senile cerebral amyloid. Prealbumin as a common constituent in the neuritic plaque, in the neurofibrillary tangle, and in the microangiopathic lesion.** *Am J Pathol*, **107**, 41-50.
- SIPLE, J. D. (1994). **Amyloidosis.** *Crit Rev Clin Lab Sci*, **31**, 325-354.
- SKINNER, M.; LEWIS, W. D.; JONES, L. A.; KASIRSKY, J.; KANE, K.; JU, S. T.; JENKINS, R.; FALK, R. H.; SIMMS, R. W.; COHEN, A. S. (1994). **Liver transplantation as a treatment for familial amyloidotic polyneuropathy.** *Ann Intern Med*, **120**, 133-134.
- SMITH, T. M.; HAZELTON, N.; PETEANU, L. A.; WILDEMAN, J. (2006). **Electrofluorescence of MEH-PPV and its oligomers: evidence for field-induced fluorescence quenching of single chains.** *J Phys Chem B*, **110**, 7732-7742.
- SOUSA, M. M.; BERGLUND, L.; SARAIVA, M. J. (2000). **Transthyretin in high density lipoproteins: association with apolipoprotein A-I.** *J Lipid Res*, **41**, 58-65.
- STOCKIGT, J. R. (2001). **Free thyroid hormone measurement. A critical appraisal.** *Endocrinol Metab Clin North Am*, **30**, 265-289.
- SUNDE, M.; BLAKE, C. (1997). **The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction.** *Adv Protein Chem*, **50**, 123-159.
- SUNDE, M.; SERPELL, L. C.; BARTLAM, M.; FRASER, P. E.; PEPYS, M. B.; BLAKE, C. C. (1997). **Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction.** *J Mol Biol*, **273**, 729-739.

- TAN, S. Y.; PEPYS, M. B. (1994). **Amyloidosis**. *Histopathology*, **25**, 403-414.
- TANFORD, C. (1968). **Protein denaturation**. *Adv Protein Chem*, **23**, 121-282.
- TANFORD, C. (1970). **Protein denaturation. Theoretical models for the mechanism of denaturation**. *Adv Protein Chem*, **24**, 1-95.
- TAYLOR, B. M.; SARVER, R. W.; FICI, G.; POORMAN, R. A.; LUTZKE, B. S.; MOLINARI, A.; KAWABE, T.; KAPPENMAN, K.; BUHL, A. E.; EPPS, D. E. (2003). **Spontaneous aggregation and cytotoxicity of the beta-amyloid Abeta1-40: a kinetic model**. *J Protein Chem*, **22**, 31-40.
- TEILUM, K.; KRAGELUND, B. B.; POULSEN, F. M. (2002). **Transient structure formation in unfolded acyl-coenzyme A-binding protein observed by site-directed spin labelling**. *J Mol Biol*, **324**, 349-357.
- TEILUM, K.; MAKI, K.; KRAGELUND, B. B.; POULSEN, F. M.; RODER, H. (2002). **Early kinetic intermediate in the folding of acyl-CoA binding protein detected by fluorescence labeling and ultrarapid mixing**. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 9807-9812.
- TEIN, T. D.; ANDERS, N. J.; DECARLI, C.; CHAN, S. L.; MATTSON, M. P.; JOHNSON, J. A. (2004). **Neutralization of transthyretin reverses the neuroprotective effects of secreted amyloid precursor protein (APP) in APPSW mice resulting in tau phosphorylation and loss of hippocampal neurons: support for the amyloid hypothesis**. *J Neurosci*, **24**, 7707-7717.
- TERRY, C. J.; DAMAS, A. M.; OLIVEIRA, P.; SARAIVA, M. J.; ALVES, I. L.; COSTA, P. P.; MATIAS, P. M.; SAKAKI, Y.; BLAKE, C. C. (1993). **Structure of Met30 variant of transthyretin and its amyloidogenic implications**. *EMBO J*, **12**, 735-741.
- TRUE, H. L.; BERLIN, I.; LINDQUIST, S. L. (2004). **Epigenetic regulation of translation reveals hidden genetic variation to produce complex traits**. *Nature*, **431**, 184-187.

V

- VAHLQUIST, A. (1972). **Metabolism of the vitamin-A-transporting protein complex: turnover of retinol-binding protein, prealbumin and vitamin A in a primate (Macaca Irus)**. *Scand J Clin Lab Invest*, **30**, 349-360.

W

- WEBER, G. (1987). **Abrupt transitions in physics and biophysics: van der Waals revisited**. *Proc Natl Acad Sci USA*, **84**, 7359-7362.

WEBER, G.; BHIDE, S. V.; MANWARING, S. S. (1964). **An in vitro system for studying hormonal induction of hepatic gluconeogenic enzymes.** *Biochem Biophys Res Commun*, **16**, 167-173.

WESTERMARK, P. (2005). **Aspects on human amyloid forms and their fibril polypeptides.** *FEBS J*, **272**, 5942-5949.

WESTERMARK, P.; BERGSTRÖM, J.; SOLOMON, A.; MURPHY, C.; SLETTEN, K. (2003). **Transthyretin-derived senile systemic amyloidosis: clinicopathologic and structural considerations.** *Amyloid*, **10**, 48-54.

WESTERMARK, P.; SLETTEN, K.; JOHANSSON, B.; CORNWELL, G. G. 3RD. (1990). **Fibril in senile systemic amyloidosis is derived from normal transthyretin.** *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**, 2843-2845.

Y

YAMAMOTO, S.; WILCZEK, H. E.; NOWAK, G.; LARSSON, M.; OKSANEN, A.; IWATA, T.; GJERTSEN, H.; SÖDERDAHL, G.; WIKSTRÖM, L.; ANDO, Y.; SUHR, O. B.; ERICZON, B. G. (2007). **Liver transplantation for familial amyloidotic polyneuropathy (FAP): a single-center experience over 16 years.** *Am J Transplant*, **7**, 2597-2604.

Z

ZARRINE-AFSAR, A.; WALLIN, S.; NECULAI, A. M.; NEUDECKER, P.; HOWELL, P. L.; DAVIDSON, A. R.; CHAN, H. S. (2008). **Theoretical and experimental demonstration of the importance of specific nonnative interactions in protein folding.** *Proc Natl Acad Sci USA*, **105**, 9999-10004

Ricardo Sant'Anna de Oliveira

Curriculum Vitae

Dados Pessoais

Nome Ricardo Sant'Anna de Oliveira
Filiação Jacy de Oliveira e Wanda Lúcia Sant'Anna
Nascimento 15/05/1981 - Rio de Janeiro/RJ - Brasil
Carteira de Identidade 125491266 IFP - RJ - 01/10/1994
CPF 09152745740

Formação Acadêmica/Titulação

1998 - 2002 Graduação em ciencias biologicas.
Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ, Rio De Janeiro, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Vínculo institucional

2007 - Atual Vínculo: aluno de mestrado , Enquadramento funcional: aluno mestrado.

Produção em C, T& A

Produção bibliográfica Apresentação de Trabalho

1. Sant'Anna., R., O., BRAGA, C. A. A., ALVES, A.
SMALL MOLECULES AS TRANSTHYRETIN AGGREGATION INHIBITORS, 2008.
(Congresso,Apresentação de Trabalho)

Orientações e Supervisões

Iniciação científica

1. Rogério Alves Varella. **Mecanismos de inibição da agregação da Transtirretina**. 2008.
Iniciação científica (Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro

Orientações e Supervisões em andamento

Iniciação científica

1. Aline Araújo Alves. **Estudo estrutural do peptídeo 26-57 da proteína Transtirretina**. 2008.
Iniciação científica (Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)