



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Bruna Raquel Martins Coutinho

**AUTO-FLUORESCÊNCIA EM PROCESSOS DE
AGREGAÇÃO DE PÉPTIDOS E PROTEÍNAS:
BETA-AMILÓIDE NA PRESENÇA DE IÕES
METÁLICOS E LISOZIMA SOB CONDIÇÕES
PROMOTORAS DE AGREGAÇÃO**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Medicinal
orientada pelo Professor Doutor Carlos Alberto Lourenço de Serpa
Soares e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade
de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2022

Bruna Raquel Martins Coutinho

**AUTO-FLUORESCÊNCIA EM PROCESSOS DE AGREGAÇÃO DE
PÉPTIDOS E PROTEÍNAS: BETA-AMILÓIDE NA PRESENÇA DE
IÕES METÁLICOS E LISOZIMA SOB CONDIÇÕES
PROMOTORAS DE AGREGAÇÃO**

**Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química
Medicinal**

Orientador Professor Doutor Carlos Serpa

Setembro de 2022

Universidade de Coimbra

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu orientador, Professor Doutor Carlos Serpa, por toda a ajuda, paciência, motivação, partilha de conhecimentos e tempo disponibilizado ao longo deste ano. Agradecer também pela compreensão e preocupação ao longo das circunstâncias da minha vida.

Agradecer também à Professora Telma Costa e Professora Doutora Ana Piedade pelo tempo e acompanhamento disponibilizado relativamente às experiências de FLIM e AFM, respetivamente.

Gostaria de agradecer também à minha colega Daniela Amado por todo o acompanhamento, pela ajuda na parte laboratorial e por se disponibilizar sempre que precisei de ajuda. Por todas as horas disponibilizadas para me orientar e colaborar nas experiências mais longas.

Às amigas que Coimbra formou, um muito obrigada por estes cinco anos, especialmente à Ana Duarte, Anita, Beatriz, Daniela e Marla, por sempre estarem presentes e sempre ajudarem em tudo, e também à minha afilhada Bruna, Maria e Rita, em conjunto com todos os outros que me fizeram sentir em casa nesta cidade, sem vocês não teria sido a mesma coisa. Às que permaneceram sempre comigo, um obrigado muito especial à Francisca, por todo o apoio, por todas as vezes que me conseguiu abrir os olhos, por todas as vezes que me fez ver sempre o lado positivo e por toda a confiança depositada em mim, um muito obrigada por tudo. Agradecer também às minhas amigas Micaela e Marta, por este ano, estarem sempre comigo e me motivarem ao longo de todo o processo.

Agradeço à minha família, aos meus pais, que me permitiram chegar até aqui, que me ajudaram e apoiaram em todos os momentos e acreditaram em mim. Por nunca me dizerem que ‘não’ relativamente aos estudos, por sempre me motivarem a ir mais longe e por, mesmo nos momentos mais difíceis, saberem lidar comigo. Um especial obrigada à minha irmã Gabriela por me ouvir e me acompanhar em tudo o que consegui. À minha avó, que apesar de já não se encontrar entre nós, foi um grande pilar tanta para a família como para mim e, certamente, estará a celebrar mais esta conquista na minha vida.

Finalmente, quero agradecer ao meu namorado Pedro por todo o apoio prestado, pela admiração, pela paciência e por sempre me incentivar a mais e melhor.

Índice

Índice de Figuras	v
Índice de Tabelas.....	ix
Lista de abreviaturas	x
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiv
Capítulo 1 - Introdução	1
1.1 Agregação de proteínas.....	1
1.2 Mecanismo de agregação de proteínas	3
1.2.1 Nucleação-alongamento e polimerização	4
1.2.2 Automontagem da proteína monomérica.....	7
1.2.3 Proteína monomérica conformacionalmente alterada induz agregação	8
1.2.4 Agregação de péptidos/proteínas induzida por superfície	8
1.2.5 Papel da membrana na agregação de proteínas.....	9
1.3 Fatores envolvidos na agregação de proteínas	10
1.4 Péptido β -amilóide	11
1.4.1 Mecanismo de agregação do péptido β -amilóide.....	12
1.4.2 Influência dos íons metálicos na agregação do péptido $A\beta$	14
1.5 Métodos para caracterização de péptidos/proteínas.....	15
1.5.1 Fluorescência	20
1.5.2 Microscopia de força atômica (AFM)	21
1.5.3 Microscopia de tempos de vida de fluorescência (FLIM)	23
1.6 Lisozima.....	26
Capítulo 2 - Materiais e métodos.....	30
2.1 Materiais.....	30
2.2 Péptido $A\beta$	30

2.1.1	Preparação das soluções do péptido A β e iões metálicos.....	30
2.1.2	Fluorescência	30
2.1.3	Microscopia de força atómica (AFM)	30
2.2	Agregação da lisozima	31
2.2.1	Fluorescência	31
2.3	Microscopia de tempos de vida de fluorescência (FLIM).....	31
Capítulo 3 - Resultados e Discussão		34
3.1	Péptido A β e iões metálicos	34
3.1.1	Fluorescência	36
3.1.1.1	Zinco	36
3.1.1.2	Cobre	38
3.1.1.3	Ferro	41
3.1.2	Microscopia de tempos de vida de fluorescência (FLIM)	43
3.1.2.1	Zinco	43
3.1.2.2	Cobre	45
3.1.2.3	Ferro	46
3.1.3	Microscopia de força atómica (AFM)	47
3.1.3.1	Zinco	48
3.1.3.2	Cobre	49
3.1.3.3	Ferro	51
3.1.4	Fluorescência, FLIM e AFM	54
3.3	Lisozima.....	58
3.3.1	Fluorescência	59
3.3.2	Microscopia de tempos de vida de fluorescência (FLIM)	63
3.3.2.1	Glicina-HCl, pH 2, 60°C.....	63
3.3.2.2	90% Etanol, temperatura ambiente, pH 7.5	63

3.3.2.3 2M ureia, pH 7.5, temperatura ambiente	64
3.3.2.4 200 μ M SDS, Gly-NaOH, temperatura ambiente, pH 9.....	65
3.3.2.5 200 μ M SDS, Gly-HCl, temperatura ambiente, pH 2.2.....	65
3.3.2.6 2 mM DTT, tampão fosfato, pH 7.5, T = 37°C	66
3.3.2.7 10 mM TCEP, tampão HEPES, T = 37°C	67
3.3.3 Fluorescência e FLIM	67
Capítulo 4 - Conclusões e Perspetivas Futuras	73
Capítulo 5 - Referências Bibliográficas	75
Material Suplementar	85

Índice de Figuras

Figura 1. Competição entre dobramento e agregação de proteínas. Adaptado de ³	3
Figura 2. Polimerização por nucleação e alongamento. Retirado de ³	5
Figura 3. Esquema representativo do mecanismo de crescimento nucleado. Inicialmente há uma fase lenta em que a proteína na sua conformação nativa desdobrada (A) forma uma estrutura β (B) que agrega para formar o núcleo (C) e as protofibrilas (D). Seguidamente, na fase de crescimento (fase mais curta) os monómeros e os oligómeros associam-se ao núcleo para formar as fibrilhas maduras na fase plateau (E). Adaptado de ¹	6
Figura 4. Automontagem de uma proteína monomérica. Adaptada de ³	7
Figura 5. Agregação da proteína monomérica alterada conformacionalmente. Adaptado de ³	8
Figura 6. Agregação induzida por superfície. Adaptado de ³	9
Figura 7. Imagem de microscopia de transmissão de fibrilas amilóides longas e não ramificadas. Imagem adaptada de ⁶²	13
Figura 8. Imagem de microscopia de transmissão de agregados desordenados de morfologia amorfa. Imagem retirada de ⁶³	14
Figura 9. Diagrama esquemático do sistema de microscopia de força atômica. Retirado de ⁵⁸	21
Figura 10. Representação esquemática das forças entre a amostra e agulha em função da distância, caracterizando os diferentes modos de trabalho do microscópio de força atômica. Retirada de ⁵⁹	23
Figura 11. Análise de dados FLIM no domínio do tempo. Retirado de ³⁸	25
Figura 12. A) Intensidade de fluorescência de Abeta (25 μm) isolada, após excitação a 360 nm, durante o período de incubação 29,5h. B) Intensidade de fluorescência de Abeta (25 μm) isolada em função do período de incubação.	35
Figura 13. Absorvância do ião zinco em diferentes concentrações na presença de tampão PBS.	35
Figura 14. Absorvância do ião cobre em diferentes concentrações na presença de tampão PBS.	36

Figura 15. Absorvância do íon ferro em diferentes concentrações na presença de tampão PBS.	36
Figura 16A. Intensidade de fluorescência de Abeta (25 μ M) presença de concentrações crescentes de íon zinco ($A\beta(1-42):Zn$ - 1:0; 1:0,5;1:1; 1:5), durante 29h. Excitação a 360 com slit 4 a 430 nm.	37
Figura 16B. Gráfico da dispersão da luz de Abeta (25 μ M) na presença de concentrações crescentes de íon zinco ($A\beta(1-42):Zn$ - 1:0; 1:0,5; 1:1; 1:10), durante 29h. Excitação a 550 nm com slit 1 a 551 nm.	37
Figura 17. Intensidade de fluorescência de Abeta (25 μ M) na presença da menor concentração do íon zinco ($A\beta(1-42):Zn$ - 1:0,5), nos tempo 1h, 15h e 29h. Excitação a 360 nm com slit 4.	37
Figura 18A. Intensidade de fluorescência de Abeta (25 μ M) na presença de concentrações crescentes de íon cobre ($A\beta(1-42):Cu$ - 1:0; 1:0,5; 1:1; 1:5), durante 29h. Excitação a 360 nm com slit 4 a 430 nm.	38
Figura 18B. Dispersão de luz de Abeta (25 μ M) na presença de concentrações crescentes de íon cobre ($A\beta(1-42):Cu$ - 1:0; 1:0,5; 1:1; 1:5), durante 29h. Excitação a 550 nm com slit 1 a 551 nm.	39
Figura 19. Intensidade de fluorescência de Abeta (25 μ M) na presença da menor concentração do íon cobre ($A\beta(1-42):Cu$ - 1:0,5) nos tempos 0h, 15h e 30h. Excitação a 360 nm com slit 4.	40
Figura 20A. Intensidade de fluorescência de Abeta (25 μ M) na presença de concentrações crescentes de íon ferro ($A\beta(1-42):Fe$ - 1:0; 1:0,5; 1:1; 1:5), durante 28h. Excitação a 360 nm com slit 4 a 430 nm.	41
Figura 20B. Dispersão de luz de Abeta (25 μ M) na presença de concentrações crescentes de íon ferro ($A\beta(1-42):Fe$ - 1:0; 1:0,5; 1:1; 1:5), durante 28h. Excitação a 550 nm com slit 1 a 551 nm.	41
Figura 21. Intensidade de fluorescência de Abeta (25 μ M) na presença da menor concentração do íon ferro ($A\beta(1-42):Fe$ - 1:0,5), nos tempo 1h, 14h e 28h. Excitação a 360 nm e emissão com slit 4.	43
Figura 22. Imagem do tempo de vida de fluorescência do péptido $A\beta$ A) na ausência de zinco e na presença de concentrações crescentes do íon ($A\beta:Zn$ – B) 1:0,5; C) 1:1), às 0h.	43

Figura 23. Imagem do tempo de vida de fluorescência do péptido A β A) na ausência de zinco e na presença de concentrações crescentes do ião (A β :Zn – B) 1:0,5; C) 1:1), às 29h.	44
Figura 24. Imagem do tempo de vida de fluorescência do péptido A β A) na ausência de cobre e na presença de concentrações crescentes do ião (A β :Cu – B) 1:0,5; C) 1:1; D) 1;5), às 29h.	45
Figura 25. Imagem do tempo de vida de fluorescência do péptido A β A) na ausência de ferro e na presença de concentrações crescentes do ião (A β :Fe – B) 1:0,5; C) 1:1; D) 1;5), às 29h.	46
Figura 26. Imagens de AFM de A β isolado às A) 0h e B) 30h.	49
Figura 27. Imagens de AFM de A β :Zn na presença da menor concentração de ião (12,5 μ M – A β :Zn (1:0,5)) às A) 0h e B) 30h.	47
Figura 28. Imagens de AFM de A β :Zn na presença equimolar da concentração de ião (25 μ M – A β :Zn (1:1)) às A) 0h e B) 30h.	48
Figura 29. Imagens de AFM de A β :Cu na presença de metade da concentração de ião (12,5 μ M – A β :Cu (1:0,5)) às A) 0h e B) 30h.	49
Figura 30. Imagens de AFM de A β :Cu na presença equimolar da concentração de ião (25 μ M – A β :Cu (1:1)) às A) 0h e B) 30h.	49
Figura 31. Imagens de AFM de A β :Cu na presença de maior concentração de ião (125 μ M – A β :Cu (1:5)) às A) 0h e B) 30h.	50
Figura 32. Imagens de AFM de A β na presença de metade da concentração de ião (12,5 μ M – A β :Fe (1:0,5)) A) às 0h e B) às 30h.	51
Figura 33. Imagens de AFM de A β na presença da mesma concentração de ião (25 μ M – A β :Fe (1:1)) às 30h.	52
Figura 34. Imagens de AFM de A β na presença da maior concentração de ião (125 μ M – A β :Fe (1:5)) às A) 0h e B) 30h.....	53

Figura 35. Espectro de emissão da lisozima a A) pH 2.2, na presença de Gly-HCl a elevada temperatura e B) em 90% de etanol a pH 7.5, ao longo de um período de incubação de 14 dias.	59
Figura 36. Espectro de emissão da lisozima a C) em 2 M de ureia a pH 7.5 e D) em 200 μ M de SDS na presença de Gly-NaOH a pH 9, ao longo de um período de incubação de 14 dias.	59
Figura 37. Espectro de emissão da lisozima a E) em 200 μ M de SDS na presença de Gly-HCl a pH 2.2 e F) 2 mM de DTT, ao longo de um período de incubação de 14 dias.....	60
Figura 38. Espectro de emissão da lisozima 10 mM de TCEP no solvente HEPES a pH 7.5 e 37°C ao longo de um período de incubação de 14 dias.	60
Figura 39. A) Intensidade de fluorescência medida nos espectros de emissão da lisozima ao longo do período de incubação de 14 dias, para os diferentes agregados, a um comprimento de onda de 450 nm. (A) Gly-HCl, pH 2 e 60°C; (B) 90% de etanol a pH 7.5; (C) 2 M de ureia a pH 7.5; (D) 200 μ M de SDS a pH 9; (E) 200 μ M de SDS a pH 2.2 a 37 °C; (F) 2 mM de DTT a pH 2; (G) 10 mM de TCEP a pH 7.5 e a 37°C. B) Intensidade de fluorescência normalizada entre 0 e 1 para os sete protocolos promotores de agregação.	61
Figura 40. Imagens de fluorescência da lisozima na presença de Gly-HCl a pH 2 e temperatura a 60°C nos dias 0, 7 e 14.	62
Figura 41. Imagens de fluorescência da lisozima na presença de 90% de etanol a pH 7.5 e temperatura ambiente nos dias 0, 7 e 14.	63
Figura 42. Imagens de fluorescência da lisozima na presença de 2 M de ureia a pH 7.5 e temperatura ambiente nos dias 0, 7 e 14.	64
Figura 43. Imagens de fluorescência da lisozima na presença de 200 μ M SDS, Glicina-NaOH, temperatura ambiente, pH 9 nos dias 0, 7 e 14.	64
Figura 44. Imagens de fluorescência da lisozima na presença de 200 μ M SDS, Gly-HCl, temperatura ambiente, pH 2.2 nos dias 0, 7 e 14.	65
Figura 45. Imagens de fluorescência da lisozima na presença de 2 mM DTT, tampão fosfato, pH=7.5, T = 37°C nos dias 0, 7 e 14.....	66
Figura 46. Imagens de fluorescência da lisozima na presença de 10 mM TCEP, tampão HEPES, T=37°C dos dias 0 e 14.	66
Figura 47. Estrutura da lisozima mostrando hélice (espiral) e folha (seta). Imagem retirada de ⁷¹	68

Índice de Tabelas

Tabela 1. Doenças humanas que se caracterizam pela presença de fibrilas amilóides e respetiva proteína/péptido constituinte do agregado. Adaptado de ¹	1
Tabela 2. Resumo dos dados obtidos para o ião zinco nas diferentes concentrações para as três técnicas estudadas.	55
Tabela 3. Resumo dos dados obtidos para o ião cobre nas diferentes concentrações para as três técnicas estudadas.	57
Tabela 4. Resumo dos dados obtidos para o ião ferro nas diferentes concentrações para as três técnicas estudadas.	58

Lista de abreviaturas

A β – Beta amilóide

APP - Proteína Precursora de Amilóide

DA – Doença de Alzheimer

DC – Dicroísmo Circular

DLS – Dispersão Dinâmica de Luz

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DTT - Ditioneitol

ELA - Esclerose Lateral Amiotrófica

FLIM – Microscopia de Tempos de vida de Fluorescência

FTIR - Fourier Transform Infrared Radiation

G-CSF – Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos

Gly – Glicina

HCl – Ácido clorídrico

HEWL - Lisozima da clara do ovo de galinha

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IAPP – Polipéptido Amilóide das Ilhotas

IL-1RA - Antagonista do Receptor da Interleucina-1

IRF - Função de resposta do instrumento

MALS – Dispersão de Luz Multi-ângulo

ME – Microscopia Eletrónica

MLE – Estimativa de Máxima Verossimilhança

NaOH – Hidróxido de sódio

nm - Nanómetros

PAF - Polineuropatia Amiloidótica Familiar

PBS - Phosphate Buffered Saline

Phe - Fenilalanina

pI – Ponto isoelétrico

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

ROS - Espécies Reativas de Oxigénio

SDS – Sodium Dodecyl sulfate

SEC - Ressonância de Spin Eletrónico

TCEP – tris(2-carboxyethyl)phosphine

TCSPC - Contagem de Fóton Único Correlacionado no Tempo

TDA – Análise de Dispersão de Taylor

TEM – Microscopia Eletrónica de Transmissão

Trp - Triptofano

Tyr – Tirosina

µM - micrómetros

Resumo

O estudo do mecanismo de formação de agregados proteicos é atualmente alvo de interesse devido à sua frequente relação com doenças neurológicas como o Alzheimer, mas também devido às suas características estruturais e mecânicas relevantes para aplicação em diversas áreas. Devido ao facto da mesma proteína poder dar origem a diferentes tipos de agregados dependendo do meio em que se encontra inserida, é necessário perceber a influência dos vários fatores na formação destes e o seu mecanismo de formação.

Visando estes objetivos, neste trabalho, foi usado um péptido e uma proteína, nomeadamente o péptido β -amilóide (A β), para estudar a formação de agregados proteicos na presença de iões metálicos, e a lisozima da clara do ovo de galinha (HEWL), bem caracterizada na literatura como modelo para o estudo de formação de fibrilas amilóides e agregados amorfos.

Os iões metálicos, nomeadamente zinco, cobre e ferro foram estudados como indutores da agregação *in vitro* sob condições controladas. A formação de agregados foi avaliada laboratorialmente por técnicas de microscopia, em conjunto com espectroscopia de fluorescência que permitiram estudar a estabilidade, cinética, extensão e o tipo de agregados proteicos formados.

Verificou-se a formação de fibrilas de A β com características amilóides na presença de cobre e ferro a 12.5 μ M, tendo sido também verificada a formação de agregados com estrutura amorfa, ao fim de 30h de incubação. Os restantes agregados na presença de zinco, visualizados por microscopia apresentaram morfologia amilóide na ausência deste ião e na maior concentração deste, 125 μ M. No caso da estabilidade das fibrilas por espectroscopia de fluorescência verificou-se a estabilização da estrutura a partir das 23h/24h.

Para a HEWL verificou-se a formação de fibrilas com características amilóides na presença do tampão Glicina-HCl a pH 2 com uma temperatura de 60°C, 2M ureia a pH 7.5 e 200 μ M SDS a pH 9. A formação de fragmentos com características não amilóides verificou-se na presença de 90% etanol a pH 7.5, 2 mM DTT a pH 7.5 e 10 mM TCEP em tampão HEPES.

A partir dos resultados de auto-fluorescência, é possível afirmar que estes permitiram deduzir qual o tipo de agregado, uma vez que na presença de agregados amilóides houve evidência de uma nova banda a aproximadamente 460 nm.

Palavras-chave: Agregação, β -amilóide, auto-fluorescência, lisozima, agregados amorfos, agregados amilóides, íons metálicos

Abstract

The study of the mechanism of formation of protein aggregates is of high interest due to its frequent relationship with neurological diseases such as Alzheimer's, but also due to their structural and mechanical characteristics relevant for application in several areas. Since the same protein can give rise to different types of aggregates, depending on the medium in which it is inserted, it is necessary to perceive the influence of the various factors in the formation of these and their mechanisms of formation.

Envisioning these objectives, in this work, a peptide and a protein, namely the β -amyloid peptide ($A\beta$), was used to study the formation of protein aggregates in the presence of metal ions, and hen egg white lysozyme (HEWL), well characterized in the literature as a model for the study of the formation of amyloid fibrils and amorphous aggregates.

Metal ions, namely zinc, copper and iron, were studied as inducers of aggregation in vitro under controlled conditions. Aggregate formation was evaluated by laboratory microscopy techniques, together with fluorescence spectroscopy, which allowed the study of stability, kinetics, extension and type of protein aggregates formed.

The formation of $A\beta$ fibrils with amyloid characteristics was verified in the presence of copper and iron at 12.5 μ M, and the formation of aggregates with amorphous structure was also verified, after 30h of incubation. The remaining aggregates in the presence of zinc, visualized by microscopy, showed amyloid morphology in the absence of this ion and at its highest concentration, 125 μ M. In the case of fibril stability by fluorescence spectroscopy, the stabilization of the structure was verified from 23h/24h.

For HEWL, the formation of fibrils with amyloid characteristics was verified in the presence of Glycine-HCl buffer at pH 2 with a temperature of 60°C, 2M urea at pH 7.5 and 200 μ M SDS at pH 9. The formation of fragments with non-amyloid characteristics it was found in the presence of 90% ethanol at pH 7.5, 2 mM DTT at pH 7.5 and 10 mM TCEP in HEPES buffer.

From the auto-fluorescence results, it is possible to state that these allowed the deduction of the type of aggregate, since in the presence of amyloid aggregates there was evidence of a new band at approximately 460 nm.

Keywords: Aggregation, β -amyloid, auto-fluorescence, lysozyme, amyloid-aggregate, amorphous-aggregate, metal ions

Capítulo 1 - Introdução

1.1 Agregação de proteínas

Diversas doenças são provocadas pela incapacidade de as proteínas adotarem a sua conformação nativa. Estas patologias (das quais vários exemplos são indicados na Tabela 1) ocorrem como resultado do dobramento incorreto das proteínas (protein misfolding diseases).

Tabela 1. Doenças humanas que se caracterizam pela presença de fibrilas amilóides e respetiva proteína/péptido constituinte do agregado. Adaptado de ¹.

Doenças	Proteína/péptido precursor
Doença de Alzheimer ^a (DA)	Péptido amilóide β (péptido A β)
Doença de Parkinson ^a	α -sinucleína
Demência frontotemporal com parkinsonismo ^a	Tau
Doença de Huntington ^b	Huntingtina com extensão poliglutamina
Esclerose lateral amiotrófica ^a (ELA)	Superóxido dismutase I
Diabetes tipo II ^a	Polipéptido amilóide dos ilhéus pancreáticos
Amiloidose da lisozima ^b	Mutantes da lisozima
Polineuropatia amiloidótica familiar ^b (PAF)	Mutantes da transtirretina

^adoença predominantemente esporádica; ^bdoença predominantemente hereditária

O enrolamento incorreto e a agregação de proteínas estão associados a um grupo de doenças, conhecido como amiloidoses.

Dependendo da sua origem, as amiloidoses podem ser classificadas em esporádicas, como a maioria dos casos de Parkinson e Alzheimer; hereditárias (estão associadas a mutações específicas), por exemplo as amiloidoses do fibrinogénio e da lisozima; e transmissíveis, tais como as encefalopatias espongiiformes.

Acredita-se que a formação de amilóides seja uma propriedade intrínseca de uma cadeia polipeptídica em geral. Na amiloidose, os agregados fibrilares são depositados nos

tecidos como inclusões intracelulares ou placas extracelulares (amilóide). Quando essa deposição proteica ocorre na célula neuronal, ela inicia a degeneração dos neurónios e, conseqüentemente, resulta na manifestação de várias doenças neurodegenerativas.^{1,3} As amiloidoses são doenças que se caracterizam pela conversão dos péptidos ou proteínas, no estado solúvel, em agregados fibrilares que contêm estrutura em folha- β pregueada e são insolúveis.

O dobramento das proteínas é o processo através do qual a cadeia polipeptídica na seqüência primária dobra, passando a constituir a estrutura terciária funcional. A informação necessária para este processo está contida na seqüência de aminoácidos. O ambiente em que a proteína se encontra também influencia o dobramento. Durante o processo de dobramento da proteína, ocorre a formação de vários intermediários e é a partir destes estados conformacionais que pode ocorrer a formação amilóide, competindo assim com a dobragem normal das proteínas. Assim, não se trata de um estado totalmente desdoblado ou de uma conformação nativa, mas sim de um estado parcialmente desdoblado (contendo estrutura secundária), que tende a agregar.¹

Os agregados de proteínas podem ser geralmente considerados como proteínas insolúveis mal dobradas que perderam as suas formas e funções nativas.²

O enrolar de uma proteína globular representa um processo complexo que envolve uma série de intermediários parcialmente dobrados com conteúdo crescente de uma estrutura ordenada e, eventualmente, dá origem a uma estrutura 3D única, que, para proteínas ordenadas, tipicamente representa uma conformação biologicamente funcional. Para uma cadeia polipeptídica que passa por tal processo de auto-organização, há uma competição entre o enrolar corretamente e o enrolar incorreto/agregação, isto é, adquirir uma conformação funcional totalmente enrolada ou haver formação de agregados (Figura 1).

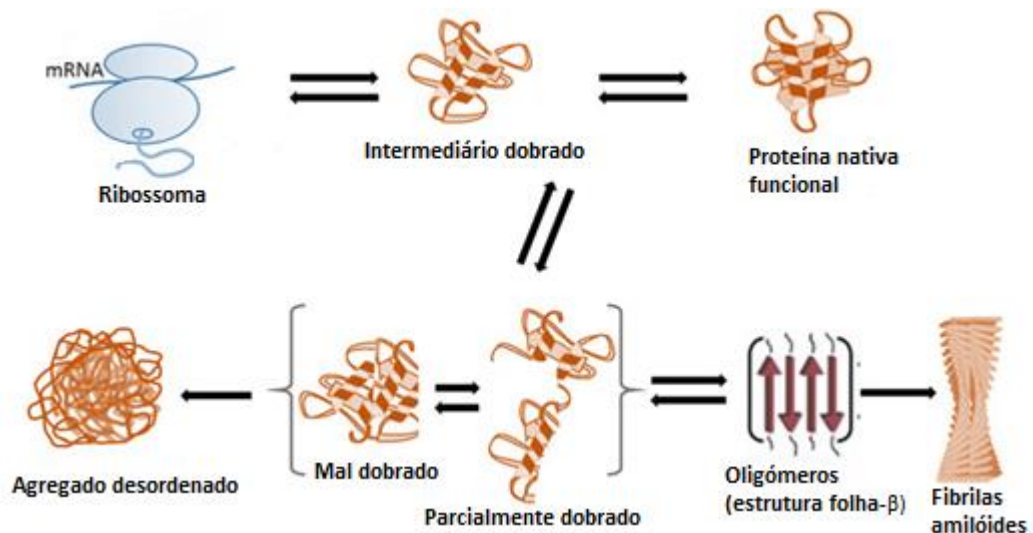


Figura 1. Competição entre dobramento e agregação de proteínas. Adaptado de ³.

O desenrolar de proteínas numa célula pode ocorrer devido a um ambiente celular altamente desfavorável. Para evitar tal acontecimento, as proteínas especializadas conhecidas como chaperonas moleculares são chamadas para auxiliar no enrolamento adequado, na prevenção da formação de agregados, na desagregação e no desenrolar de espécies mal dobradas. No entanto, se a proteína persistir no estado mal dobrado, ela é submetida à degradação proteassómica para manter a homeostase celular. Apesar deste controlo de qualidade da proteína celular bastante eficiente, as proteínas geralmente enrolam-se incorretamente em várias circunstâncias. Por exemplo, pode ser induzida uma ampla variedade de fatores, como mutações dominantes associadas a doenças, mudanças nas condições ambientais (pH, temperatura, força iónica, concentração de proteínas, exposição a toxinas, exposição a iões metálicos de transição, como Zn^{2+} e Cu^{2+}) e modificações pós-traducionais incluindo glicação, fosforilação e sulfatação. Da mesma forma, um aumento na taxa de degradação, transporte incorreto, perda de ligações, interação incorreta entre intermediários e danos oxidativos também podem produzir agregação.

Os intermediários mal dobrados resultantes interagem com tipos semelhantes de intermediários e formam consecutivamente dímeros, oligómeros, protofibrilas e fibrilas (ou permanecem numa forma auto-oligomerizada ou formam agregados amorfos).

1.2 Mecanismo de agregação de proteínas

Na agregação de proteínas, os intermediários dobrados incorretamente interagem com tipos semelhantes de intermediários e consecutivamente formam dímeros, oligómeros, protofibrilas e fibrilas, como referido anteriormente. No entanto, a fibrilação não representa a única via de agregação e algumas proteínas em agregação também podem formar várias estruturas oligoméricas ou podem formar agregados amorfos. Vários mecanismos de agregação de proteínas foram propostos, incluindo polimerização por nucleação-alongamento, a associação reversível de monómeros nativos, agregação de monómeros conformacionalmente alterados e agregação induzida por superfície. Estes diferentes mecanismos de agregação de proteínas podem levar à formação de diversos arranjos de estruturas fibrilares ou polimorfismos. Polimorfismos adicionais também podem surgir quando a mesma cadeia polipeptídica adota estruturas morfologicamente diferentes.

1.2.1 Nucleação-alongamento e polimerização

A formação de fibrilas amilóides geralmente ocorre pela via de oligomerização dependente de nucleação. De um modo geral, um núcleo ordenado é formado somente após uma fase lag numa solução supersaturada que excede uma concentração crítica da proteína amiloidogénica. Após a nucleação, o crescimento da fibrila ocorre rapidamente. Consequentemente, a adição de um núcleo pré-formado a uma solução de proteína supersaturada acelera a fibrilação em comparação com a automontagem espontânea de fibrilas. É importante ressaltar que a nucleação é a etapa limitante da taxa de fibrilação apenas se a concentração de proteína exceder ligeiramente a concentração crítica.⁴⁵

Especificamente, o processo de nucleação-alongamento da fibrilhação proteica é dividido em três etapas consecutivas: fase de latência (lag phase), fase exponencial e fase de saturação. A fase de latência é termodinamicamente desfavorecida, sendo nesta o núcleo formado. O segundo estágio é conhecido como fase exponencial, onde ocorre a polimerização e o crescimento das fibrilas. A terceira fase é descrita como a fase de saturação, em que nenhum alongamento posterior ocorre e onde, essencialmente, todas as espécies solúveis presentes na solução são convertidas a fibrilas maduras através da associação lateral (Figura 2).

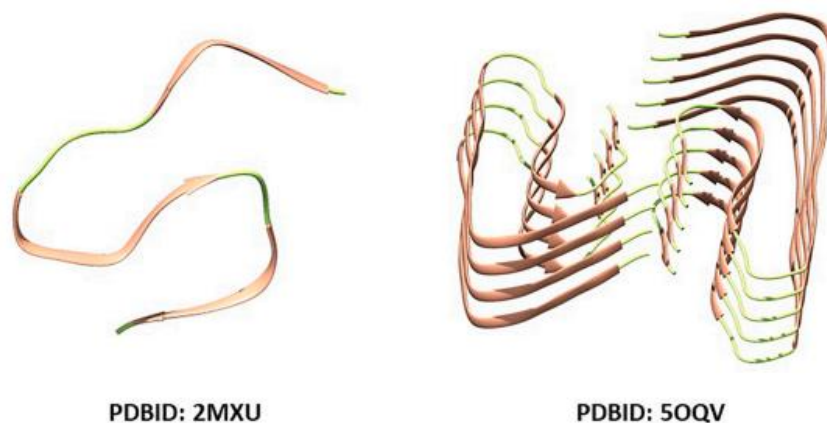


Figura 2. Polimerização por nucleação e alongamento. Retirado de ³.

O tempo de conversão da proteína para a forma fibrilar inclui a fase de latência (lag phase), onde o núcleo é formado, e uma fase de crescimento rápido em que monómeros ou oligómeros se associam ao núcleo (Figura 3), como referido anteriormente.

Inicialmente, ocorrem equilíbrios não favoráveis que fazem com que seja difícil a polimerização. Nesta fase há uma barreira energética que é necessário ultrapassar para iniciar a polimerização (lag phase). Quando a energia livre está no máximo, o crescimento fica termodinamicamente favorecido. Neste ponto está formado o núcleo e começa a reacção de polimerização. Na fase de nucleação a constante de dissociação é maior do que a de associação. Uma vez formado o núcleo, o pico de energia livre faz com que haja inversão do processo e a constante de associação torna-se maior do que a de dissociação. Assim, o núcleo representa o mais pequeno agregado em que a constante de associação é maior do que a constante de dissociação.⁵⁵ A duração da fase lenta (nucleação) pode ser descrita através de uma função t^2 e varia com a inclinação da curva de energia (antes do ponto máximo) e a concentração da proteína vai aumentando com a primeira e diminuindo com a última. Assim, a uma concentração de proteína suficientemente baixa não haverá formação de polímero - concentração crítica.

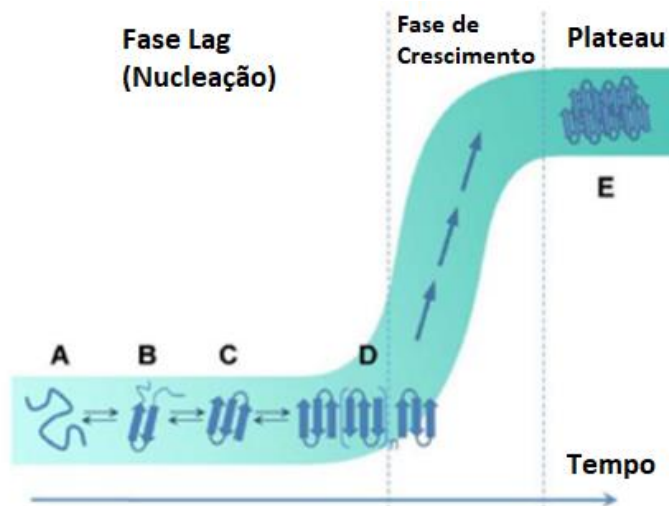


Figura 3. Esquema representativo do mecanismo de crescimento nucleado. Inicialmente há uma fase lenta em que a proteína na sua conformação nativa desdobrada (A) forma uma estrutura β (B) que agrega para formar o núcleo (C) e as protofibrilas (D). Seguidamente, na fase de crescimento (fase mais curta) os monómeros e os oligómeros associam-se ao núcleo para formar as fibrilas maduras na fase plateau (E). Adaptado de ¹.

No entanto, em muitos casos, a cinética da reação de agregação através deste mecanismo é pouco influenciada pela concentração da proteína, o que permite concluir que nestas situações o núcleo é de pequenas dimensões. Para algumas proteínas, pode ocorrer nucleação secundária, isto é, nucleação na superfície de fibrilas já existentes e em impurezas exógenas.

No caso da formação de fibrilhas a partir do péptido A β , é aceite que acima da concentração crítica o péptido forma micelas que vão dar origem ao núcleo. Abaixo da concentração crítica, ocorre nucleação em impurezas exógenas.⁵⁶

A adição de fibrilas pré-formadas (seeding) a uma amostra de proteínas em condições de agregação faz com que a lag phase seja mais curta ou eliminada. Este efeito pode também ser provocado por alteração nas condições experimentais ou pela indução de mutações. Neste caso, a nucleação não é limitante do processo de agregação. Contudo, a ausência da lag phase nem sempre implica que o mecanismo de crescimento do núcleo não está presente, mas apenas que o crescimento das fibras é lento em comparação com o passo de nucleação.⁵⁷

A eficiência de fibrilas pré-formadas para a promoção da agregação (seeding) é dependente da semelhança entre sequências. Deste modo, a baixa semelhança na sequência pode ser importante na proteção das proteínas contra a agregação.

Este mecanismo de polimerização por nucleação-alongamento foi observado para $A\beta$, α -sinucleína, precursor do polipeptídeo de amilóide de ilhotas (IAPP, também conhecido como amilina) e agregação do prião.³

1.2.2 Automontagem da proteína monomérica

De acordo com Whitesides, a automontagem trata-se de um processo em que os componentes de um sistema, sejam moléculas, polímeros, partículas coloidais ou partículas macroscópicas, se organizam de forma autónoma em estruturas com padrões ordenados ou funcionais sem intervenção humana.⁶¹

Posto isto, neste tipo de mecanismo, a proteína nativa tem uma tendência inerente de se autoassociar reversivelmente, uma vez que as suas superfícies são auto-complementares por natureza, o que facilita as interações com proteínas monoméricas complementares semelhantes para formar pequenos oligómeros reversíveis. Durante a reação de agregação, estes pequenos oligómeros formam oligómeros maiores com um aumento nas concentrações de proteínas e, ao longo de um período de tempo, podem formar protofibrilas e, finalmente, fibrilas maduras (Figura 4).

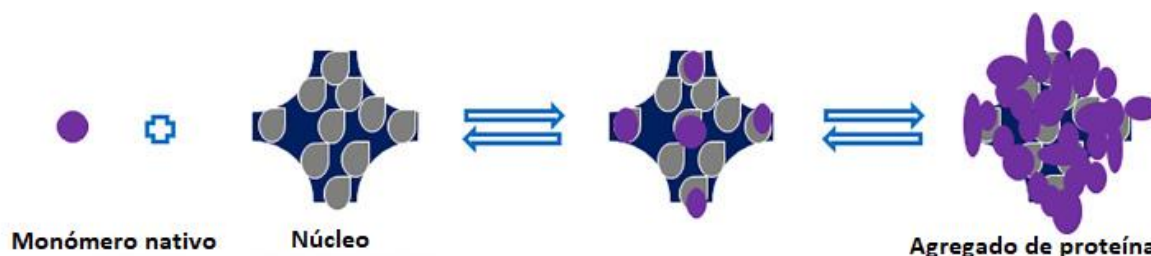


Figura 4. Automontagem de uma proteína monomérica. Adaptada de ³.

Anteriormente, foi proposto que o desenrolar (parcial) da proteína não é a única condição para formar agregados amilóides. Na verdade, foi observado que algumas proteínas monoméricas nativas também são capazes de se associar lado a lado ou de ponta a ponta e, eventualmente, formar agregados amilóides. Por exemplo, a insulina, é uma proteína terapêutica facilmente associada para formar oligómeros reversíveis.⁴⁶ Da mesma forma, o antagonista do receptor de interleucina-1 (IL-1RA) é outro tipo de proteína que mostra dimerização e trimerização reversíveis em altas concentrações de péptido.³

1.2.3 Proteína monomérica conformacionalmente alterada induz agregação

Os monómeros nativos nem sempre apresentam uma tendência elevada de se associarem reversivelmente. Em vez disso, é uma proteína monomérica conformacionalmente alterada ou uma proteína parcialmente desenrolada ou mal enrolada, que tem uma propensão muito maior para formar agregados de proteína do que a proteína globular nativa (Figura 5).

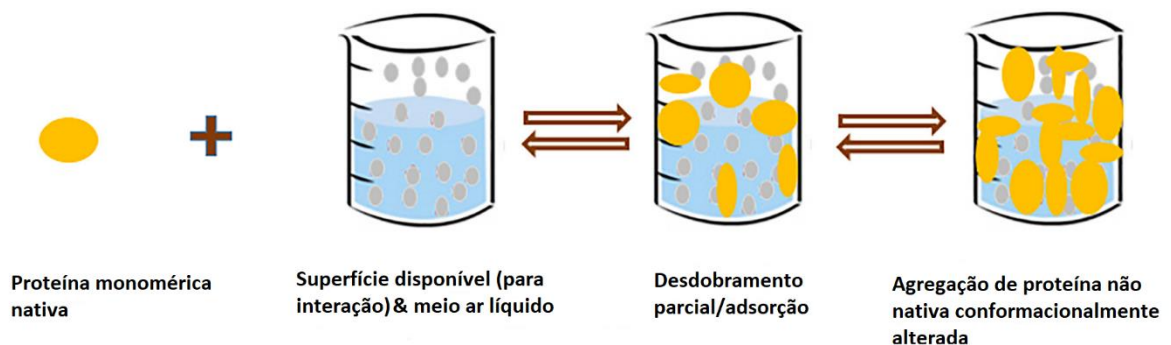


Figura 5. Agregação da proteína monomérica alterada conformacionalmente. Adaptado de ³.

Neste mecanismo, a primeira etapa envolve a desestabilização da estrutura da proteína nativa induzida por stress, que inclui calor, pH, pressão, ou alguns outros fatores ambientais que conseqüentemente induzem a proteína monomérica nativa a adotar uma conformação alterada, que é muito mais suscetível à agregação. O interferão- γ e o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) estão entre os exemplos de proteínas que sofrem amiloidose por meio deste mecanismo.^{47,48,51}

1.2.4 Agregação de péptidos/proteínas induzida por superfície

No mecanismo de agregação induzida por superfície, os monómeros nativos ligam-se à superfície do recipiente, frasco/copo ou interagem com uma interface água-ar. Uma vez que este evento de ligação reversível inicial ocorre, o monómero sofre uma mudança na conformação, o que facilita as interações desta molécula enrolada incorretamente com outros monómeros, formando assim agregados (Figura 6).

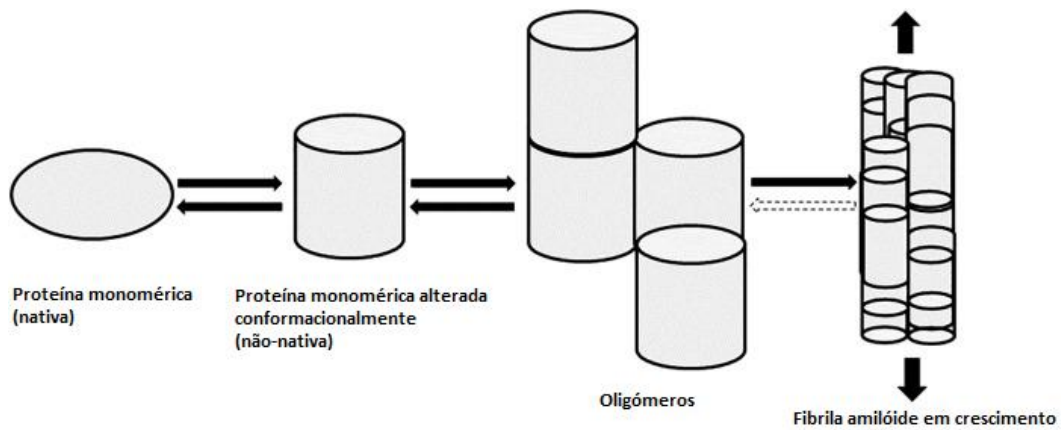


Figura 6. Agregação induzida por superfície. Adaptado de ³.

A agregação também pode ocorrer, uma vez que um monómero alterado é libertado novamente na solução. No entanto, ainda não está claro que tipo de fator extrínseco realmente estimula a agregação induzida por superfície. Recentemente, com recurso à técnica de microscopia de força atômica (AFM), foi mostrado que a agregação realizada deste modo ocorre para uma concentração diluída, para a qual a agregação não ocorre na solução. Por exemplo, foram realizadas experiências com a proteína A β de comprimento total (A β 42), α -sinucleína e um decapeptídeo A β 14-23. O resultado revelou que as proteínas e os fragmentos dos peptídeos mostraram uma preferência pela via de agregação pela superfície em comparação com a agregação na solução em massa.⁴³

1.2.5 Papel da membrana na agregação de proteínas

Estudos têm demonstrado que as membranas também desempenham um papel importante na agregação da proteína amilóide e na ligação da neurotoxicidade que culmina nas doenças neurodegenerativas. Num estudo⁴⁹, foi mostrado que o peptídeo A β inicialmente adota uma estrutura parcialmente enrolada ao se ligar a bicamadas lipídicas zwitteriônicas e esta pode, conseqüentemente, formar agregados amilóides. Da mesma forma⁵⁰, a fibrilhação da α -sinucleína envolve a formação de um intermediário amiloidogénico parcialmente enrolado e tal intermediário também pode ser formado na interação desta proteína com as membranas.

Além disso, foi demonstrado que a curvatura lipídica da membrana desempenha um papel na interação específica da membrana com as proteínas amiloidogénicas. Por

exemplo⁴⁹, em micelas que contêm regiões de alta e baixa curvatura da membrana, o IAPP (polipéptido amilóide das ilhotas), não tóxico, foi preferencialmente ligado às regiões de baixa curvatura, enquanto a forma tóxica desta proteína preferiu a interação com as regiões de alta curvatura. É importante notar que isso levou à modulação da estrutura da bicamada lipídica da membrana. Várias versões tóxicas do péptido IAPP mostraram promover eficientemente a formação da curvatura negativa em bicamadas lipídicas, eventualmente levando à rutura da membrana, enquanto as formas não tóxicas desta proteína não mostraram tal possibilidade.

Da mesma forma, um artigo recente⁵² mostrou que após a ligação à membrana celular, o péptido A β interrompeu a estrutura da membrana e dispersou os componentes lipídicos, que são os constituintes comuns das membranas celulares. Contudo, os mecanismos exatos da rutura da membrana por proteínas amiloidogénicas e péptidos ainda não são totalmente compreendidos, embora vários estudos tenham indicado que os mecanismos potenciais podem incluir a formação de poros oligoméricos transmembranares levando à permeação de iões não específicos, ou a uma dissolução da membrana semelhante a detergente.

Recentemente⁵³, as perceções mecanicistas sobre os papéis das bicamadas patologicamente finas que podem ser facilmente interrompidas durante A β também foram mencionadas. Neste mecanismo, em condições patológicas, os lípidos da membrana podem ser oxidados, o que pode facilitar o enrolar incorreto de A β e a agregação, levando a uma maior rutura da estrutura da membrana. Essas observações sugeriram que vários mecanismos relacionados às interações entre proteínas amiloidogénicas e membranas podem ter implicações na neurotoxicidade e em doenças neurodegenerativas.³

1.3 Fatores envolvidos na agregação de proteínas

A agregação de proteínas pode ser induzida por uma ampla variedade de fatores, incluindo diferentes fatores *in vitro* e *in vivo*. Os fatores ambientais que afetam a agregação de proteínas *in vitro* incluem temperatura, pH, presença de co-solventes, iões metálicos, stress de agitação e surfactantes. Estes fatores podem desenrolar parcialmente a proteína ou aumentar a propensão da proteína a formar intermediários parcialmente enrolados, levando à agregação da proteína. Por outro lado, durante a biossíntese de proteínas *in vivo*,

vários intermediários trabalham para garantir o enrolamento adequado e eficiente da cadeia polipeptídica nascente.

Uma vez que as funções da chaperona são específicas da sequência, alterações ou mutações na cadeia polipeptídica da chaperona podem prevenir ou modular a sua ligação à proteína alvo e, assim, terminar a sua função como auxiliar do enrolamento adequado da proteína. Esta incapacidade leva ao enrolamento parcial, enrolamento incorreto ou enrolamento impróprio e, conseqüentemente, resulta na formação de agregados. Além disso, defeitos na maquinaria de síntese de proteínas (como tradução inadequada, incorporação incorreta de aminoácidos, etc.) também podem levar à produção de agregados.⁵⁴

A distorção de outros fatores relacionados à proteostase normal também podem servir como produtores de agregados. Por exemplo, durante o envelhecimento, a capacidade do proteossoma celular de eliminar proteínas danificadas ou enroladas erradamente é reduzida, levando à acumulação das proteínas e, conseqüentemente, à sua agregação, que poderá ter conseqüências fatais.

1.4 Péptido β -amilóide

As patologias de Alzheimer, Parkinson e diabetes tipo II são algumas das patologias que estão associadas à deposição de fibrilas amilóides, sendo que cada uma destas patologias tem associada uma proteína específica envolvida na formação das fibrilas amilóides.

A Doença de Alzheimer (DA) é a doença neurodegenerativa mais comum, onde a oligomerização e a fibrinogênese dos péptidos A β são consideradas as etapas-chave na patogênese desta doença.⁴

A deposição de agregados de proteínas amilóides insolúveis é a marca patológica da DA. As placas amilóides são constituídas por proteína A β agregada, onde podem ser encontradas em todo o córtex cerebral, sendo que podem induzir neurotoxicidade e perda de sinapses. Também inibem a potenciação neuronal a longo prazo e interrompem a memória e comportamentos complexos de aprendizagem.⁵ A detecção do conteúdo do péptido A β no líquido cefalorraquidiano pode fornecer informações úteis para o diagnóstico desta doença.

O péptido A β é derivado da clivagem proteolítica sequencial pelas secretases β e γ da proteína precursora de amilóide (APP), sendo esta via conhecida pela via amiloidogénica. Este péptido forma agregações nas quais os resíduos de aminoácidos de 1 a 17 estão desordenados e, do resíduo 18 ao último, forma um motivo de folha beta - volta - folha beta. Este motivo é formado por duas folhas- β paralelas, uma formada pelos resíduos 18-26 e outra pelos resíduos 31-42.

A β -amilóide tem o seu N-terminal fora da célula, isto é, 28 aminoácidos da região transmembranar. Por outro lado, a sua extremidade C-terminal está dentro da membrana. Estas extremidades surgem dos respetivos cortes sequenciais feitos pelas enzimas mencionadas acima: β -secretase, que dá origem ao N-terminal e pela γ -secretase, que dá origem ao C-terminal.

Este é um péptido de 4 kDa, que contém 39-42 resíduos de aminoácidos no cérebro e é produzido naturalmente nas formas de A β (1-40) e A β (1-42), sendo que forma preferencialmente estruturas ordenadas em forma de agregados que foram primeiramente purificados e sequenciados em placas amilóides, apresentando estrutura secundária com conformação em folha- β , tendo o mesmo sido verificado por difração por raio-X.^{6,36}

A β 42 é menos abundante em humanos, mas forma fibrilas mais facilmente em comparação com A β 40. A β 42 é o principal fator de formação de placas amilóides, sendo que é extremamente neurotóxico e tem cinética de agregação mais rápida *in vitro*.⁷

1.4.1 Mecanismo de agregação do péptido β -amilóide

Tem sido geralmente reconhecido que a agregação de A β de monómeros para fibrilas amilóides segue em grande parte um modo de crescimento de nucleação. Dependendo da propriedade intrínseca de dobramento incorreto de A β e das condições ambientais externas, a agregação de A β , isto é, a conversão de A β solúvel em fibras insolúveis, produz estruturas com atividade neurotóxica de diferentes tamanhos.⁵⁷

A agregação de A β é um processo de nucleação-alongamento com uma cinética sigmoidal. O processo de agregação amilóide consiste, assim, na fibrilação do péptido A β de espécies monoméricas para fibras, os principais componentes das placas amilóides. Os estados intermediários, correspondentes às espécies oligoméricas, são considerados os

responsáveis pela toxicidade dos neurónios. A via de fibrilação pode ser dividida em 3 fases: *i.* a nucleação onde os núcleos são formados, *ii.* o alongamento correspondente à montagem dos núcleos em protofibrilas passando por espécies intermediárias como o estado oligomérico, e então *iii.* a fase de saturação correspondendo à maturação das fibras e a uma fase de equilíbrio. Todo o processo é caracterizado por um aumento da estrutura secundária de folha- β . De facto, os amilóides são agregados de proteínas de folhas- β cruzadas ordenadas que consistem em fibras dispostas em folhas- β perpendiculares ao eixo da fibra. O processo de agregação envolve interações homotípicas ($A\beta$ - $A\beta$) e heterotípicas ($A\beta$ ligada a outros elementos que interagem no seu ambiente).

A agregação entre a região do núcleo amiloidogénico exibiu um papel crítico na transição conformacional precoce e a seguinte oligomerização em direção à fibrilação $A\beta$.
7,8

Este mecanismo de agregação pode envolver dois tipos de agregados: agregados amilóides/fibrilas amilóides e agregados amorfos.

As fibrilas amilóides são estruturas fibrilares formadas por agregados de proteínas que atingem, normalmente, um comprimento na ordem dos micrómetros, e com diâmetro aproximadamente de 6-12 nanómetros (Figura 7).⁶³

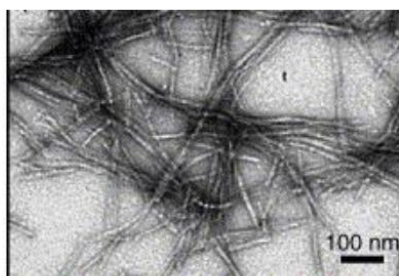


Figura 7. - Imagem de microscopia de transmissão de fibrilas amilóides longas e não ramificadas. Imagem adaptada de ⁶².

As fibrilas amilóides apresentam frequentemente propriedades comuns entre si, apresentando semelhanças na sua estrutura interna e na sua morfologia externa. As técnicas de dicroísmo circular (DC) e Fourier Transform Infrared Radiation (FTIR) permitem inferir sobre a existência de um teor elevado de folha- β na sua constituição mesmo quando o monómero ou proteína têm um estado desordenado ou apresentam maioritariamente α -hélice.⁶⁴ Embora, ainda não tenha sido possível definir a estrutura molecular

pormenorizada de uma fibrila amilóide, com recurso a microscopia eletrónica já foi possível verificar que apresentam uma estrutura longa, linear e não ramificada. Estas fibrilas são constituídas normalmente por dois a seis protofilamentos, em que cada um apresenta um diâmetro de cerca de 2 nanómetros, e, por dados de difração de raio-X, verificou-se a existência de uma estrutura comum em folha- β paralela ao eixo da fibrila, enquanto cada cadeia individual em folha- β encontra-se em configuração perpendicular ao eixo, sendo a distância entre folhas- β de aproximadamente 10 Å.^{63,65}

Contrariamente, os agregados amorfos apresentam uma organização desordenada e uma morfologia pouco definida (Figura 8) e enquanto o modelo de formação cinética maioritariamente aceite para a formação de fibrilas é o dependente da nucleação, no caso da formação dos agregados amorfos a sua cinética encontra-se pouco estudada não se sabendo ainda se a sua formação é dependente da etapa de nucleação.⁶³

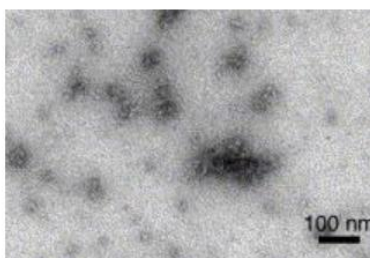


Figura 8. Imagem de microscopia de transmissão de agregados desordenados de morfologia amorfa. Imagem retirada de ⁶².

1.4.2 Influência dos iões metálicos na agregação do péptido A β

Os iões metálicos podem ter um forte impacto em diferentes níveis quando se ligam ao A β . Uma análise através da literatura¹⁵ permite verificar que estes podem induzir a formação de agregados amilóides ou amorfos, influenciar a cinética, a termodinâmica e ter impacto na nucleação e/ou alongamento. Foi demonstrado que as placas amilóides contêm altas concentrações de iões metálicos, principalmente Zn(II) (1 mM), Cu(II) (400 mM) e Fe(III) (1mM), sendo que podem estar envolvidas na formação destas.³⁵ Além disso, várias proteínas relacionadas à DA têm sido implicadas na regulação destes, sendo que está bem estabelecido que o Zn(II) e o Cu(II) afetam significativamente a cinética de agregação de A β *in vitro*.¹⁵

O impacto destes iões na fragmentação ainda não é totalmente conhecido. A maior parte da literatura relata que o Fe (III) pode formar agregados fibrilares muito mais densos quando comparado a A β sozinho. Outra característica diz que o número de agregados parece estar diretamente relacionado à concentração do ião presente na solução (mais iões levam a um aumento no número de agregados), não havendo diferenças observadas no formato das fibrilas. No caso do Cu (II) e Zn (II), quando estes metais são incubados com A β , não se observa nenhum agregado amilóide. Consequentemente, apenas depósitos “amorfos” esféricos ou não fibrilares são encontrados¹⁴. No entanto, estruturas oligoméricas e outras formas ainda podem ser observadas ao longo do processo de agregação. Apesar destes dois metais formarem apenas agregados amorfos, parece que a variação da concentração dos metais em solução tem um impacto diferente na formação dos agregados.^{14,15} O efeito do zinco na toxicidade de A β revela uma clara variabilidade de concentração, com uma promoção da toxicidade em altas concentrações (~mM) e neuroprotecção em baixas concentrações de zinco (<50 μ M).¹⁶

Os iões de cobre e ferro desempenham papéis fundamentais nos processos biológicos em algumas regiões do cérebro. De acordo com a literatura, altas concentrações de Cu(II) e Fe(III) estão co-localizadas dentro das placas amilóides no cérebro e podem estar envolvidas na sua formação.¹⁷ Estes iões metálicos redox-ativos podem-se ligar a A β e podem produzir radicais livres ou espécies reativas de oxigénio (ROS), que são a principal fonte de stress oxidativo. De acordo com um estudo recente, estes ligam-se aos resíduos His13 e His14 dos péptidos A β de tal forma que a força relativa da ligação do ferro aos resíduos acima é maior do que a do cobre e do zinco.¹⁸

Quantidades subequimolares de Cu(II) em relação a A β foram utilizadas para estender a fase lag e, portanto, reduzir a taxa de nucleação, bem como diminuir a taxa de alongamento.¹⁵

1.5 Métodos para caracterização de péptidos/proteínas

É de extrema importância entender as propriedades dos péptidos e os métodos para caracterizar estas moléculas, mas também conhecer e entender os métodos utilizados para caracterizar estas macromoléculas, mormente naquilo que concerne à caracterização

de intermediários e agregados amiloides, uma vez que as falhas nas técnicas podem muitas vezes ser um retrocesso na construção de correlações.

O raio hidrodinâmico ou “tamanho efetivo” dos péptidos é determinado pelo peso molecular e pela auto-associação. Muitas técnicas estão disponíveis para avaliar o tamanho efetivo destes, em parte devido à vasta experiência da indústria com proteínas e péptidos de automontagem, como a insulina. Várias técnicas de dimensionamento de alto rendimento estão bem estabelecidas, incluindo dispersão dinâmica de luz (DLS) - método relativamente rápido que caracteriza o tamanho das biomoléculas em solução, levando apenas alguns minutos para uma medição, em que é usado para distinguir uma amostra monodispersa homogênea de uma amostra agregada - e dispersão de luz multi-ângulo (MALS), que se baseiam no movimento browniano ou em outras propriedades dinâmicas da solução.^{9,11} O coeficiente de difusão medido e a dinâmica de flutuação transmitem informações sobre o raio hidrodinâmico para, em última análise, indicar o peso molecular. Estes métodos são simples, fáceis de usar e podem permitir uma triagem rápida, mas apresentam uma desvantagem significativa na sua suscetibilidade à interferência de outros componentes ativos de UV que podem estar presentes nas soluções de formulação. As técnicas de dispersão de luz também são tendenciosas para moléculas grandes devido à proporcionalidade de resposta da dispersão de luz e, portanto, podem ser menos eficazes na análise de péptidos menores.¹⁰

Uma técnica semelhante baseada num conjunto diferente de princípios físicos é a Análise de Dispersão de Taylor (TDA). Este método é menos propenso à interferência dos componentes da formulação, mas como um método baseado em capilar, pode ser interrompido por obstruções de soluções viscosas ou ligação não específica de péptidos mal formados.¹¹

A cromatografia líquida também é uma abordagem poderosa para a determinação do peso molecular devido à sua capacidade de alto rendimento e adaptabilidade quando usada com colunas ou detetores especializados. Com métodos cromatográficos os solventes ou tampões da fase móvel influenciarão a auto-associação, interrompendo ou promovendo a interação específica da superfície. A cromatografia de exclusão de tamanho (SEC), uma técnica de fase normal, oferece uma avaliação rápida do tamanho e associação/ligação intermolecular.

A avaliação da hidrofobicidade (ou lipofilicidade) é um fator crucial no desenvolvimento de pequenas moléculas e foi efetivamente incorporada à química medicinal e ao design de fármacos para péptidos e proteínas. Os péptidos, no entanto, apresentam considerações únicas. É importante distinguir a hidrofobicidade intrínseca destes para determinado cálculo da frequência de resíduos de aminoácidos e a hidrofobicidade “aparente” dependente do contexto de péptidos que resulta de superfícies expostas e da dinâmica molecular manipulada pelo ambiente da solução. Como qualquer técnica que avalia a hidrofobicidade, isso deve ser levado em consideração na interpretação. As técnicas tradicionais examinam os princípios químicos básicos de “semelhante dissolve semelhante”. Estas técnicas baseadas em partição avaliam a hidrofobicidade dos péptidos com base na migração das moléculas para meios não polares vs. polares no equilíbrio e são expressas como logP para coeficiente de partição (geralmente numa mistura de octanol/água) ou logD para coeficiente de distribuição.¹² Outros métodos comuns para avaliação da hidrofobicidade de péptidos são de natureza cromatográfica e dependem da sondagem da interação entre o péptido e a fase da coluna. Por certo, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) demonstrou correlações com os coeficientes de partição medidos para moléculas pequenas.

Uma outra questão a ter em conta é a carga líquida. A carga peptídica pode influenciar a solubilidade, a interação da matriz extracelular e a compatibilidade da formulação. O ponto isoelétrico (pI), o pH no qual um péptido retém uma carga líquida neutra, pode ser usado para extrapolar a carga líquida da molécula em condições específicas de pH. Esta propriedade normalmente pode ser determinada com base nos valores de pKa dos resíduos individuais, porém métodos empíricos também o permitem. Os métodos computacionais são a opção mais simples e muitas vezes podem ser realizados manualmente ou com software estrutural. A presença de aminoácidos não naturais em grandes porções de conjugação desafiam a precisão de muitos métodos computacionais para determinar o pI ou a carga líquida. As determinações empíricas de carga líquida ou pI são muitas vezes necessárias nos casos em que modificações, conjugações ou resíduos de aminoácidos não codificados não podem ser contabilizados computacionalmente.¹³

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de estado sólido também é uma das técnicas que permite a caracterização de intermediários e agregados amilóides. Esta

determinação estrutural por RMN é baseada nas propriedades magnéticas dos núcleos que constituem os átomos numa molécula ou macromolécula. O processo consiste em colocar átomos com spin diferente de 0 num campo magnético e submeter a radiação na gama das radiofrequências. Os núcleos que dão mais informação são os que têm spin 1/2 (como por exemplo ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F e ^{31}P). Os resultados obtidos a partir desta técnica podem ser utilizados para a determinação de estruturas tridimensionais. Esta técnica é utilizada em sistemas moleculares insolúveis e não cristalinos no estado sólido. É o principal procedimento utilizado para obter informação estrutural de alta resolução das fibrilhas amilóides.⁶⁰

Uma outra técnica, a Cristalografia de raios-X, estuda estruturas atómicas, utilizando padrões de difração de raios-X direcionados a um cristal em que as moléculas existem em unidades repetitivas altamente ordenadas. Permite obter modelos tridimensionais para moléculas ou macromoléculas. O passo crítico deste processo é obter um cristal com grande qualidade de difração, o que muitas vezes é difícil devido à flexibilidade estrutural das macromoléculas. A cristalografia de raios-x tem sido utilizada para a determinação da estrutura de proteínas amiloidogénicas que na sua forma nativa estão dobradas e estáveis.⁶⁰

A partir de Ressonância de Spin Eletrónico (SER) é possível caracterizar estados de energia de um sistema com eletrões desemparelhados a partir da aplicação de um campo magnético externo. Os seus princípios são semelhantes a RMN de estado sólido. No entanto, RMN mede sinais spin de núcleos de átomos, enquanto SER mede spin eletrónico. SER é atualmente aplicada para estudar a estrutura de péptidos e proteínas nomeadamente a orientação molecular e a interação com ligandos.⁶⁰

A Microscopia Electrónica (ME) permite perceber a estrutura e função de organelos e macromoléculas. Revela-se útil no estudo da estrutura e morfologia de entidades moleculares envolvidas na patogénese de doenças de mau dobramento proteico. Permite resolução entre o Angström e as dezenas de nanómetros.⁶⁰

Também é possível recorrer a métodos de espectroscopia ótica para caracterização estrutural e análises biofísicas de proteínas amilóides. São adequados para proteínas *in vitro* em que as condições são mais simples do que as condições *in vivo*. Os dados obtidos são como uma “impressão digital”, sendo possível identificar proteínas amilóides específicas ou estruturas particulares destas proteínas. O Dicroísmo circular (DC) mede a

absorvância diferencial entre duas rotações da luz circularmente polarizada por um centro quiral. O espectro entre 180-250 nm de péptidos e proteínas reflete a estrutura secundária. O espectro entre 250-350 nm dá conta da contribuição das cadeias aromáticas laterais e pontes dissulfureto e informação acerca da estrutura polipeptídica terciária. A agregação de proteínas em protofibrilas e fibrilas é acompanhada pela formação de estruturas β . Esta transformação pode ser acompanhada pela absorção entre 215-218 nm. Assim, este tipo de espectroscopia pode ser utilizada para caracterizar as espécies amilóides, bem como obter informações acerca da cinética de transição para o estado agregado.⁶⁰ Já a espectroscopia de infravermelho é uma técnica complementar ao DC, sendo capaz de fornecer dados quantitativos dos elementos que constituem a estrutura secundária. A banda de absorção forte entre 1600-1700 cm^{-1} é identificativa da vibração da ligação C=O na cadeia polipeptídica. A vibração das ligações C-N e N-H dá origem a bandas 1550 cm^{-1} e 1250 cm^{-1} , respectivamente. Para identificação de regiões da proteína amiloidogénica as bandas de interesse são 1626 cm^{-1} e 1632 cm^{-1} para estrutura β paralela e 1690 cm^{-1} para estrutura β antiparalela. A estrutura de α -hélice tem três bandas a 1654 cm^{-1} , 1644 cm^{-1} e 1662 cm^{-1} .⁶¹ Também a fluorescência de resíduos aromáticos, tais como triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe), pode ser utilizada para estudar o dobramento proteico. O Trp tem maior rendimento quântico e a sua emissão é altamente sensível ao ambiente molecular. Assim é o resíduo que nos pode dar mais informação. A Tyr tem emissão mais fraca do que Trp, no entanto pode ser útil devido à sua abundância relativa na natureza. A Phe é o fluoróforo mais fraco entre os três e a sua fluorescência apenas é observada quando não estão presentes Trp e Tyr.⁶⁰

Os métodos de coloração, como as sondas de tioflavina T e vermelho do congo, têm a capacidade de se ligar às fibrilas amilóides produzindo alterações espectrais características. O vermelho do congo colora os agregados amilóides de vermelho como resultado da alteração do máximo de absorção de 490 para 540 nm. A tioflavina T quando não ligada absorve a 342 nm e emite a 430 nm. Quando ligada a agregados amilóides estes valores alteram-se para 444 e 482 nm, respectivamente.⁶⁰ Ambos os métodos poderão ser aplicados a qualquer proteína capaz de formar amilóides. Contudo, a otimização da concentração da proteína, o volume da amostra e/ou tempo de incubação é uma etapa crítica para garantir a alta sensibilidade e as boas relações sinal-ruído. Todavia, tudo dependerá da propensão de agregação da proteína ou péptido em estudo.⁷⁵

Especificamente, a agregação de A β pode ser detetada a partir de espectroscopia de fluorescência e, além disso, com o uso da microscopia de força atômica (AFM), é possível visualizar agregados (oligómeros, fibrilas e agregados amorfos), quanto à sua morfologia.¹⁴

1.5.1 Fluorescência

Processos uni ou bimoleculares são os responsáveis pelos diversos processos fotofísicos que podem ser observados num sistema. Entre eles, o processo radiativo da fluorescência apresenta diversas aplicações científicas e tecnológicas. Quando gerados por processos unimoleculares, os cromóforos influenciados pela sua interação com a luz, promovem a emissão de fluorescência que lhes é característica. Nos bimoleculares, os complexos são formados e a emissão originada tem fluorescência característica e diferente da originada pelo cromóforo de origem, simplesmente por envolver a formação de novos sistemas emissores de luz. Dependendo das entidades envolvidas na formação destes complexos, estes podem ser classificados como excímeros, se formados a partir de moléculas idênticas, uma no estado eletrónico fundamental e a outra excitada, e exciplexos, se formados a partir de entidades diferentes.

A luz emitida ou absorvida pode ser registada como espectros, em que se relaciona a intensidade da luz emitida ou a absorção de luz, com o respetivo comprimento de onda. Estes espectros podem ser analisados isoladamente ou complementarmente a outras técnicas de análise e fornecer informações importantes quanto à morfologia e comportamento dos sistemas de interesse.¹⁹

Devido à sua alta sensibilidade a rearranjos estruturais de proteínas e à sua sensibilidade de análise, a espectroscopia de fluorescência é uma técnica amplamente utilizada na caracterização de agregados amilóides. Esta técnica vem sendo empregue há vários anos em proteínas contendo resíduos aromáticos (triptofano, tirosina, fenilalanina), que são responsáveis pelo aparecimento de uma banda de fluorescência com máximo de 350 nm quando excitadas em aproximadamente 280 nm. No entanto, muitos ensaios com diferentes proteínas, incluindo proteínas que não possuem resíduos aromáticos, mostram o aparecimento de uma nova banda de fluorescência na área visível de 450 nm quando estas são excitadas a 350 nm, o que é característico da formação de agregados amilóides e

mostra que esta fluorescência é independente da fluorescência intrínseca de resíduos aromáticos.

1.5.2 Microscopia de força atômica (AFM)

O princípio de funcionamento da microscopia de força atômica (AFM) baseia-se na varredura da superfície da amostra por uma ponta piramidal (ponteira) de alguns micrómetros de comprimento (100 a 200 μm) e geralmente com menos de vinte nanômetros de diâmetro, integrada num cantiléver flexível. A sonda (ponteira+cantiléver) é sempre o componente básico e, para alcançar resolução atômica, a ponta tem de terminar num conjunto de átomos. A força entre a ponta e a superfície da amostra faz com que o cantiléver se aproxime ou se afaste e essa deflexão é proporcional à força de interação. Na parte superior da haste, há um espelho que reflete a luz de um feixe de laser. Após a reflexão, o feixe de laser passa por uma lente e incide sobre um fotodetector (fotodiodo) de quatro quadrantes, que mede as variações de posição e de intensidade da luz produzidas pelas deflexões do cantiléver (Figura 9). À medida que a ponta varre a amostra ou a amostra é deslocada sob a ponta, os diferentes tipos de “acidentes geográficos” encontrados sobre a superfície fazem com que a interação mude. As variações das interações são os fatores que provocam diferentes deflexões. Essas diferenças, captadas no detetor, são armazenadas e processadas por um computador, que as transforma em imagens topográficas da superfície bi e tridimensionais. A força mais comumente associada com AFM na deflexão do cantiléver é a força de Van der Waals.⁵⁸

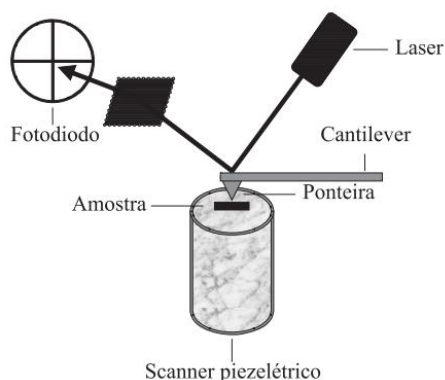


Figura 9. Diagrama esquemático do sistema de microscopia de força atômica. Retirado de ⁵⁸.

A técnica de AFM, pode ser operada em três modos diferentes: contato, não-contato e contato intermitente (“tapping”), Figura 10.

No modo contato, o cantiléver é mantido a poucos angströms da superfície da amostra e a força interatômica entre a ponta e a amostra é repulsiva. Neste modo de operação, a ponta faz um leve “contato físico” com a amostra produzindo imagens com alta resolução, mas a compressão e as forças geradas, entre a ponta e a superfície, podem causar danos à amostra, o que é especialmente prejudicial às amostras biológicas que são sensíveis e nem sempre fortemente aderidas ao substrato.⁵⁹

No modo não-contato, o cantiléver é mantido de dezenas a centenas de angströms da superfície da amostra e a força interatômica entre a ponta e a amostra é atrativa. Neste caso, a ponta oscila em alta frequência (100 kHz a 1 MHz), a poucos nanômetros acima da superfície e a força total entre a ponta e a amostra é muito baixa, geralmente em torno de 10-12 nN. Esta oscilação aumenta consideravelmente a sensibilidade do microscópio, o que faz com que forças de van der Waals e forças eletrostáticas possam ser detetadas.⁵⁹ O modo de não-contato não sofre os efeitos do atrito sobre a amostra, causada pela ponta, conforme é observado no modo contato após diversas varreduras. Por outro lado, este modo não tem encontrado aplicabilidade geral, devido à instabilidade entre a ponta e as forças adesivas da superfície e à resolução reduzida pela distância ponta-amostra que é relativamente grande.⁵⁹

O modo contato intermitente é similar ao não-contato, exceto pelo fato de que a ponta vibrante fica mais próxima da amostra, de forma que tenha um contato intermitente e é utilizado para contornar as limitações impostas pelo modo contato. A comparação das imagens nos modos contato e intermitente mostra que as superfícies são menos modificadas no modo intermitente.^{58,59}



Figura 10. Representação esquemática das forças entre a amostra e agulha em função da distância, caracterizando os diferentes modos de trabalho do microscópio de força atômica. Retirada de ⁵⁹.

1.5.3 Microscopia de tempos de vida de fluorescência (FLIM)

As técnicas de microscopia de tempos de vida de fluorescência (FLIM) podem ser classificadas em técnicas de domínio de tempo e domínio de frequência, contagem de fótons e técnicas analógicas, técnicas de digitalização de ponto e de imagem de campo amplo. Praticamente todas as combinações estão em uso, levando a uma ampla variedade de princípios instrumentais. Diferentes princípios diferem na sua eficiência em termos de fótons, ou seja, no número de fótons necessários para determinação do tempo de vida, o tempo de aquisição necessário para registrar fótons, o fluxo dos fótons a que podem ser usados, a sua resolução de temporal, a sua capacidade de resolver os parâmetros das funções de decaimento multiexponencial, a sua capacidade de comprimento de onda múltiplo e a sua compatibilidade com diferentes imagens e técnicas de microscopia.³⁸

A contagem de fótons controlada pelo tempo, uma das muitas técnicas utilizada, é usada em combinação com a varredura a laser para registrar imagens de fluorescência com alta eficiência e taxas de contagem extremamente altas. A técnica conta os fótons detectados por um detetor de alta velocidade em vários locais de contagem com portas paralelas. Em princípio, esta contagem controlada pode lidar com níveis extremamente elevados de taxas de contagem até ao limite da sobrecarga do detetor. A desvantagem está no número de portas de tempo, que é muito limitado. Os dados temporais são, portanto,

subamostrados e os parâmetros de amplitudes e tempos de vida dos perfis de decaimento multiexponenciais são difíceis de obter. A técnica é utilizada pela sua simplicidade e baixo custo, contudo ainda não é rápida o suficiente para obter dados FLIM em resolução de subnanossegundos ou picossegundos.

FLIM no domínio do tempo por TCSPC (contagem de fóton único correlacionado no tempo) usa um processo de contagem de fóton único correlacionado no tempo multidimensional, que é uma extensão da técnica clássica TCSPC. Basicamente, a amostra é digitalizada pelo feixe focalizado de um laser pulsado de alta frequência. O registo de dados é baseado na detecção de fótons únicos da luz de fluorescência e na determinação dos tempos de chegada dos fótons em relação aos pulsos de laser, bem como a posição do feixe de laser no momento da fotodetecção. Entre as técnicas FLIM existentes, o TCSPC multidimensional oferece a mais alta resolução de tempo, oferecendo também a melhor precisão de vida ou eficiência de fótons, para um determinado número de fótons detectados na amostra.³⁸

Os dados FLIM no domínio do tempo (de sistemas TCSPC-FLIM ou sistemas de câmaras com portas) são matrizes de pixels, cada um dos quais contém um número (geralmente grande) de canais de tempo. Os canais de tempo contêm números de fótons por vezes consecutivos após o pulso de excitação, Figura 11 (meio). Para obter parâmetros de decaimento de fluorescência de tais dados, um processo de convolução iterativo é usado. A função de um modelo de decaimento adequado com a função de resposta do instrumento (IRF), é complexa. O IRF é a resposta do sistema de detecção ao próprio pulso de excitação. É medido ou calculado a partir dos dados de decaimento de fluorescência. O procedimento de ajuste, então, otimiza os parâmetros do modelo até que o melhor ajuste para o número de fótons nos canais de tempo seja alcançado. Para FLIM, o procedimento de ajuste deve ser repetido para todos os pixels da imagem. O modelo de decaimento mais simples é uma função exponencial única. É descrito por um único tempo de decaimento. Na maioria dos casos, os perfis de decaimento devem ser modelados pela soma de duas ou três funções exponenciais. Esses modelos são descritos por vários tempos de decaimento e coeficientes de amplitude. A imagem FLIM final é obtida atribuindo o brilho ao número total de fótons no pixel e a cor a um parâmetro de decaimento selecionado (Figura 11, à direita). O parâmetro pode ser o tempo de vida de um decaimento exponencial único, uma amplitude ou uma intensidade média ponderada dos tempos de vida num decaimento

multiexponencial, um tempo de vida ou uma razão de amplitude. Existem métodos que extraem dados de decaimento de forma eficiente de curvas de decaimento ruidosas, como a análise de máxima verossimilhança ou a análise Bayesiana.^{37,39} Para um número baixo de fótons, um único tempo de vida exponencial pode ser eficazmente derivado do primeiro momento (o tempo médio de chegada) da distribuição dos fótons. O tempo de vida é a diferença dos primeiros momentos dos dados de decaimento e do IRF. O cálculo do primeiro momento requer que as curvas de decaimento sejam registadas com fundo desprezível e ao longo de um intervalo de tempo contendo as curvas de decaimento completas. Sob essas condições, o cálculo do primeiro momento fornece uma relação sinal-ruído ideal.

A desvantagem encontra-se em não fornecer parâmetros de perfis de decaimento multiexponenciais.³⁸ Contudo, o uso desta técnica supera muitas das limitações dos métodos de intensidade de fluorescência. A vantagem mais importante está no tempo de vida de fluorescência que não depende da concentração do corante ou da potência da fonte de excitação e é possível realizar uma análise das curvas de decaimento por tempo de modo a discriminar os fótons provenientes da autofluorescência.⁴⁴

Esta técnica constrói histogramas bidimensionais de frequências de pixel sobre vários parâmetros de decaimento obtidos num canal de detecção, ou parâmetros de decaimento e taxas de intensidade obtidas em diferentes canais de detecção. Nestes histogramas, a presença de fluoróforos ou frações de fluoróforo podem ser encontradas, marcadas, e o pixel correspondente ser anotado nas imagens.

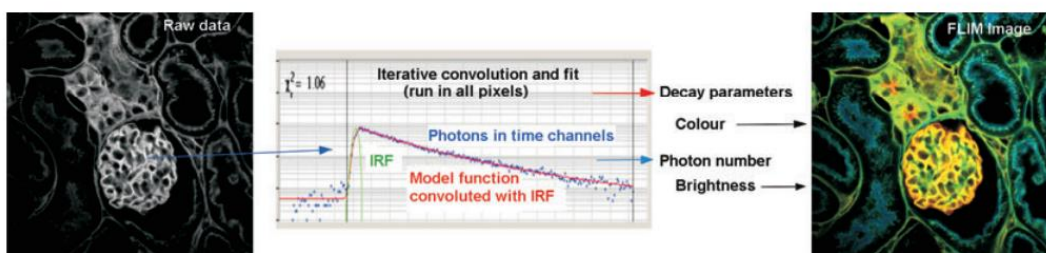


Figura 11. Análise de dados FLIM no domínio do tempo. Retirado de ³⁸.

FLIM também não é afetado por variações de intensidade de iluminação, ou fotodegradação - desde que as sondas não se agreguem e os fotoprodutos não

fluoresçam. No entanto, na prática, decaimentos multiexponenciais e fotoprodutos indesejáveis podem dificultar a aplicação de algumas sondas.²⁰

O tempo de vida da fluorescência serve como parâmetro importante no estudo do efeito de fatores químicos como pH, íões e molecularidade em sistemas biológicos. A microscopia ótica baseada na detecção de fluorescência tem uma ampla gama de aplicações em biotecnologia médica, diagnóstico, sequenciamento de DNA e citometria de fluxo. FLIM é frequentemente empregue no estudo da transferência de energia intracelular devido a interações moleculares. Os sinais são função da distância intermolecular e, portanto, permitem a avaliação de lacunas moleculares numa melhor resolução quando comparada às técnicas convencionais de imagem ótica.

FLIM é uma técnica poderosa baseada na vida útil de um fluoróforo, ao invés de ser baseada em espectros de emissão. O tempo de vida (τ) é definido como o tempo médio necessário para um fóton decair do seu estado excitado para o seu estado fundamental. O tempo de vida de uma determinada molécula é calculado com a técnica de domínio de tempo de contagem de fóton único correlacionada com o tempo (TCSPC). No TCSPC-FLIM, a função de decaimento fluorescente é obtida excitando o fluoróforo com pulsos de laser curtos de alta frequência e medindo os tempos de chegada do fóton emitido um detector em relação aos pulsos. Ao digitalizar uma amostra, uma matriz de dados tridimensionais é criada para cada pixel: a matriz inclui informações sobre a distribuição dos fótons nas suas coordenadas espaciais x , y e a sua curva de decaimento temporal. Uma determinada amostra, portanto, torna-se um mapa de vidas, revelando informações sobre a estrutura, ligação e ambiente da proteína. Cada proteína fluorescente possui um tempo de vida intrínseco e precisamente definido, geralmente de alguns nanossegundos (ns), dependente de suas propriedades físico-químicas. É importante ressaltar que a vida útil de um fluoróforo é independente de sua concentração, intensidade fluorescente e da metodologia de imagem. No entanto, dentro de um sistema biológico, ele pode ser afetado por fatores ambientais como pH, temperatura, concentrações de íões, saturação de oxigénio e intermediários de interação. O tempo de vida também é sensível a mudanças estruturais internas e orientação.^{21,76}

1.6 Lisozima

A lisozima da clara do ovo de galinha (HEWL) é uma proteína que apresenta uma estrutura elipsoidal e é obtida a partir dos ovos de galinha, lágrimas e outras secreções. É uma proteína alcalina com função antibacteriana, amplamente encontrada em diversos organismos, como mamíferos, aves, insetos e plantas. É uma proteína de cadeia simples, composta por uma única cadeia polipeptídica constituída por 129 aminoácidos ligada por quatro pontes dissulfeto (C6–C127, C30–C115, C64–C80 e C76–C94). A ligação C6–C127 liga-se aos terminais N e C da proteína, sendo esta parcialmente exposta ao solvente; as outras três ligações dissulfeto estão ‘escondidas’, tornando-se inacessíveis a solventes.⁴² A lisozima possui um peso molecular de 14,7 Da e ponto isoelétrico de 10,7-11,0.²²

Uma das suas propriedades é a boa resistência à desnaturação. No entanto, a sua propriedade mais marcante é ação antimicrobiana. A lisozima é efetiva no ataque da parede celular de diferentes espécies bacterianas levando à lise e consequente morte devido à pressão osmótica interna da célula. A parede celular, em particular, a componente do peptidoglicano, é responsável pela rigidez da parede bacteriana. O peptidoglicano está presente na parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A lisozima causa a degradação do peptidoglicano de certas espécies de bactérias por hidrólise das ligações glicosídicas $\beta(1-4)$ do ácido N-acetilmurâmico e da N-acetilglucosamina para decompor os mucopolissacáridos insolúveis na parede celular em glicopéptidos solúveis, causando a rutura da parede celular.²⁷

A lisozima atua, principalmente, sobre bactérias gram-positivas, uma vez que a parede celular é mais acessível, porém pode atuar contra bactérias gram-negativas se for submetida a desnaturação por meio de aquecimento ou mudança do pH. Além disso, apresenta atividade de quitinase, isto é, quebra a ligação glicosídica presente na parede de fungos.

Por ser antibacteriana, anti-inflamatória e inofensiva ao corpo humano, a lisozima é amplamente utilizada na medicina e na alimentação.^{23,26}

A lisozima nativa exibe uma conformação rica em α -hélice (~30%) com dois domínios diferentes que são reticulados por quatro pontes dissulfeto intramoleculares. Dada a sua alta identidade de sequência em 40% com a lisozima humana, que é afiliada à amiloidose sistêmica não neuropática, resultando em deposição amilóide no fígado e no rim em humanos e posse de propensão para a formação de fibrilas em condições apropriadas, esta serve como uma boa proteína modelo para pesquisa associada

à fibrilogénese amilóide.^{24,25} A vantagem oferecida pela lisozima é não ser tóxica e não interferir com a fermentação de leveduras.²⁷

Capítulo 2 - Materiais e métodos

2.1 Materiais

O péptido A β 42, lisozima da clara do ovo de galinha (HEWL) e soluções de cloreto de Zn (II), Fe (III) e Cu (II) foram adquiridas da Sigma-Aldrich.

2.2 Péptido A β

A partir do péptido A β 42 foram preparadas soluções stock em 10% DMSO. Todas as amostras foram preparadas diluindo volumes adequados de stocks de péptido em solução tampão PBS pH 7,4. Sais de cloreto de iões de zinco, cobre e ferro foram usados devido à sua solubilização relativamente fácil em soluções aquosas e também porque o anião Cl⁻ está presente em abundância em fluídos biológicos.¹⁸

2.1.1 Preparação das soluções do péptido A β e iões metálicos

Em todas as experiências, a concentração de A β 42 foi de 25 μ M. As concentrações finais de Zn (II), Cu(II) e Fe(III) nas misturas de amostra, com a solução tampão PBS e péptido A β , foram de 0 μ M (1:0), 12,5 μ M (1:0,5), 25 μ M (1:1) e 125 μ M (1:5) - relação péptido:metal - e foram mantidas incubadas em banho-maria durante todo o processo (30°C por 30h). Para confirmar a presença de agregados/fibrilas, as amostras foram estudadas por fluorescência, FLIM e AFM.

2.1.2 Fluorescência

Os espectros de emissão de fluorescência (obtidos de 370 nm a 500 nm) das amostras de A β , na presença das várias concentrações dos iões, foram adquiridos com os espectrofotómetros de fluorescência Fluorolog-Ferrari e SPEX, nas mesmas condições. O comprimento de onda de excitação foi fixado nos 360 nm.

2.1.3 Microscopia de força atómica (AFM)

Para confirmar e visualizar a presença de fibrilas amilóides e estudar a morfologia dos agregados, foi empregue a técnica AFM. Todas as imagens de AFM foram realizadas no

ar um microscópico de força atômica dilnnova-Veeco (Bruker, EUA) operado no modo tapping. Foi utilizada uma sonda revestida com alumínio de silico de frequência de ressonância de 320 kHz (f_0) e constante de mola de 40 Nm^{-1} (Bruker). O software Gwiddion foi usado para medir o tamanho e o diâmetro dos agregados das imagens de AFM.

2.2 Agregação da lisozima

As fibrilas amilóides de HEWL foram preparadas por amostras de proteína ($40 \mu\text{M}$) em variadas condições: elevadas temperaturas e pH ácido – 50 mM de tampão Gly-HCl a pH 2.2 e 60°C ; solventes orgânicos - 90% de etanol a pH 7.5 e temperatura ambiente; agentes redutores – 2 M de ureia na presença de 20 mM de tampão fosfato a pH 7.5 e temperatura ambiente; detergentes – 200 μM de SDS na presença de 50 mM de tampão Gly-HCl a pH 2.2 e temperatura ambiente.

Por outro lado, os agregados amorfos foram preparados por amostras de proteína ($40 \mu\text{M}$) nas seguintes condições: detergentes – 200 μM de SDS na presença de 50 mM de tampão Gly-NaOH a pH 9 e temperatura ambiente; DTT – 2 mM de DTT na presença de tampão fosfato a pH 2.2 e temperatura de 37°C ; TCEP – 10 mM de TCEP na presença de 20 mM de tampão HEPES a pH 7.5 e temperatura de 37°C .

Para confirmar a presença de fibrilas/agregados amorfos, as amostras foram examinadas por fluorescência e FLIM.

2.2.1 Fluorescência

Os espectros de emissão de fluorescência (obtidos de 340 nm a 600 nm) de amostras de lisozima, na presença das variadas condições, foram adquiridos com um espectrofotômetro de fluorescência FluoroMax-4. O comprimento de onda de excitação foi fixado em 340 nm.

2.3 Microscopia de tempos de vida de fluorescência (FLIM)

As imagens de vida de fluorescência foram coletadas com recurso a um sistema FLIM confocal Becker e Hickl (GmbH) DCS-120. O sistema está equipado com um módulo TCSPC-System (SPC-150N), um microscópio ótico invertido NIKON Ti2-U, controlado por uma unidade galvo-drive (Becker e Hickl GDA-121) e um fotodetector híbrido GaAsP (300-

720 nm), controlado pela placa controladora do detector DCC-100. Quatro objetivas estão disponíveis em 10x (CFI Plan Achromat 10X/ 0,25/ 10,50), 20x (CFI Plan Achromat 20X/0,40/ 1,20), 40x (CFI. Plan-Achromat 40X/ 0,65/ 0,56) e 100x objetiva de óleo (CFI Óleo de Lambda Apocromático Plano/1,45/0,13), sendo que ao longo das experiências foi utilizada a objetiva 20x. O sistema de microscópio confocal DCS-120 é equipado com um divisor de feixe polarizador. A fonte de excitação é um laser de díodo de picossegundos de comprimento de onda de 375 nm (lasers da série bh BDL), que trabalha em modo pulsado (taxa de repetição: 80 MHz). A IRF do sistema é inferior a 100 ps. A potência total do laser na amostra foi ajustada para 40% do valor máximo e a emissão coletada passou por um pinhole de 1 mm, um filtro de passagem longa ET 390/LP e um filtro de passagem de banda ET 510/80. As imagens FLIM foram digitalizadas e gravadas com uma resolução de 512x512 pixels usando o modo 'FIFO Imaging' dos módulos SPC-150N. A análise dos dados foi realizada por meio do software de análise de dados SPCImage NG. As curvas de decaimento foram ajustadas usando o método de ajuste do algoritmo de máxima verossimilhança (ou estimativa de máxima verossimilhança, MLE), em cada pixel.

Em todas as experiências de microscopia, uma alíquota (8 μ l), de diferentes soluções (A β e lisozima), foi colocada numa lâmina de microscópio e as medidas foram realizadas colocando a lâmina invertida na platina do microscópio.

Capítulo 3 - Resultados e Discussão

3.1 Péptido A β e iões metálicos

Numa primeira fase, estudou-se o comportamento do péptido A β isolado, uma vez que se trata do comportamento controlo, sendo essencial perceber a sua evolução. Conforme mencionado anteriormente, neste estudo, a proteína 25 μ M foi incubada em PBS, a fim de formar agregados amilóides para serem seguidos por espectroscopia de fluorescência durante 30h. Como podemos ver na Figura 12A, uma banda muito remarcada com comprimento de onda máximo de aproximadamente 430 nm pode ser observada após excitação a 360 nm. Além disso, pode-se visualizar um aumento na intensidade da fluorescência ao longo do tempo. Podemos observar melhor esses resultados na Figura 12B quando se traça um gráfico de intensidade de fluorescência vs tempo de incubação. Este comportamento foi observado a partir da emissão de autofluorescência a 430 nm, após excitação a 360 nm. Este apresenta um comportamento sigmoidal, isto é, com o aumento do tempo de incubação, a intensidade de fluorescência acompanha este aumento, conforme mostrado na Figura 12. Às 0h apresenta uma intensidade de fluorescência de cerca de 7 400 a.u., sendo que este valor tende a aumentar, chegando a uma intensidade de cerca de 11 000 a.u. ao fim de 30h. A autofluorescência permite seguir o mecanismo de nucleação-alongamento, com as três fases bem definidas: lag phase das 0h às 5h, fase de crescimento das 5h às 23h e a fase de estabilização das 23h às 30h. Recentemente, estudos de CD⁸², TEM (Imagens de microscopia eletrónica de transmissão)^{80,81} e fluorescência^{83,84} relatam que o péptido Abeta isolado com o aumento do tempo de incubação apresenta um comportamento sigmoidal simples, agregando-se em fibrilas ricas em folha- β , típico de agregados amilóides.

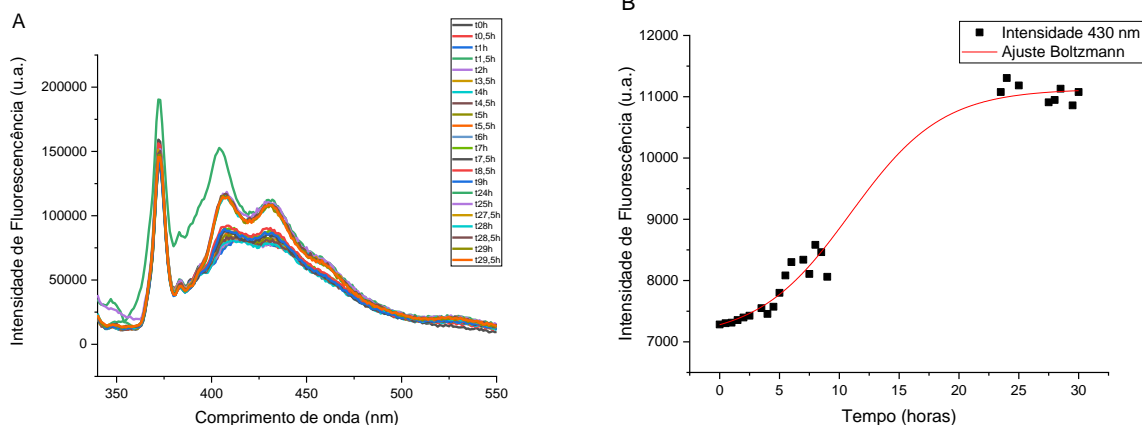


Figura 12. A) Intensidade de fluorescência de Abeta (25 μm) isolada, após excitação a 360 nm, durante o período de incubação 29,5h. B) Intensidade de fluorescência de Abeta (25 μm) isolada em função do período de incubação.

Numa segunda fase, estudou-se o comportamento dos três íões metálicos (zinco, cobre e ferro) na presença do tampão PBS, de modo a se verificar o comportamento destes na presença do tampão, a fim de averiguar se este perturbava o sinal, tendo em conta os efeitos de filtro interno. É possível observar, pelas Figuras 13, 14 e 15, que este não interfere no comportamento dos íões, pois apresenta uma absorvância semelhante na presença e na ausência dos mesmos. Verifica-se a ausência de absorção entre 300 nm e 370 nm, comprimentos de onda de excitação da auto-fluorescência de Abeta.

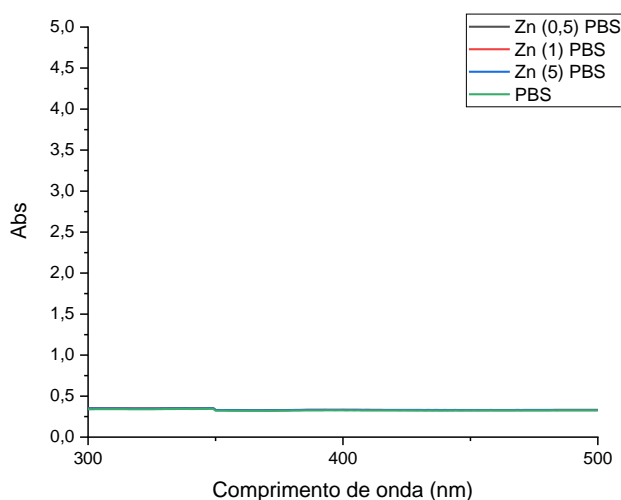


Figura 13. Absorvância do íão zinco em diferentes concentrações em tampão PBS.

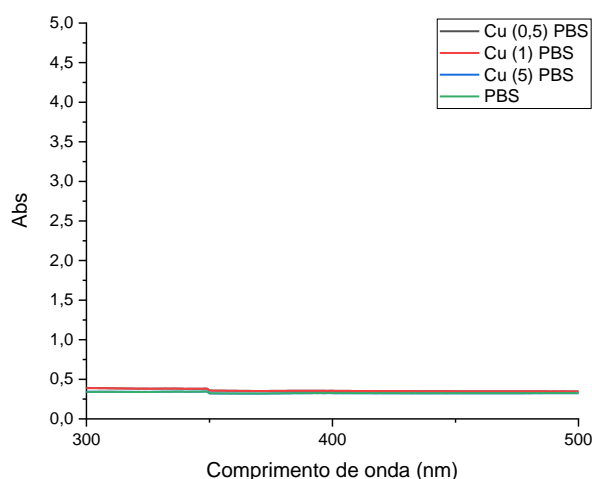


Figura 14. Absorvância do íon cobre em diferentes concentrações em tampão PBS.

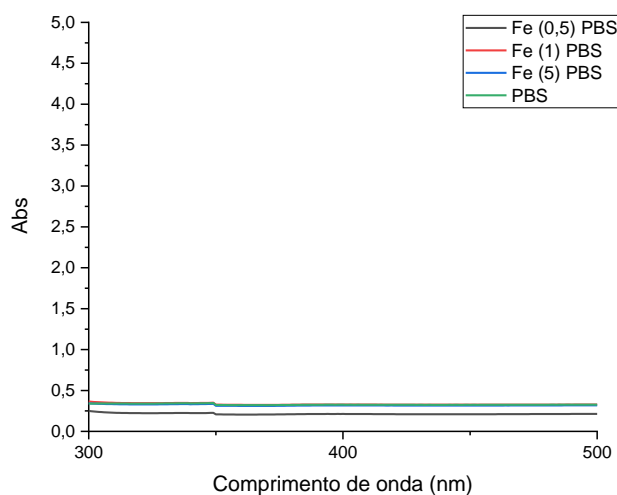


Figura 15. Absorvância do íon ferro em diferentes concentrações em tampão PBS.

3.1.1 Fluorescência

3.1.1.1 Zinco

O efeito do Zn(II) no péptido A β 42 (A β 42:Zn) foi o seguinte: a fluorescência aumentou significativamente na presença da menor concentração de Zn(II), atingindo valores máximos próximos de 90 000 u.a., o que supera o valor máximo de intensidade de fluorescência do péptido isolado (11 000 u.a.). As restantes concentrações não conseguiram superar este valor de A β 42, como é possível observar na Figura 16A, sugerindo que estes valores de concentração não promovem a agregação do péptido. A partir da Figura 16B, que mostra os resultados de uma experiência de dispersão de luz, é

possível afirmar que os valores de intensidade aumentam com o número de agregados, ou seja, o número de agregados para a menor e maior concentração aumenta ao longo do tempo. Já a relação 1:1 apresenta intensidade constante, isto é, não houve aumento no número de agregados. Tendo em conta a proporção 1:5, esta não vai de acordo com os resultados obtidos da fluorescência. Uma vez que, como a fluorescência se mantém relativamente constante, espera-se obter valores de dispersão da luz igualmente constante. Isto não é reproduzível, uma vez que os valores de dispersão aumentam e isto pode-se justificar pela presença, realmente, de um número maior de agregados, contudo com menor tamanho.

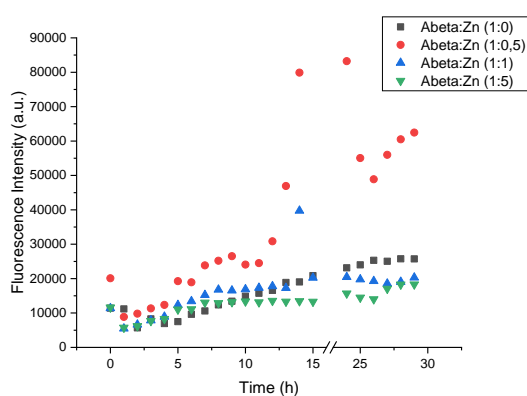


Figura 16A. Intensidade de fluorescência de Abeta (25 μm) presença de concentrações crescentes de íon zinco ($\text{A}\beta(1-42):\text{Zn}$ - 1:0; 1:0,5; 1:1; 1:5), durante 29h. Excitação a 360 e emissão com slit 4 a 430 nm.

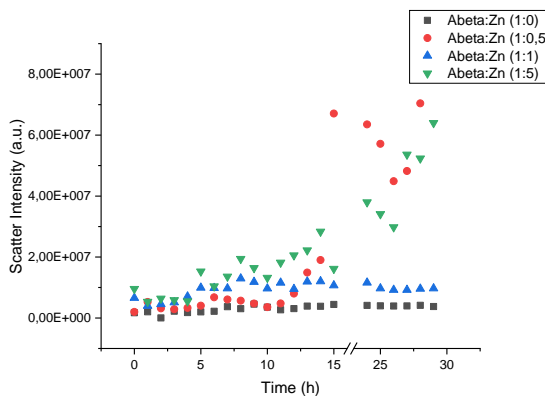


Figura 16B. Dispersão de luz de Abeta (25 μm) presença de concentrações crescentes de íon zinco ($\text{A}\beta(1-42):\text{Zn}$ - 1:0; 1:0,5; 1:1; 1:5), durante 29h. Excitação a 360 e emissão com slit 4 a 551 nm.

Analisando pormenorizadamente a Figura 16A, pode-se verificar que das 0h às 4h a fase de latência manteve-se minimamente constante; das 5h às 15h, a fase de crescimento – onde normalmente ocorre o crescimento das fibrilas – esperava-se um crescimento exponencial, pelo que esse aumento não ocorreu, observando-se um crescimento moderado da intensidade de fluorescência, não havendo diferenças significativas nas curvas. A fase de crescimento e fase de saturação apresentam aproximadamente os mesmos valores, com exceção da relação $\text{A}\beta:\text{Zn}$ (1:0,5). Esta apresenta valores mais elevados comparativamente com as outras concentrações, sendo a única com um comportamento, em termos de intensidade, mais elevado que o péptido isolado, apresentando um valor de fluorescência de 60 000 u.a. às 30h, enquanto $\text{A}\beta$ isolada apresenta 20 000 u.a. de intensidade de fluorescência às 30h. Posto

isto, pode-se concluir que a menor concentração promove a agregação de A β . Isto é, ainda que a presença de Zn promova a agregação, este fenómeno (tal como é observado pela auto-fluorescência) aparenta ser dependente da agregação.⁷⁷

Na Figura 17 observam-se os espectros de emissão de fluorescência obtidos para a β -amilóide na presença de ião zinco. Note-se que a intensidade da fluorescência é maior quando a amostra se encontra há mais horas incubada. A banda de emissão de fluorescência mais importante tem o seu máximo em torno de 430 nm, mas uma banda também, mas menos intensa, é observada no comprimento de onda a 460 nm, que é característico da formação de agregados amilóides, estando por isso na presença dos mesmos.

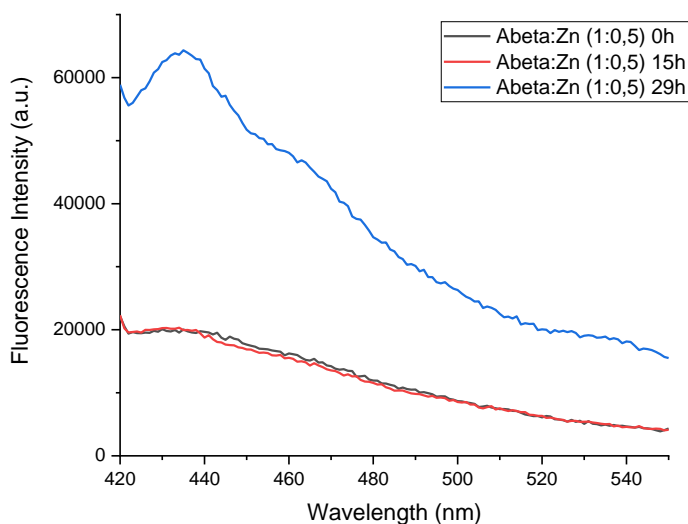


Figura 17. Intensidade de fluorescência de Abeta (25 μ M) na presença da menor concentração do ião zinco (A β (1-42):Zn - 1:0,5), nos tempo 0h, 15h e 29h. Excitação a 360 nm e emissão com slit 4.

3.1.1.2 Cobre

A β :Cu (1:0,5), no mesmo tempo que a relação A β :Cu (1:5), atinge valores aproximadamente de 180 000 u.a., enquanto a maior concentração atinge valores próximos de 100 000 a.u., conforme a Figura 18A. Relativamente à razão equimolar, esta apresentou valores menores que o controlo (péptido isolado), ou seja, não causa agregação. Para confirmar o que foi referido anteriormente, o gráfico da Figura 18B, reforça o facto de a menor e maior concentração causarem agregação, uma vez que se

reflete no aumento do número de agregados, pois estes aumentam em número com o aumento da dispersão da luz.

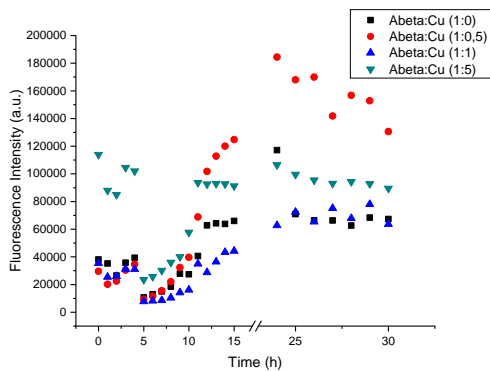


Figura 18A. Intensidade de fluorescência de Abeta (25 µm) na presença de concentrações crescentes de ião cobre (Aβ(1-42):Cu - 1:0; 1:0,5; 1:1; 1:5), durante 29h. Excitação a 360 nm e emissão com slit 4 a 430 nm.

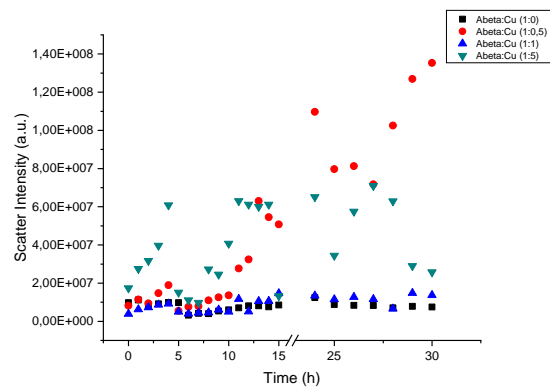


Figura 18B. Dispersão da luz de Abeta (25 µm) na presença de concentrações crescentes de ião cobre (Aβ(1-42):Cu - 1:0; 1:0,5; 1:1; 1:5), durante 30h. Excitação a 550 nm e emissão com slit 1 a 551 nm.

Na figura 19 observam-se os espectros de emissão de fluorescência obtidos para o péptido β-amilóide na presença de ião cobre. Note-se que a intensidade da fluorescência é maior quando a amostra se encontra há mais horas incubada, apresentando um comportamento semelhante ao ião zinco. Contudo, os valores das 15h e 30h diferem relativamente pouco entre si. A banda de emissão de fluorescência mais importante tem seu máximo em torno de 430 nm, mas uma banda menos intensa também é observada no comprimento de onda 460 nm, tal como foi observado por Fricano et al.⁷⁸ e Tikhonova et al.⁷⁹, o que significa que se está na presença de agregados amilóides.⁷⁹

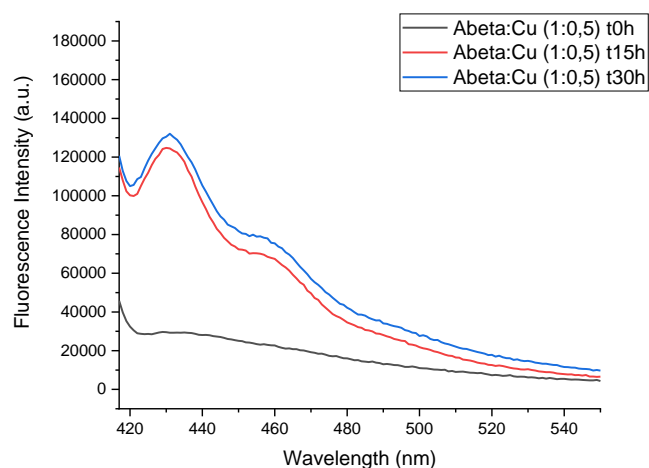


Figura 19. Intensidade de fluorescência de Abeta (25 μ M) na presença da menor concentração do ião cobre ($A\beta(1-42):Cu - 1:0,5$) nos tempos 0h, 15h e 30h. Excitação a 360 nm e emissão com slit 4.

3.1.1.3 Ferro

O ião ferro, comparativamente com os outros iões, comportou-se de forma distinta, uma vez que se encontra ausente a fase lag, a nucleação.

O efeito do ferro no péptido ($A\beta_{42}$) deu-se, visivelmente, quando este se encontrava com a concentração equimolar. Nesta concentração encontra-se ausente a lag phase, pelo que a fase de crescimento decorre entre as 0h e 5h. Após as 5h, atingiu-se a estabilização das estruturas, com valores aproximadamente de 200 000 u.a., conforme mostrado na Figura 20A. Neste caso, o efeito do ião acelerou a agregação, atingindo-se a estabilização apenas em 5h. A concentração mais elevada demonstrou um comportamento muito semelhante ao péptido isolado, sendo que os valores de ambos varia entre 20 000 e 40 000 u.a., pelo que se pode afirmar que não houve efeito do ião sob $A\beta$. Nestes dois casos, não se consegue definir as 3 fases do processo de nucleação, uma vez que apresentam um comportamento relativamente linear. A menor concentração, mais uma vez, apresenta valores superiores ao péptido isolado, contudo o maior valor atingido foi cerca de 60 000 u.a., não sendo possível, neste caso, definir as fases de nucleação.

Avaliando a figura da direita (Figura 20B), não é possível correlacionar os dois gráficos, uma vez que não se comporta como os outros iões. Isto é, uma maior intensidade de fluorescência não corresponde a um aumento no número de agregados,

tal como é visto com a dispersão de luz. Esta dispersão é maior para a menor concentração, ou seja, esta apresenta um maior número de agregados, enquanto se esperava obter um maior número para a concentração equimolar por apresentar uma maior intensidade de fluorescência. Isto pode-se justificar pelo facto de a dispersão da luz representar todos os tipos de agregados, sejam agregados amorfos ou agregados amilóides. Já a autofluorescência apenas ocorre na presença de agregados amilóides, isto é, apenas representa este tipo de agregados. Posto isto, o aumento da dispersão da luz, na menor concentração comparativamente à concentração equimolar, justifica-se pela presença de variadas formas de agregados, sendo que o número de agregados amilóides (na menor concentração), quanto à fluorescência é bastante menor, como é possível verificar pelas imagens abaixo. Consequentemente, pode-se afirmar que na razão 1:1 estão presentes, maioritariamente, agregados amilóides.

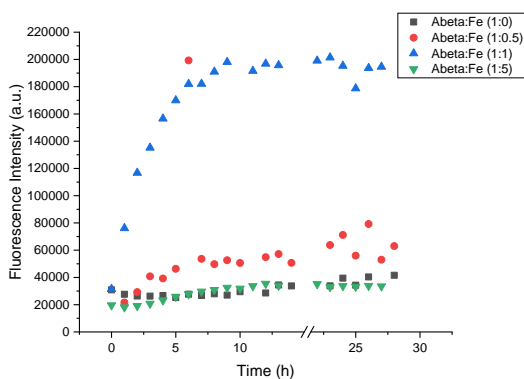


Figura 20A. Intensidade de fluorescência de Abeta (25 μm) na presença de concentrações crescentes de ião ferro ($\text{A}\beta(1-42):\text{Fe}$ - 1:0; 1:0,5; 1:1; 1:5), durante 28h. Excitação a 360 nm e emissão com slit 4 a 430 nm.

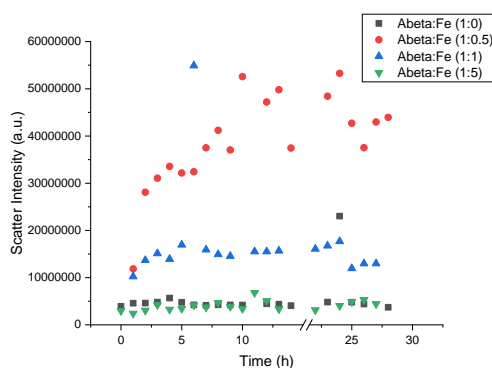


Figura 20B. Dispersão da luz de Abeta (25 μm) na presença de concentrações crescentes de ião ferro ($\text{A}\beta(1-42):\text{Fe}$ - 1:0; 1:0,5; 1:1; 1:5), durante 28h. Excitação a 550 nm e emissão com slit 1 a 551 nm.

Na Figura 21 observam-se os espectros de emissão de fluorescência obtidos para β -amilóide na presença de ião ferro. Note-se que a intensidade da fluorescência é maior quando a amostra se encontra há mais horas incubada, ou seja, apresenta o mesmo comportamento dos outros iões. A banda de emissão de fluorescência mais importante tem seu máximo em torno de 430 nm, mas uma banda também é observada no comprimento de onda 460 nm. Este é um dos casos onde esta banda de encontra mais intenso, confirmando ainda mais a presença de agregados amilóides.

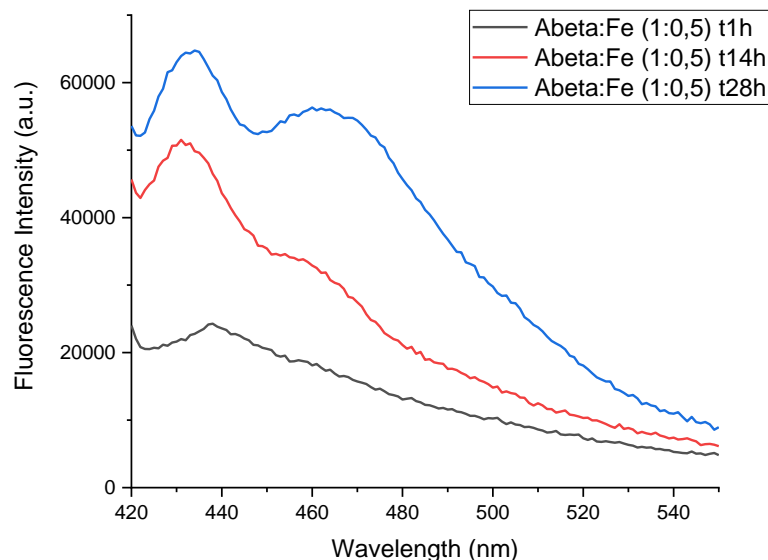


Figura 21. Intensidade de fluorescência de Abeta (25 μ M) na presença da menor concentração do ião ferro (A β (1-42):Fe - 1:0,5), nos tempo 1h, 14h e 28h. Excitação a 360 nm e emissão com slit 4.

3.1.2 Microscopia de tempos de vida de fluorescência (FLIM)

Quando uma proteína começa a agregar, o seu tempo de vida de fluorescência mudará de um valor superior para um inferior. A propensão de agregação pode então ser deduzida pela queda no tempo de vida: quanto menor o tempo de vida, maior a presença de espécies de proteínas agregadas no sistema.⁷⁶

3.1.2.1 Zinco

Pela Figura 22B é possível verificar, no tempo 0h, a presença de agregados amilóides na presença de zinco na sua forma fibrilar com um tempo de vida longo, cerca de 1200 ps, apesar de na concentração equimolar (Figura 22C) os agregados exibirem pouca fluorescência, estando pouco nítidos, estes também apresentam forma amilóide com um tempo de vida mais curto, relativamente à proporção A β :Zn(1:0,5). Na ausência de zinco, é possível verificar a presença de algumas estruturas, no entanto pouco visíveis. Relativamente à sua forma, não se consegue descrever, pois exibem pouca fluorescência.

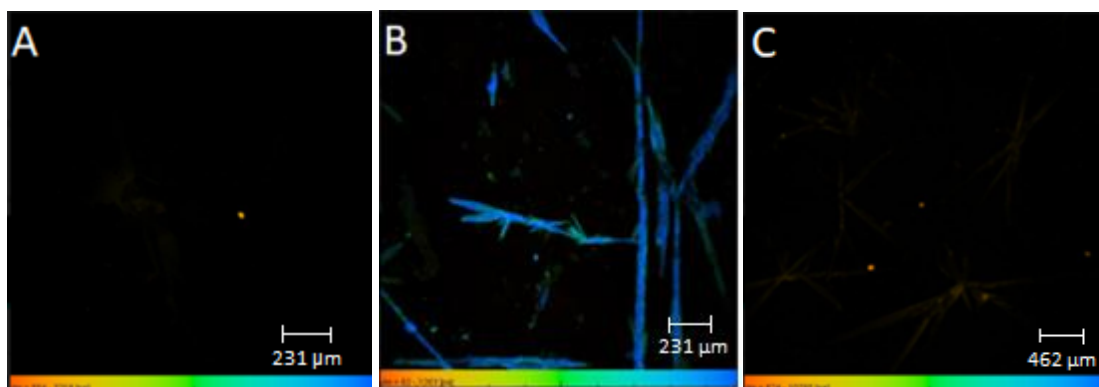


Figura 22. Imagem do tempo de vida de fluorescência do péptido A β A) na ausência de zinco e na presença de concentrações crescentes do ião (A β :Zn – B) 1:0,5; C) 1:1), às 0h.

Ao fim de 29h, em todas as imagens de tempo de vida de fluorescência, verifica-se um aumento no número de agregados, sendo que o tempo de vida de fluorescência se mantém moderadamente constante. Na ausência de zinco, ocorreu a formação de agregados amilóides, apresentando uma estrutura com forma fibrilar; na menor concentração de ião está-se na presença de agregados, porém perderam a sua forma amilóide, apresentando-se como agregados amorfos; na razão equimolar a forma manteve-se e as fibras aumentaram quer em número, quer em tamanho. Relativamente aos tempos de vida de fluorescência, a partir destes resultados, apesar de a cor azul corresponder a tempos de vida de fluorescência mais elevados, a cor das fibrilas amilóides (tempo de vida mais curto) refletem um tempo de vida superior ao tempo de vida dos agregados amorfos, onde este varia entre 500 e 12 500 ps, enquanto o tempo dos amorfos varia entre 120 e 1220 ps.

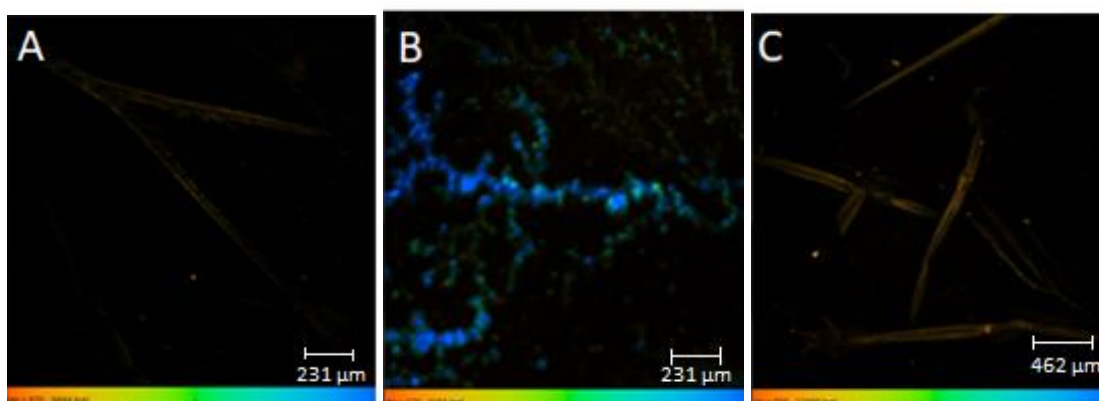


Figura 23. Imagem do tempo de vida de fluorescência do péptido A β A) na ausência de zinco e na presença de concentrações crescentes do ião (A β :Zn – B) 1:0,5; C) 1:1), às 29h.

3.1.2.2 Cobre

Na ausência do íon cobre, pela Figura 24A, às 30h, A β agregou e estes agregados apresentam-se como amorfos, com um tempo de vida de fluorescência relativamente médio. Contudo, este não era o resultado esperado. Nestas condições, Abeta teve um comportamento sigmoidal, sendo este comportamento característico da formação de agregados amilóides com o aumento do tempo de incubação.

Na presença de cobre, na menor concentração - B), surge o aparecimento de agregados amilóides, com um tempo de vida de fluorescência mais curto que na ausência do mesmo. Porém, nesta concentração também é possível visualizar agregados amorfos com um maior tempo de vida de fluorescência que a fibrila existente. Nas maiores concentrações do íon (A β :Cu – 1:1; 1:5), os agregados gerados apresentam um curto tempo de vida, sendo que se trata de agregados com uma organização desordenada e sem morfologia definida – agregados amorfos.

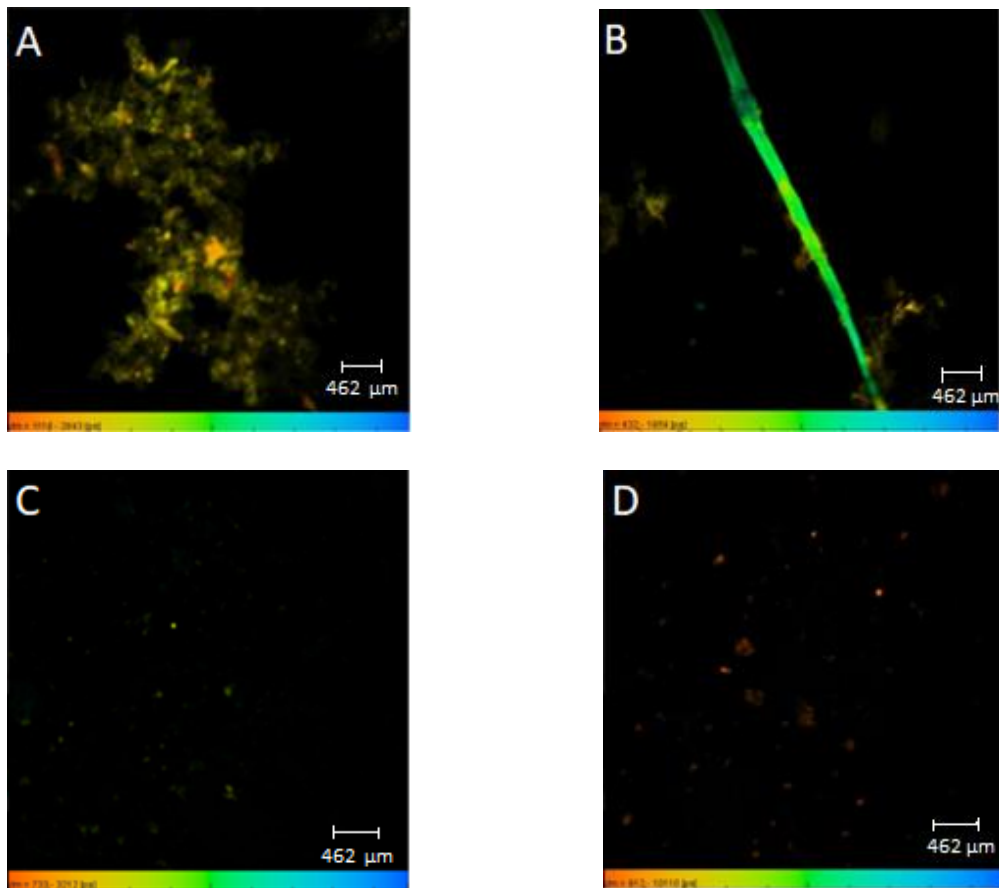
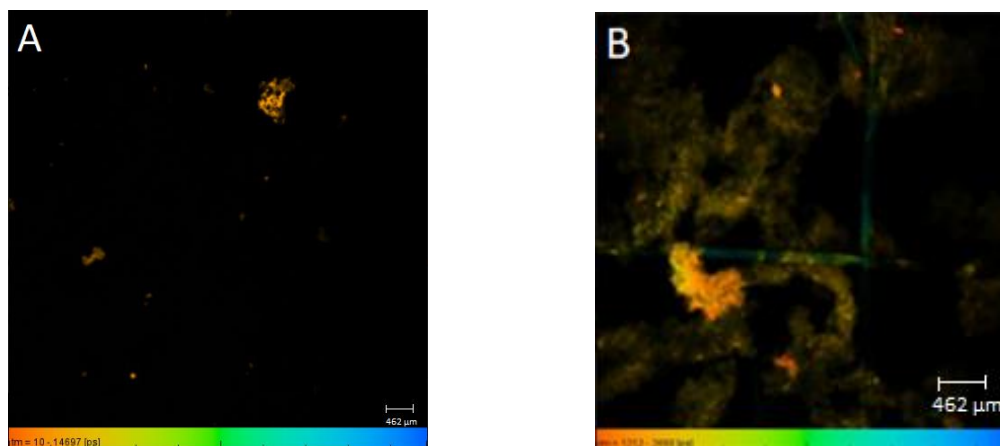


Figura 24. Imagem do tempo de vida de fluorescência do péptido A β A) na ausência de cobre e na presença de concentrações crescentes do ião (A β :Cu – B) 1:0,5; C) 1:1; D) 1:5), às 29h.

3.1.2.3 Ferro

O péptido A β isolado, Figura 25A, neste caso, ao fim de 29h, apresentou um baixo número de agregados sem forma definida. O aparecimento do ião ferro, ainda que na menor concentração, Figura 25B, levou a um aumento no número de agregados, verificando-se a existência dos dois tipos: amilóides e amorfos. Aparentemente formam-se essencialmente agregados amorfos, com um tempo de vida de fluorescência menor (cor de laranja e próximo de verde), mas em menor concentração alguns dos agregados são fibras com um tempo de vida de fluorescência mais elevado (mais azul). A Figura 25C mostra um grande número de agregados amorfos com um tempo de vida de fluorescência relativamente baixo (amarelado/esverdeado). Na maior concentração de ferro, obtiveram-se menos agregados, apresentando estes uma organização desordenada sem morfologia definida. O tempo de vida de fluorescência destes, apresenta-se como médio, onde os agregados apresentam-se esverdeados.



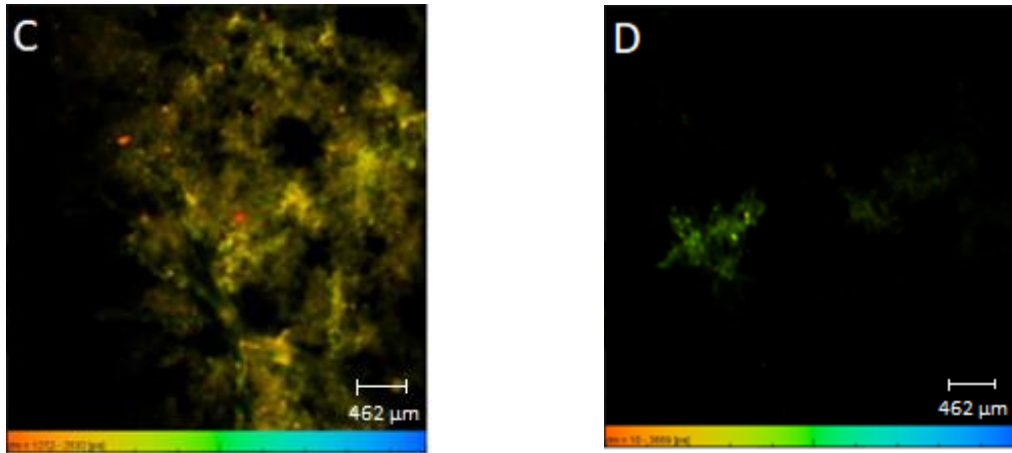
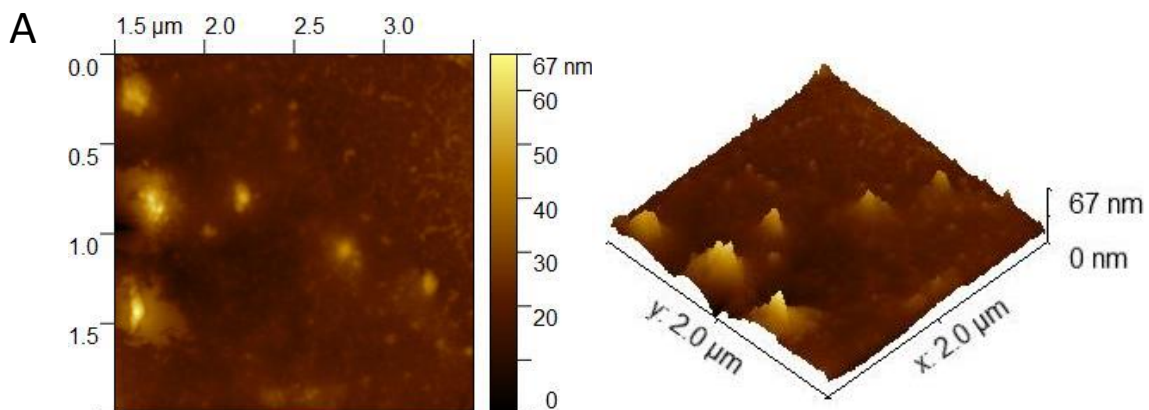


Figura 25. Imagem do tempo de vida de fluorescência do péptido A β A) na ausência de ferro e na presença de concentrações crescentes do ião (A β :Fe – B) 1:0,5; C) 1:1; D) 1;5), às 29h.

3.1.3 Microscopia de força atômica (AFM)

Para confirmar a natureza amilóide do péptido em estudo, quer na ausência e presença de iões, as amostras foram observadas usando AFM.

O péptido isolado apresenta agregados⁶⁷, como é possível verificar pelas Figuras 26. As imagens de AFM, às 0h, mostraram a presença de um certo número oligómeros com um diâmetro de cerca de 67 nm (Figura 26A). Com o aumento do tempo de incubação (30h), um oligómero tornou-se mais saliente, atingindo um valor de 127 nm, comparativamente com os restantes. Neste caso, está-se perante agregados amorfos, uma vez que estes demonstram uma estrutura pouco organizada e uma morfologia indefinida.



B

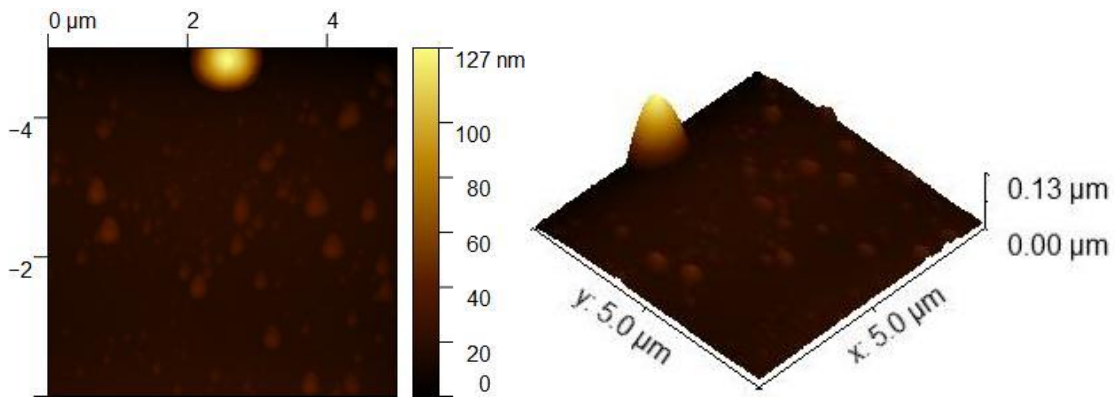


Figura 26. Imagens de AFM de Aβ isolado às A) 0h e B) 30h.

3.1.3.1 Zinco

A presença do íon zinco afetou o comportamento do péptido. Às 0h, está-se na presença de oligómeros de diversas direções, onde os agregados de maiores dimensões atingem um diâmetro de 34 nm. Às 30h Figura 27B, os agregados diminuíram de tamanho, 14 nm, onde a única diferença entre as duas horas, 0h e 30h, é o tamanho dos mesmos.

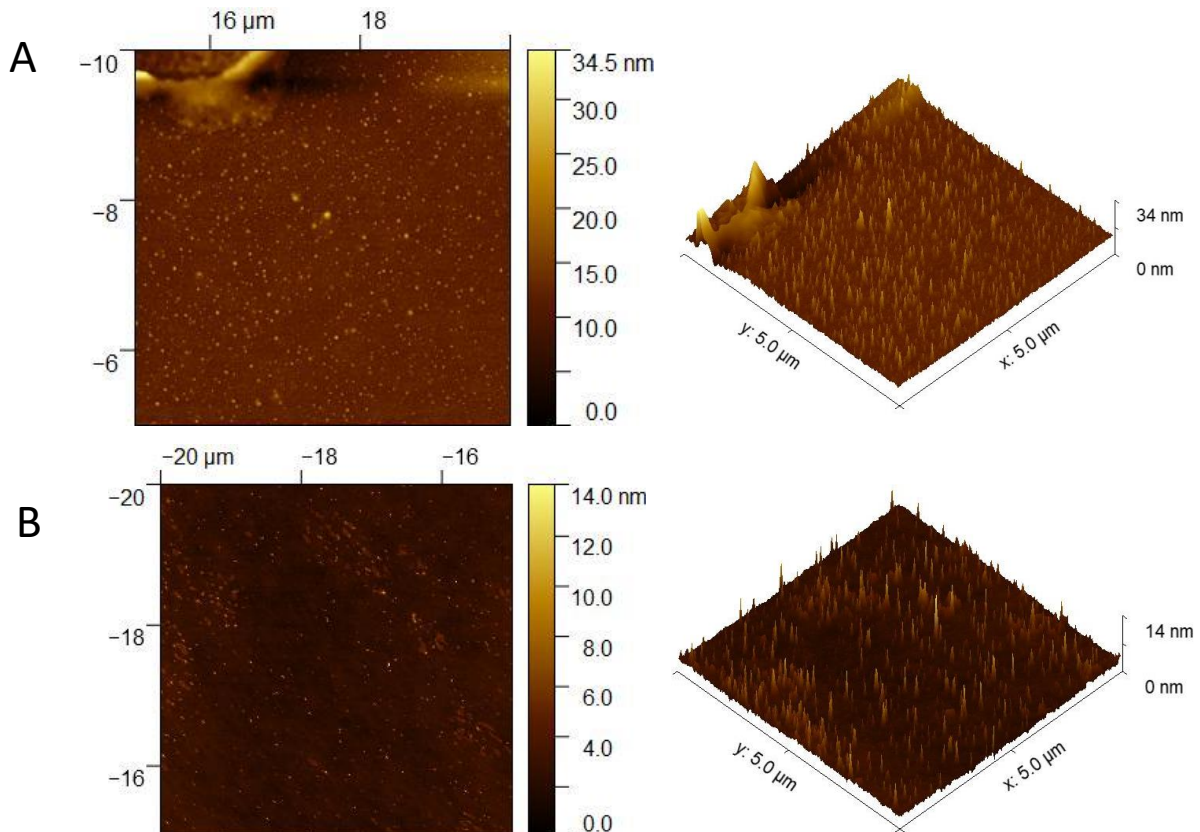


Figura 27. Imagens de AFM de A β :Zn na presença da menor concentração de ião (12,5 μ M – A β :Zn (1:0,5)) às A) 0h e B) 30h.

O aumento da concentração do ião para a proporção equimolar, 25 μ M de ião, levou ao aparecimento de um elevado número agregados às 0h com uma diâmetro de 42 nm. Ao longo do tempo de incubação, os agregados aumentaram de tamanho, atingindo um diâmetro de 13 μ M ao fim de 30h. Estes apresentam-se em menor número com uma forma indefinida.

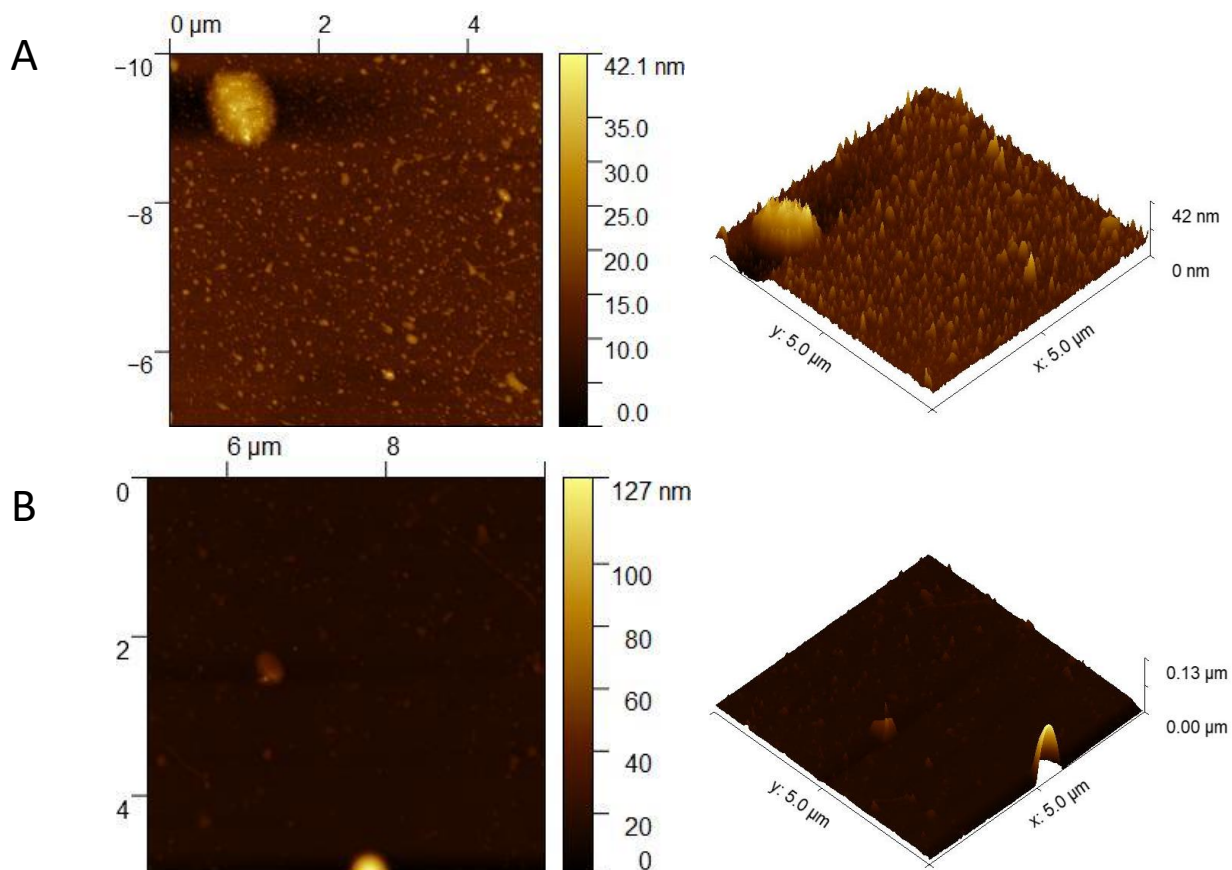


Figura 28. Imagens de AFM de A β :Zn na presença equimolar da concentração de ião (25 μ M – A β :Zn (1:1)) às A) 0h e B) 30h.

3.1.3.2 Cobre

A presença de Cu (II) mostrou maior afinidade para formar agregados amorfos e oligómeros. Pela Figura 29A, é possível visualizar agregados amorfos com elevado tamanho e diâmetro de 133 nm. Com o decorrer das horas, estes diminuíram de tamanho, 62 nm, e encontram-se presentes agregados amorfos e agregados amilóides, onde estes últimos apresentam uma forma linear e não ramificada.

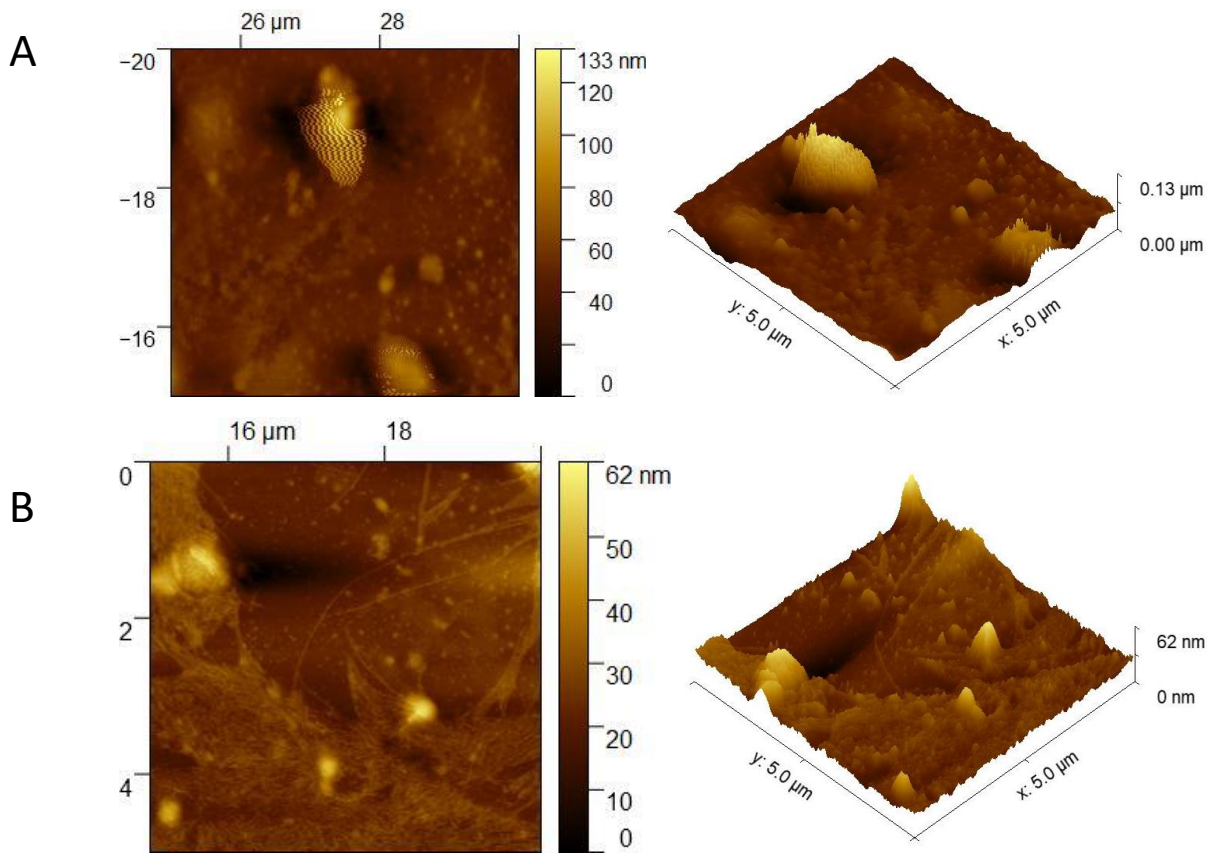
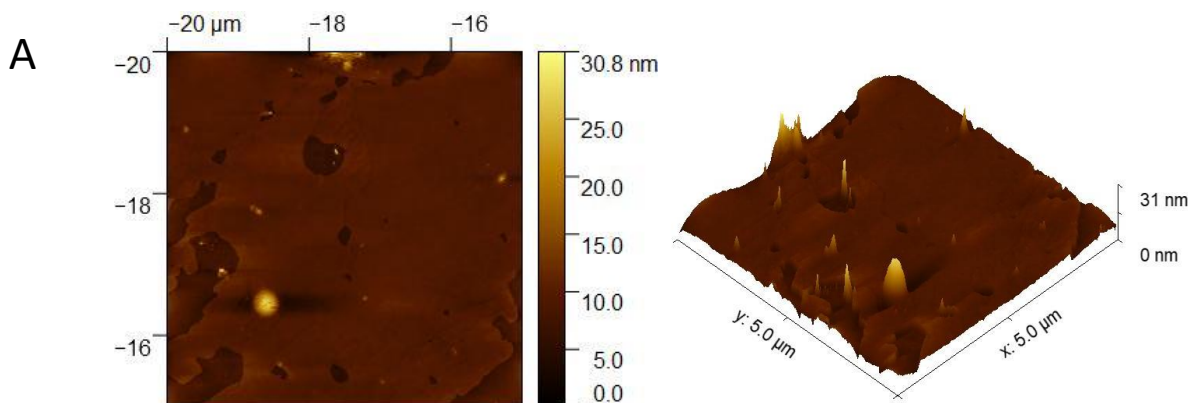


Figura 29. Imagens de AFM de $A\beta:Cu$ na presença de metade da concentração de ião ($12,5 \mu\text{M} - A\beta:Cu$ (1:0,5)) às A) 0h e B) 30h.

Com o aumento da concentração de cobre, às 0h, os agregados apresentam um diâmetro de 31 nm, com uma forma e organização indefinidas. Com o decorrer das horas, os agregados aumentaram de tamanho, 48 nm, contudo a sua forma e organização indefinidas continuou, o que leva a crer a presença de agregados amorfos.



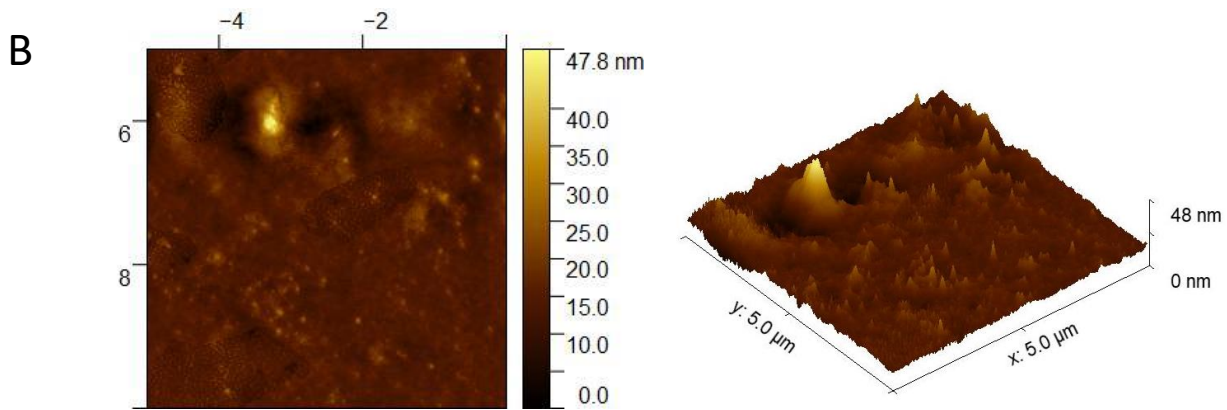


Figura 30. Imagens de AFM de A β :Cu na presença equimolar da concentração de ião (25 μ M – A β :Cu (1:1)) às A) 0h e B) 30h.

A maior concentração de cobre levou ao aparecimento de um elevado número de agregados às 0h com 52 nm, Figura 31A. Estes agregados aumentaram de tamanho ao longo do tempo, conforme mostrado na Figura 31B, onde estes possuem um diâmetro de 125 nm e encontram-se sem forma definida – agregados amorfos.

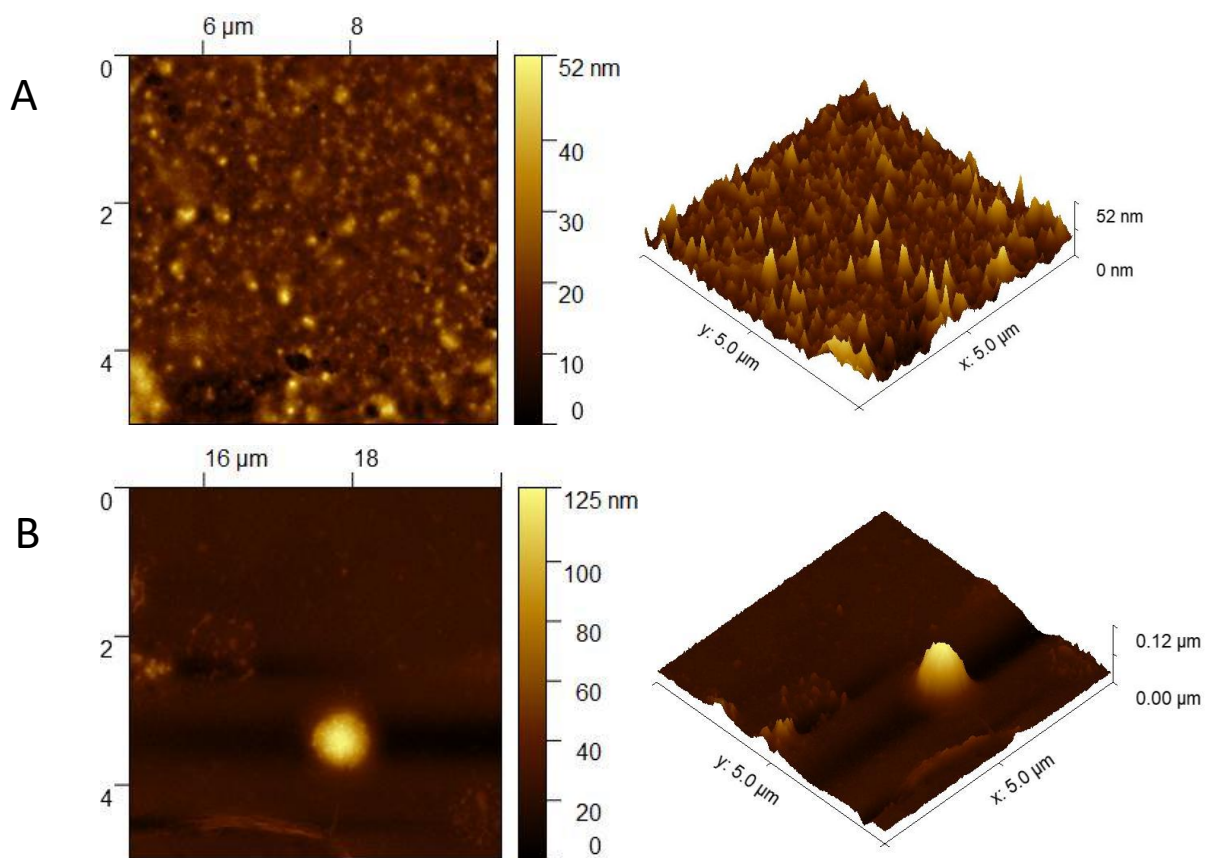


Figura 31. Imagens de AFM de A β :Cu na presença de maior concentração de ião (125 μ M – A β :Cu (1:5)) às A) 0h e B) 30h.

O diâmetro de A β :Cu aumenta com o aumento da concentração do ião. Contudo, isto não se verifica no caso do cobre, uma vez que às 30h o tamanho dos agregados com o aumento da concentração de ião diminui e aumentou. Ou seja, da proporção 1:0,5 para a proporção 1:1 ocorreu uma diminuição no tamanho dos agregados e da proporção equimolar para a proporção 1:5 houve um aumento no tamanho destes. Igualmente, às 0h, o tamanho dos agregados diminuiu e aumentou com o aumento da concentração de cobre, isto é, da proporção 1:0,5 para a proporção 1:1 ocorreu uma diminuição no tamanho dos agregados e da proporção equimolar para a proporção 1:5 houve um aumento no tamanho destes.

3.1.3.3 Ferro

Pelos resultados de AFM, os agregados às 0h, Figura 32A, possuem uma forma amorfa com um tamanho de 79 nm. Ao fim de 30h, estes apresentam-se com 166 nm de diâmetro, Figura 32B, onde ocorreu um aumento no tamanho destes.

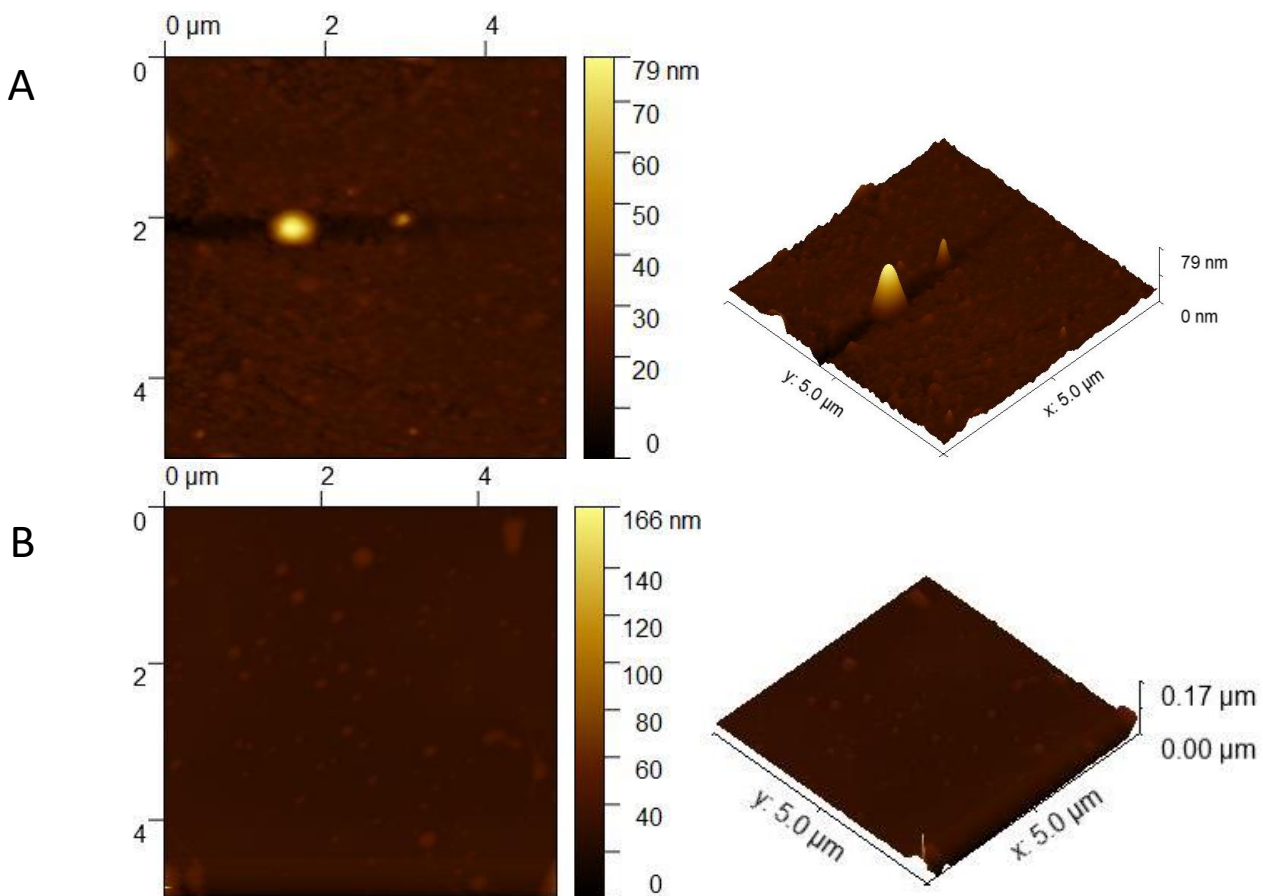


Figura 32. Imagens de AFM de A β na presença de metade da concentração de ião (12,5 μ M – A β :Fe (1:0,5)) A) às 0h e B) às 30h.

Na proporção equimolar, a presença de ferro parece não ter afetado a agregação, uma vez que o número de agregados se manteve minimamente constante, onde ocorreu um aumento de tamanho destes de 80 nm para 253 nm.

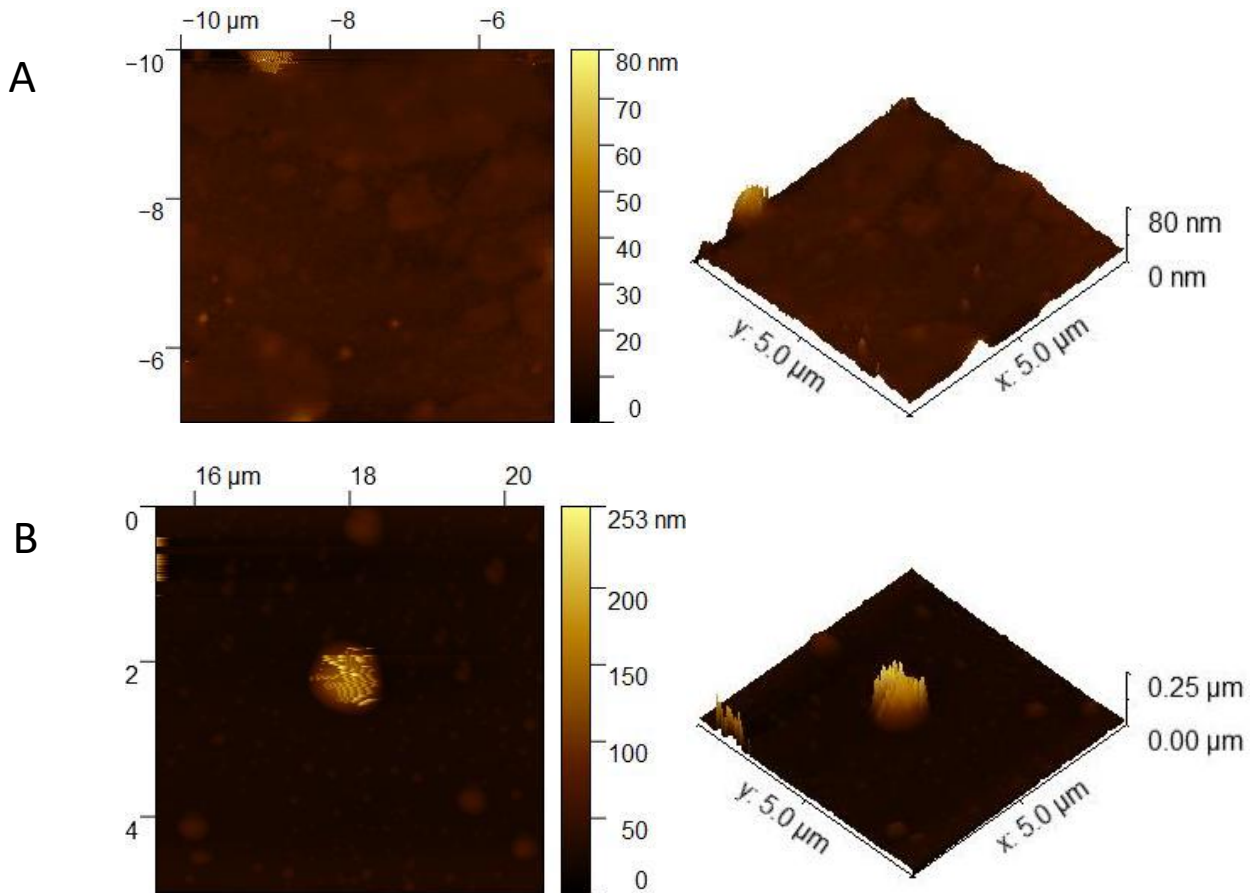


Figura 33. Imagens de AFM de A β na presença da mesma concentração de ião (25 μ M – A β :Fe (1:1)) às 30h.

A concentração mais elevada de ferro levou ao aparecimento de agregados com um tamanho de 256 nm às 30h, apresentando-se como agregados amorfos com uma organização desordenada e sem morfologia definida. Estes aumentaram de tamanho ao fim de 30h, apresentando-se inicialmente com um tamanho de 90 nm.

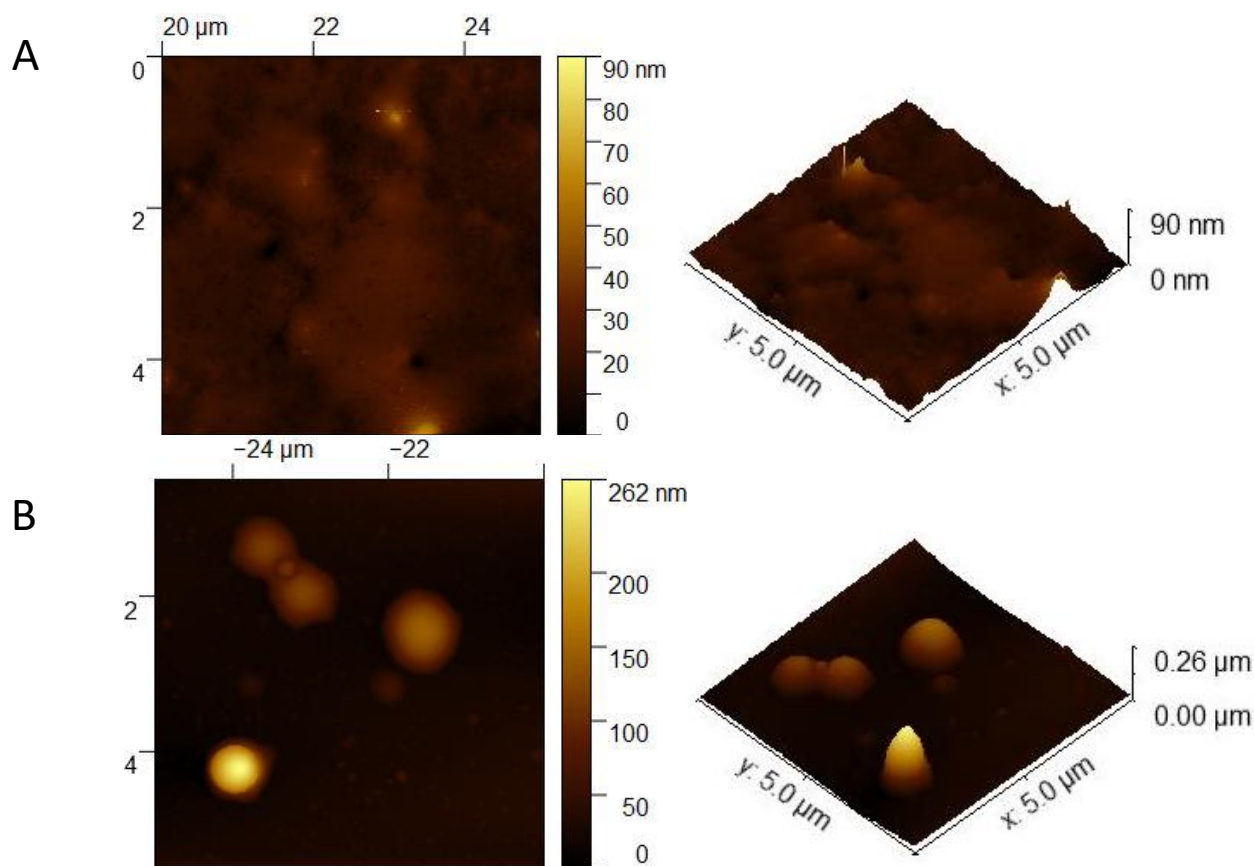


Figura 34. Imagens de AFM de A β na presença da maior concentração de ião (125 μ M – A β :Fe (1:5)) às A) 0h e B) 30h.

3.1.4 Fluorescência, FLIM e AFM

A incubação de A β 42 foi realizada na presença de Zn(II), um ião metálico conhecido por induzir agregação rápida em péptidos A β . Um aumento contínuo no sinal de fluorescência foi registado para a ausência de ião e para as duas maiores proporções deste (1:1 e 1:5). O sinal de fluorescência para a menor concentração de zinco (1:0,5) atingiu valores bem superiores às outras proporções. Embora o sinal tenha diminuído nas primeiras 2h, a intensidade continuou a aumentar após as 3h, e um sinal ainda maior foi registado às 24h. Nestas condições os agregados, essencialmente amilóides com o aumento do tempo de incubação, tornaram-se amorfos, com o mesmo tempo de vida de fluorescência o que leva a crer no não aumento no número de agregados. Da autofluorescência conclui-se que com o decorrer das horas, a intensidade aumenta, pelo que ocorre agregação, havendo um aumento na velocidade desta. Da dispersão de luz, até às 14h de incubação os valores da dispersão de luz e o número de agregados manteve-se consideravelmente constante. Após as 14h, verifica-se aumento na intensidade o que

corresponde a um aumento no número de agregados, contudo este acontecimento não é apoiado pelas imagens de FLIM e AFM, uma vez que aparentemente o número de agregados se manteve constante, apenas ocorreu alteração da forma dos mesmos.

A velocidade de agregação foi aumentada na presença de 12.5 μM de zinco, enquanto as outras concentrações de iões não aumentaram a velocidade. Na concentração equimolar os agregados apresentaram uma estrutura fibrilar com um tempo de vida curto.

Tabela 2. Resumo dos dados obtidos para o ião zinco nas diferentes concentrações para as três técnicas estudadas, durante 29h de incubação.

[A β :zinco] Técnica	25 μM :0 μM (1:0)	25 μM :12.5 μM (1:0,5)	25 μM :25 μM (1:1)	25 μM :125 μM (1:5)
Fluorescência	Aumento Amilóides	Aumento	Constante	Constante
FLIM	Agregados amilóides	Agregados amilóides	Agregados amilóides	
AFM	Agregados amorfos	Agregados amorfos		

Surpreendentemente, poucos dados foram publicados relativamente ao tempo integral da cinética de agregação de A β 42 após adição de quantidades subequimolares de Cu(II). Identificou-se apenas um desses estudos, que demonstra que o tempo de atraso da formação de agregados é aumentado após a adição de quantidades menores de Cu(II) relativamente ao péptido, contudo as fibrilas são formadas. Sarell et al. observou um tempo de latência reduzido³⁰, mas os dados apresentados posteriormente por Matheou et al. (pelo mesmo grupo de pesquisa) não apoiou esta conclusão³¹, demonstrando a dificuldade de obtenção de resultados reprodutíveis neste campo.

Para A β 42, há consenso de que Cu(II) aumenta o tempo de latência e diminui a taxa de alongamento em todas as condições experimentais testadas (para Cu(II):A β <1).¹⁵

Segundo os resultados obtidos na presença da concentração mais baixa de cobre afeta a formação de conjuntos moleculares em comparação com as restantes concentrações. A presença de 12.5 μM de cobre (A β :Cu – 1:0.5), desencadeou um aumento na agregação com aumento da intensidade de fluorescência, onde apresentou um comportamento sigmoidal. Todas as condições, exceto a razão equimolar (1:1), provocaram aceleração da agregação, onde a razão 1:0,5 foi a que provocou maior

aceleração. O número de agregados aumentou e com o aumento do tempo de incubação, com os resultados obtidos por FLIM, formaram-se fibrilas não amilóides e em menor número fibrilas amilóides. No caso de AFM, formaram-se agregados amilóides e agregados amorfos. Na ausência deste, por AFM, o péptido apresenta agregados com uma estrutura aleatória, em grande número. A concentração equimolar apresentou valores de fluorescência inferiores a A β isolado, pelo que não promove agregação do péptido. Isto confirma-se por FLIM, uma vez que às 30h apresenta apenas pequenos fragmentos. A presença deste ião metálico indica que o Cu(II) inibe a formação de fibrilas, embora em alguns casos sejam formados agregados. As imagens FLIM e AFM exibem pequenas estruturas, possivelmente, protofibrilares semelhantes às protofibrilas observadas na ausência de iões metálicos, bem como formas amorfas e agregados solúveis.¹⁵ Tougu et al. observaram fibrilas após incubação muito longa da amostra A β :Cu(II), o que implica que Cu(II) não previne totalmente a formação de fibrilas em condições equimolares.³²

Na maior concentração de cobre, os valores de fluorescência são superiores aos valores do péptido isolado, onde, supostamente, há um aumento na velocidade de agregação do péptido. Contudo, estes dados são corroborados pelos resultados obtidos por FLIM e AFM. Apesar da curva de fluorescência exibir, nestas condições, um comportamento sigmoidal simples, que corresponde à indução de agregados amilóides, nas imagens FLIM e AFM apenas se encontram presentes pequenos fragmentos sem organização definida, agregados amorfos. Um efeito mais dramático é observado ao adicionar uma concentração superior de Cu(II) em solução relativamente ao péptido. Innocenti et al. aplicando AFM *in situ*, não observou a formação de fibrilas na presença de Cu(II).¹⁵ Quando concentrações supra-equimolares de Cu(II) são adicionadas a A β 42, a maioria dos estudos mostra que a formação de fibrilas é abolida³¹ ou diminuiu significativamente e os agregados formados apresentam morfologia amorfa.^{33,34} Nenhuma formação de fibrilas foi observada após períodos longos de incubação, indicando que os agregados amorfos podem representar o produto final de uma via de agregação alternativa.

Tabela 3. Resumo dos dados obtidos para o ião cobre nas diferentes concentrações para as três técnicas estudadas, durante 29h de incubação.

[A β :cobre] Técnica	25 μ M:0 μ M (1:0)	25 μ M:12.5 μ M (1:0,5)	25 μ M:25 μ M (1:1)	25 μ M:125 μ M (1:5)
Fluorescência	Aumento	Aumento	Aumento	Aumento
FLIM	Agregados amorfos	Agregados amorfos e amilóides	Pequenos fragmentos	Agregados amorfos
AFM	Agregados amorfos	Agregados amorfos e amilóides	Agregados amorfos	Agregados amorfos

A presença de ferro aumentou as intensidades de fluorescência tanto na presença da sua menor concentração, como na concentração equimolar, como referido anteriormente. Após a adição de 25 μ M Fe(II) a A β 42 na proporção de 1:1, a intensidade de fluorescência durante o período de incubação de 29h aumentou drasticamente, como mostrado na Figura 16A. Até às 10h, a intensidade aumentou de forma crescente, havendo uma estabilização das estruturas após as 10h de incubação. Nestas condições houve um aumento na velocidade de agregação.

Semelhante aos resultados na ausência dos outros iões metálicos e na presença da maior concentração do ião, inicialmente a intensidade de fluorescência manteve-se praticamente constante, com o decorrer das horas ocorreu um aumento da intensidade, assim como para as outras concentrações de ferro, onde o platô foi atingido após as 24h. Observa-se, assim, um tempo de atraso antes da formação de estruturas de folhas β que ocorrem após \sim 5h, embora em maior extensão para 12.5 μ M de ião.

Os resultados observados deram uma indicação do efeito de Fe(II) na agregação de A β 42, que pode ser atribuído a uma perda e ganho de afinidade de ligação entre o ião Fe(II) e a região de ligação ao metal do péptido A β . Em geral, uma estrutura peptídica mais condensada formada na influência deste ião, mostrou que o ferro tem a capacidade de retardar a formação de estruturas de folha- β maduras e favorece espécies de agregados menores.

Perante os resultados obtidos nas experiências de microscopia, existe concordância entre ambos relativamente aos agregados formados. Como dito anteriormente, quanto menor for o tempo de vida de fluorescência, maior a quantidade de agregados de proteína formadora de amilóides. Posto isto, a presença de 12.5 μ M na proporção 1:0,5 e de 25 μ M na proporção 1:1, demonstram isto mesmo por apresentarem um tempo de vida relativamente curto com aparecimento de agregados.

Os resultados de AFM confirmaram esta observação pelo aparecimento de um número considerável de estruturas fibrilares e agregados dispersos com agregados fibrilares e pré-fibrilares mais densos nas amostras contendo as maiores concentrações de Fe.

Tabela 4. Resumo dos dados obtidos para o ião ferro nas diferentes concentrações para as três técnicas estudadas, durante 29h de incubação.

[A β :ferro] Técnica	25 μ M:0 μ M (1:0)	25 μ M:12.5 μ M (1:0,5)	25 μ M:25 μ M (1:1)	25 μ M:125 μ M (1:5)
Fluorescência	Constante	Aumento	Aumento	Constante
FLIM	Alguns agregados	Agregados amilóides e amorfos	Agregados amorfos	Agregados amorfos
AFM	Agregados amorfos	Ausência de agregados	Agregados amorfos	Agregados amorfos

Como referido anteriormente, na ausência de iões, A β tem tendência a formar agregados amilóides com o aumento do tempo de incubação. Contudo, os resultados de FLIM e AFM não vão de acordo com esta afirmação, uma vez que apresentam nas suas imagens agregados sem forma, organização e morfologia definidas. Isto torna-se uma adversidade, uma vez que se trata do controlo de toda a experiência, relativamente a A β .

Resumidamente, os resultados de FLIM e AFM corroboraram os dados obtidos da auto-fluorescência, uma vez que não ocorreu o aparecimento de um número considerável de estruturas fibrilares e agregados dispersos com agregados fibrilares e pré-fibrilares mais densos.

3.3 Lisozima

A lisozima da clara do ovo de galinha é uma proteína arquetípica que tem sido amplamente utilizada para entender o mecanismo de dobramento de proteínas, dobramento incorreto e formação de amilóide. Trata-se de uma das várias proteínas que permite estudar agregação amilóide, pelo facto de apresentar fluorescência na região do visível, apenas quando se encontra agregada, pois isolada não exhibe. O aparecimento de uma nova banda de fluorescência na região do visível ($\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$), após excitação a $\sim 350 \text{ nm}$, é possivelmente uma característica da formação de agregados amilóides.⁷⁰ Esta nova banda ocorre devido à formação de ligações de hidrogénio intra e intermoleculares, oxidação de resíduos aromáticos e deslocação

eletrónica causada por pontes de hidrogénio na folha- β da estrutura amilóide. O efeito das condições de solução, tais como compostos desnaturantes, como por exemplo, SDS em condições alcalinas, foi estudado recentemente por Moosavi-Movahedi et al.⁶⁸ Krebs et al.⁶⁹ obteve agregados amilóides de HEWL utilizando uma variedade de métodos, como a incubação da proteína em solução ácida (pH 2,0-4,0) a temperaturas elevadas (37-65 °C) por vários dias. Estes agregados também podem ser obtidos incubando a proteína a pH neutro na presença de trifluoroetanol ou etanol, onde ambos desestabilizam a estrutura proteica nativa e favorecem a agregação de proteínas.⁶⁷ Posto isto, foi induzida a agregação da lisozima através de sete protocolos promotores de agregação, onde se encontram explícitos na secção 2.2.

3.3.1 Fluorescência

No presente estudo, a formação amilóide de HEWL foi induzida termicamente pela incubação da proteína a 60°C sob condições ácidas (tampão glicina-HCl 50 mM, pH 2,2) sem agitação, e a cinética de agregação foi monitorada medindo a autofluorescência dos agregados de proteína ao longo tempo (Figura 35A). Um aumento da autofluorescência após a agregação de HEWL é observado e aumenta gradualmente ao longo do tempo com uma emissão máxima aproximadamente de 450 nm, banda conhecida como sinal da formação de agregados amilóides.^{85,86}

O principal efeito do álcool como co-solvente é reduzir a hidratação no estado inicial e, como resultado, as conformações α -hélice podem se expandir ligeiramente. Além disso, há muito pouca interação com o núcleo hidrofóbico e, conseqüentemente, pouco efeito sobre a estrutura ou mobilidade do HEWL no início da experiência. Tais espécies parcialmente desdobradas associam-se umas às outras e eventualmente formam um “núcleo” que inicia o processo de crescimento interagindo com espécies mais estáveis. Ao longo dos 14 dias em etanol a 90%, HEWL exibe um aumento exponencial entre os dias 5 e 12 (Figura 35B), podendo se tratar da fase de crescimento dos agregados amilóides, onde a presença da solução concentrada de etanol pode promover interações que promovem a nucleação e o deposição de fibrilas. Para confirmar ainda mais a presença de agregados amilóides uma banda

aproximadamente a 430 nm é exibida, Figura 35B, sendo esta característica deste tipo de agregados.

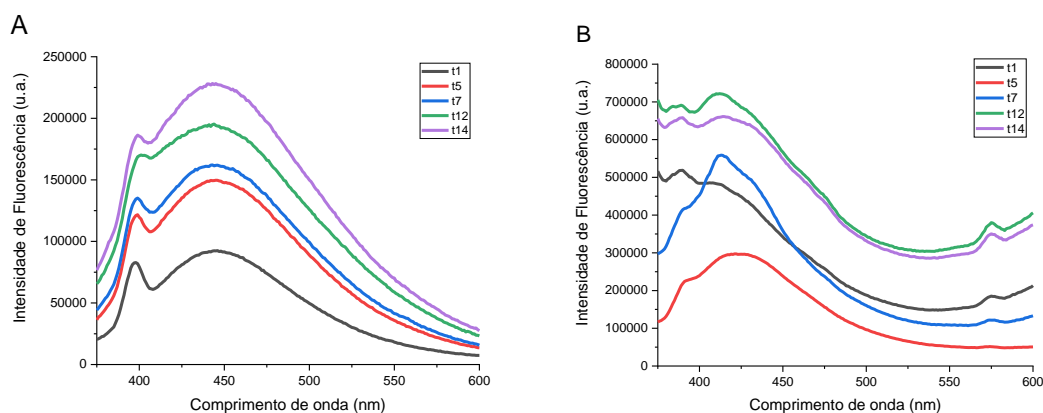


Figura 35. Espectro de emissão da lisozima a A) pH 2.2, na presença de Gly-HCl a elevada temperatura e B) em 90% de etanol a pH 7.5, ao longo de um período de incubação de 14 dias.

A banda de emissão de fluorescência mais importante tem seu máximo em torno de 450 nm, banda característica de se estar na presença de agregados amilóides, indicando assim a agregação das moléculas de HEWL. Apresenta uma intensidade máxima de 80 000 u.a. e 150 000 u.a., Figura 36C e Figura 36D, respetivamente.

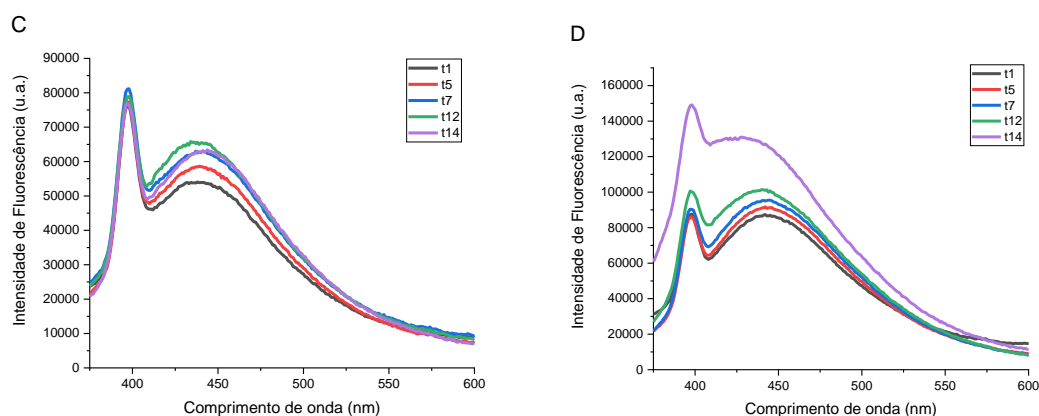


Figura 36. Espectro de emissão da lisozima a C) em 2 M de ureia a pH 7.5 e D) em 200 μM de SDS na presença de Gly-NaOH a pH 9, ao longo de um período de incubação de 14 dias.

Na presença de SDS pH reduzido, há uma diminuição na intensidade de fluorescência. Neste caso, não se encontra presente uma banda acentuada a 450 nm, característica da presença de agregados amilóides, podendo-se afirmar estar na

presença de agregados amorfos, Figura 37E. A este comprimento de onda está a ser detetado algo, contudo com valores muito baixos, não aumentando ao longo do tempo.

Contrariamente, na presença de DTT e TCEP, Figura 37F e 38, respetivamente, a banda característica de fibrilas amiloides encontra-se exibida, aproximadamente a 450 nm.

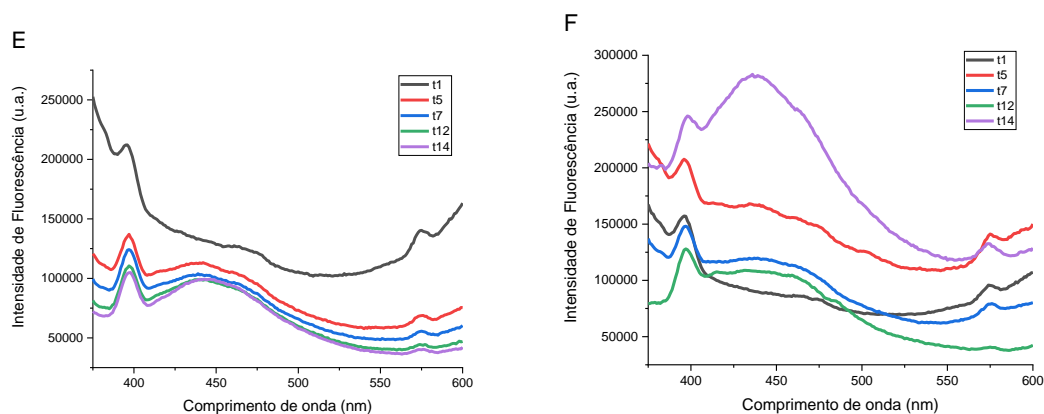


Figura 37. Espectro de emissão da lisozima a E) em 200 μ M de SDS na presença de Gly-HCl a pH 2.2 e F) 2 mM de DTT, ao longo de um período de incubação de 14 dias.

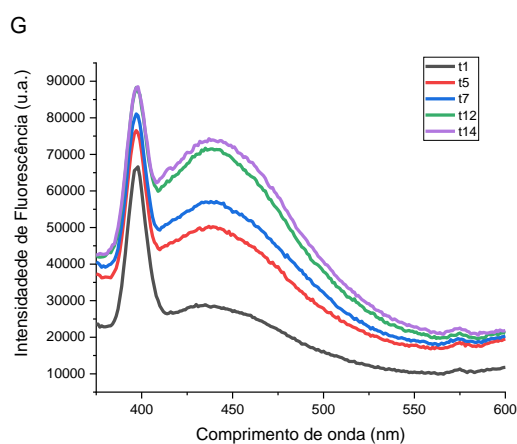


Figura 38. Espectro de emissão da lisozima 10 mM de TCEP no solvente HEPES a pH 7.5 e 37°C ao longo de um período de incubação de 14 dias.

A Figura 39A, representa a medição dos espectros de emissão da lisozima ao longo do período de incubação de 14 dias, para os diferentes agregados, a um comprimento de onda de 450 nm, onde é possível verificar a evolução que cada condição de agregação provoca. A Figura 39B, representa os valores de intensidade de

fluorescência normalizados entre 0 e 1, de modo melhorar a visualização de cada protocolo.

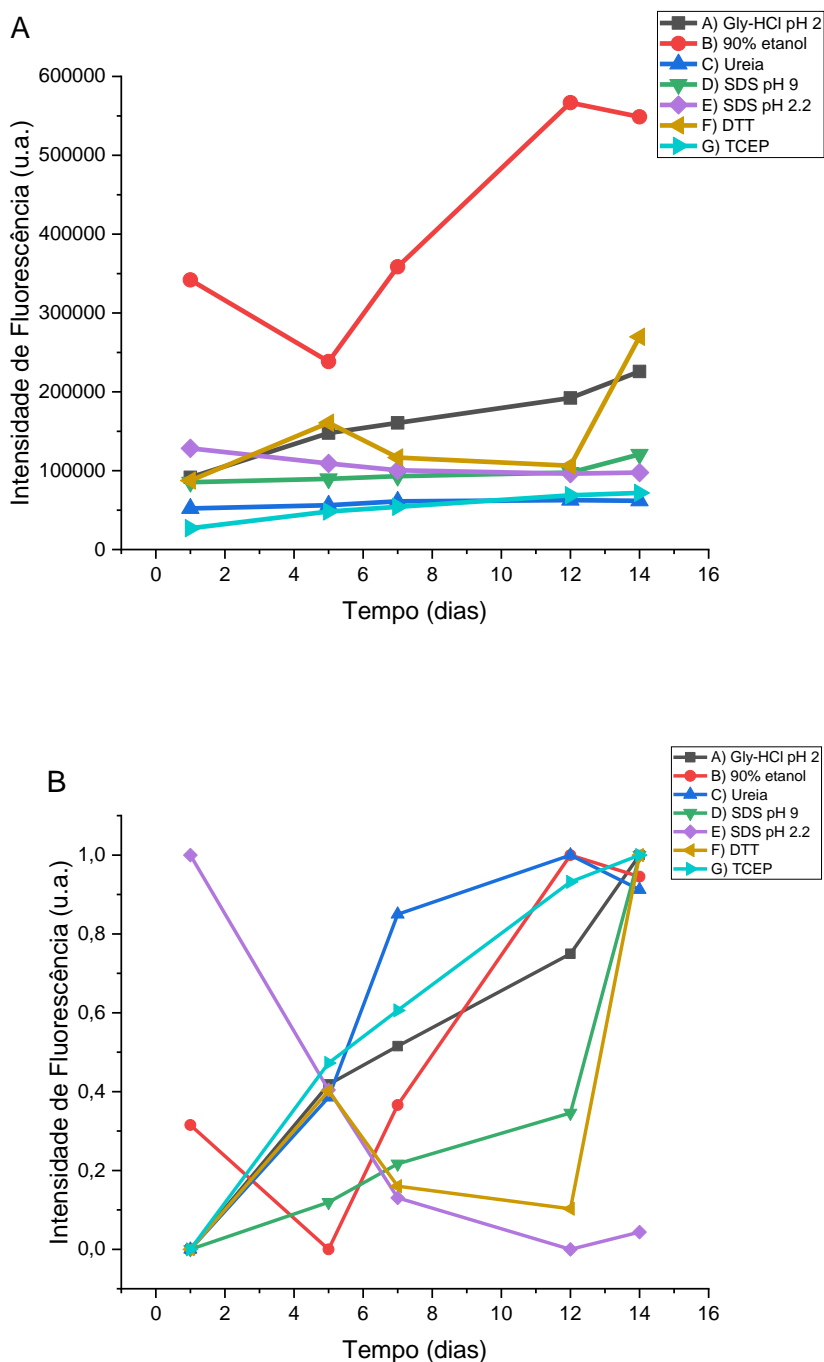


Figura 39. A) Intensidade de fluorescência medida nos espectros de emissão da lisozima ao longo do período de incubação de 14 dias, para os diferentes agregados, a um comprimento de onda de 450 nm. (A) Gly-HCl, pH 2 e 60°C; (B) 90% de etanol a pH 7.5; (C) 2 M de ureia a pH 7.5; (D) 200 µM de SDS a pH 9; (E) 200 µM de SDS a pH 2.2 a 37 °C; (F) 2 mM de DTT a pH 2; (G) 10 mM de TCEP a pH 7.5 e a 37°C. B) Intensidade de fluorescência normalizada entre 0 e 1 para os sete protocolos promotores de agregação.

3.3.2 Microscopia de tempos de vida de fluorescência (FLIM)

3.3.2.1 Glicina-HCl, pH 2, 60°C

Observando as imagens obtidas através de FLIM pode-se verificar a presença de pequenos agregados na imagem inicial da solução HEWL (dia 0), sendo que ao longo do tempo o número de agregados tende a aumentar. Estes tendem a adquirir uma forma pouco definida, contudo alguns agregados, ao fim de 7 dias, assumem uma organização ordenada com uma forma fibrilar. Após 14 dias de incubação, está-se na presença de fibrilas bem definidas com uma estrutura longa, linear e não ramificada. Posto isto, estas condições de agregação promovem a agregação, onde os agregados formados são agregados amilóides. Ao longo dos dias o tempo de vida de fluorescência manteve-se relativamente constante, tratando-se de um tempo de vida baixo.

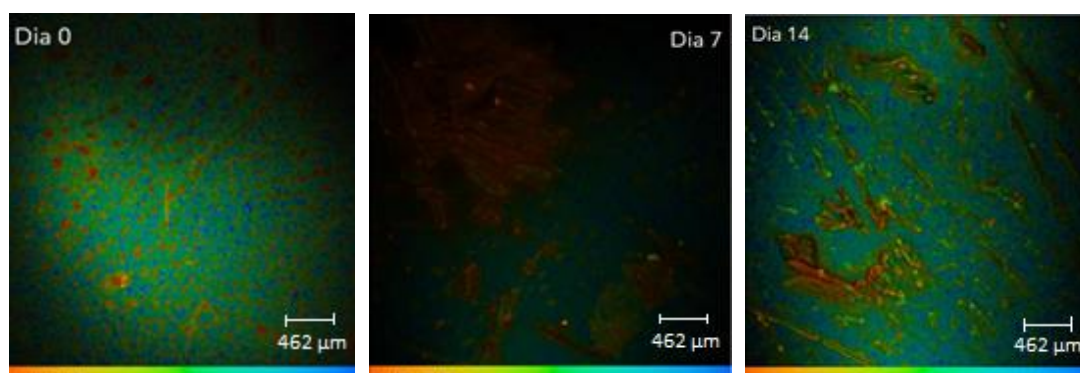


Figura 40. Imagens de fluorescência da lisozima na presença de Gly-HCl a pH 2 e temperatura a 60°C nos dias 0, 7 e 14.

3.3.2.2 90% Etanol, temperatura ambiente, pH 7.5

Recentemente, um estudo que recorreu a estas condições, permitiu concluir que a conversão em fibrilas amilóides é muito eficiente nas mesmas.²⁸

Inicialmente, no dia 0, verifica-se a presença de pequenos agregados, com um tempo de vida de fluorescência consideravelmente baixo. Ao fim dos 7 dias, o tempo de vida manteve-se, contudo, o número de agregados aumentou significativamente, onde estes apresentam-se sem organização e morfologia definida. Ao fim de 14 dias, o tempo de vida aumentou (passando da cor amarelada para um verde-escuro) e o número de

agregados acompanhou este aumento. Por fim, é possível concluir, pelos resultados obtidos e observações efetuadas, que se está na presença de agregados amorfos, o que vai contra o estudo referido inicialmente.

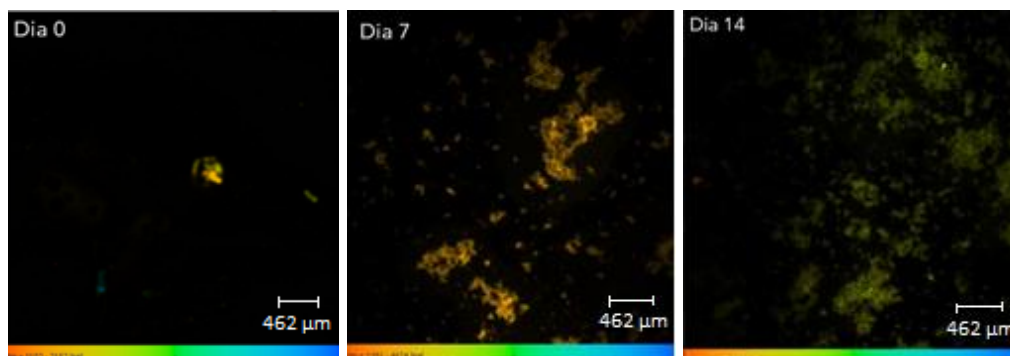


Figura 41. Imagens de fluorescência da lisozima na presença de 90% de etanol a pH 7.5 e temperatura ambiente nos dias 0, 7 e 14.

3.3.2.3 2M ureia, pH 7.5, temperatura ambiente

A ureia tem-se mostrado um agente agregativo muito fraco e nenhuma formação de fibrilas ocorre em diferentes concentrações.²⁹

Nas condições usadas, no dia 0, é possível verificar a presença de agregados com um tempo de vida médio, contudo existem pelo menos dois agregados que apresentam um tempo de vida baixo (cor de laranja). Estes agregados parecem-se com fibrilas, contudo existe alguma dificuldade em o afirmar, uma vez que parecem agregados ramificados, onde alguns deles não se apresentam lineares. Ao longo dos 7 dias, os agregados assumiram uma organização ordenada com uma morfologia bem definida, onde o tempo de vida aumentou consideravelmente (cor azul - máximo). Após 14 dias, o tempo de vida apresentou-se de duas formas: na imagem do dia 14 à esquerda apresentou uma cor mais acastanhada, pelo que ocorreu uma diminuição drástica no tempo de vida de fluorescência; na imagem do dia 14 à direita a cor azul manteve-se e, conseqüentemente, o tempo de vida também. Neste caso, é possível observar algumas fibrilas, com uma forma linear e uma estrutura longa, porém não se está apenas na presença destas. Possivelmente, nestas condições, ocorreu a formação de sais visíveis na imagem do dia 14.

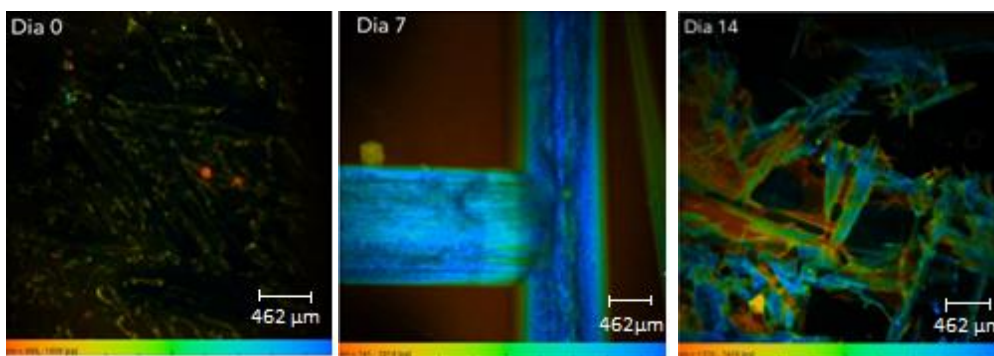


Figura 42. Imagens de fluorescência da lisozima na presença de 2 M de ureia a pH 7.5 e temperatura ambiente nos dias 0, 7 e 14.

3.3.2.4 200 μ M SDS, Gly-NaOH, temperatura ambiente, pH 9

Segundo a análise das imagens de fluorescência, com o aumento do período de dias, nestas condições, a presença de agregados amilóides é notória, desde o dia 0. Estes aumentam de tamanho e a sua quantidade acompanha este aumento. Apresentam uma estrutura alongada, linear e não ramificada, como é possível observar ao longo dos 14 dias. O tempo de vida manteve-se consideravelmente constante, com uma cor de laranja, ou seja, um tempo de vida de fluorescência baixo.

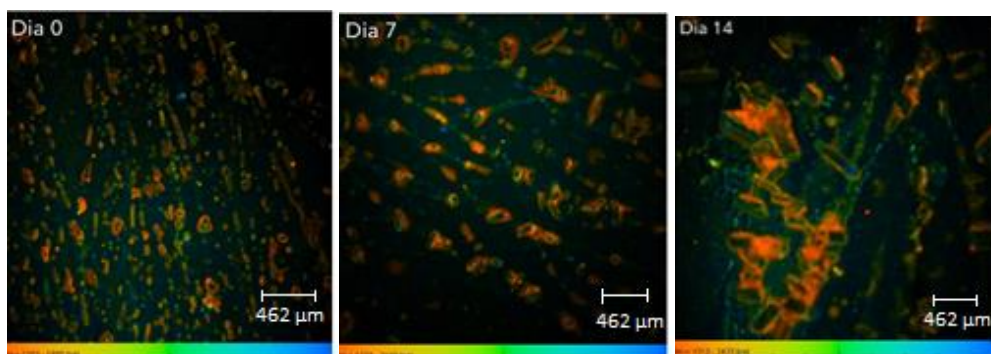


Figura 43. Imagens de fluorescência da lisozima na presença de 200 μ M SDS, Glicina-NaOH, temperatura ambiente, pH 9 nos dias 0, 7 e 14.

3.3.2.5 200 μ M SDS, Gly-HCl, temperatura ambiente, pH 2.2

Segundo os resultados nestas condições, no dia 0, estão presentes agregados, pelo que a imagem FLIM aparenta o aparecimento de um agregado de elevadas dimensões, ainda que amorfo, devido à sua forma e falta de organização definida. Ao

longo dos restantes dias, dias 7 e 14, não houve uma evolução notória, apenas se verifica a separação do agregado existente no dia 0, formando agregados com menor tamanho. Relativamente ao tempo de vida de fluorescência, este inicialmente apresenta uma cor entre o verde e o azul, tratando-se de um tempo de vida médio. Nos dias 7 e 14, este apresenta uma cor acastanhada, pelo que ocorreu uma diminuição no tempo de vida de fluorescência.

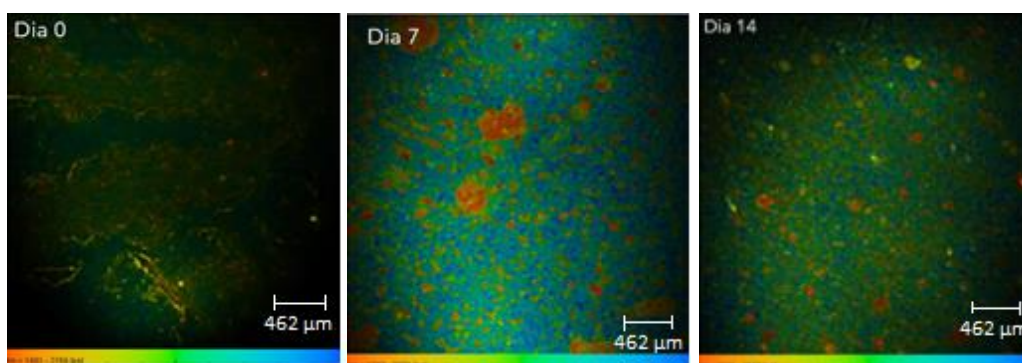


Figura 44. Imagens de fluorescência da lisozima na presença de 200 μ M SDS, Gly-HCl, temperatura ambiente, pH 2.2 nos dias 0, 7 e 14.

3.3.2.6 2 mM DTT, tampão fosfato, pH 7.5, T = 37°C

Inicialmente, os agregados presentes na imagem do dia 0, apresentam-se desordenadas, sem forma definida, podendo-se afirmar a presença de agregados amorfos. Exibem uma cor acastanhada, pelo que possuem um tempo de vida de fluorescência baixo. Nos dias 7 e 14, os agregados demonstram-se mais nítidos, mas mantendo a forma indefinida e sem organização. O tempo de vida de fluorescência do dia 0 para o dia 7 aumentou (agregados amarelados) e o mesmo ocorreu do dia 7 para o dia 14, onde os agregados apresentam uma cor esverdeada e apresentam-se mais longos.

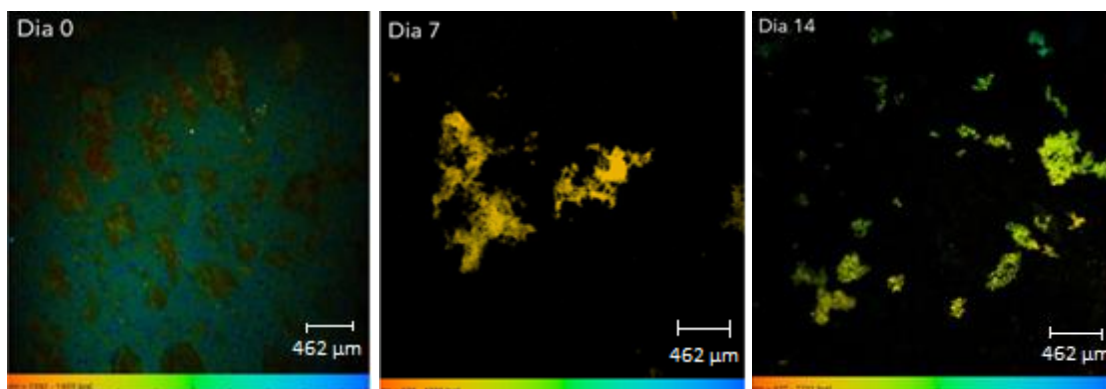


Figura 45. Imagens de fluorescência da lisozima na presença de 2 mM DTT, tampão fosfato, pH=7.5, T = 37°C nos dias 0, 7 e 14.

3.3.2.7 10 mM TCEP, tampão HEPES, T = 37°C

A imagem FLIM do dia 0 possui agregados, onde estes apresentam um tamanho considerável e uma forma não definida, apresentando também um tempo de vida de fluorescência baixo, uma vez que exibem uma cor de laranja. Após 14 dias, estes agregados mantiveram o tempo de vida de fluorescência, porém obtiveram uma organização ordenada com um padrão paralelo e ortogonal. Contudo, a sua forma permite afirmar a presença de agregados amorfos nestas condições.

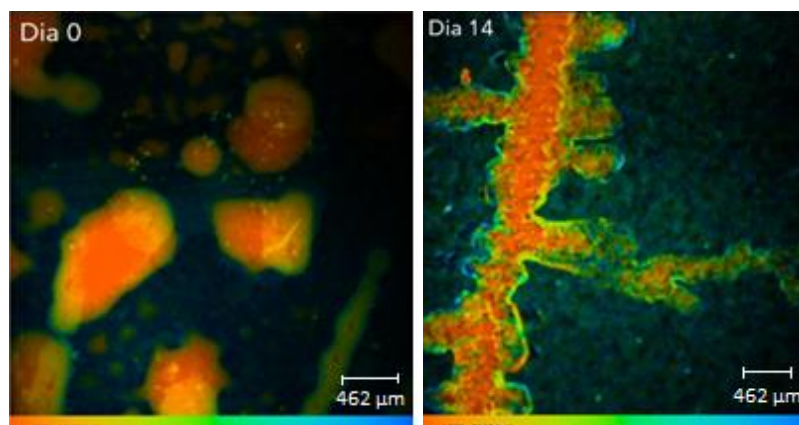


Figura 46. Imagens de fluorescência da lisozima na presença de 10 mM TCEP, tampão HEPES, T=37°C dos dias 0 e 14.

3.3.3 Fluorescência e FLIM

Nas condições iniciais dos estudos citados, a estrutura da lisozima é muito semelhante à sua estrutura nativa. Ao longo de um determinado período de tempo que as condições experimentais variam, a lisozima sofre uma mudança conformacional que

permite a formação de uma estrutura mais rica em folhas- β . Embora tenha sido sugerido que algumas proteínas podem formar amilóide diretamente no estado nativo, dados experimentais indicam que isso é altamente improvável para a lisozima e os seus análogos.²⁸

Estudos em condições aquosas e em solventes predominantemente orgânicos sugerem que a formação de amilóides para a lisozima envolve estados parcialmente dobrados. O desdobramento parcial torna as proteínas mais suscetíveis à formação de fibrilas e pode ser induzida em condições de laboratório pela adição de co-solventes orgânicos, sais e/ou desnaturantes. Isto leva à exposição do núcleo hidrofóbico e subsequente rearranjo da proteína/péptido a uma variedade de diferentes estados conformacionais, alguns dos quais são estruturas fibrilares bem definidas.

Em condições ácidas, a formação de agregados amilóides é indiscutível, uma vez que se confirma pelas duas técnicas. Através da fluorescência, Figura 35A, onde a banda característica destes se encontra bem acentuada, com um valor elevado de intensidade de fluorescência aproximadamente de 255 000 u.a. e através de FLIM, onde as fibras ao longo do tempo se tornam mais longas e visíveis.

Em etanol 90%, as interações entre as cadeias laterais e o solvente tornam-se mais favoráveis, assim como as interações intermoleculares entre as moléculas de HEWL. O efeito hidrofóbico é um fator importante no dobramento e manutenção da estrutura da proteína em ambientes aquosos, mas é menos significativo em solventes predominantemente orgânicos devido ao enfraquecimento das interações hidrofóbicas entre as cadeias laterais. A formação de qualquer estrutura rica em folhas- β requer extensas ligações de hidrogénio envolvendo o esqueleto peptídico. No solvente álcool, essas ligações de hidrogénio são mais fortes do que em ambiente aquoso. As mudanças estruturais continuam até que, finalmente, os dímeros se associam a uma massa crítica e inicia-se a fase de crescimento. Neste ponto, começa-se a detectar agregados maiores que também possuem as propriedades de agregados amilóides. O principal efeito do álcool como co-solvente é reduzir a hidratação no estado inicial e, como resultado, as conformações α -hélice expandem-se. Contudo a formação de fibrilas amilóides nestas condições não se encontra representada, uma vez que a banda a 450 nm (Figura 35B) encontra ausente, pelo que se pode realmente estar na ausência de agregados

amilóides. Para confirmar esta ausência, as imagens FLIM permitem confirmar a origem dos agregados, uma vez que pela sua organização e morfologia, está-se perante agregados amorfos, Figura 41.

A maior parte das estruturas secundárias na lisozima são constituídas por α -hélice 40% e 10% de folha- β . Dos 6 resíduos de Trp presentes na lisozima, quatro resíduos nas posições 28, 108, 111, 123 estão na hélice e dois resíduos estão presentes em torno da região, por sua vez nas posições 62 e 63. De seis Trp, apenas o resíduo 62 está acessível ao solvente.⁷¹

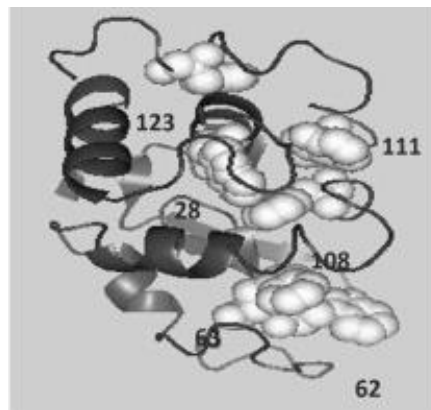


Figura 47. Estrutura da lisozima mostrando hélice (espiral) e folha (seta). Imagem retirada de ⁷¹.

Posto isto, a ureia parece ser mais eficaz no desdobraimento de proteínas ricas em folhas- β do que em α -hélices. Como a lisozima é rica em α -hélices, o seu desdobraimento não ocorreu, pelo que os agregados obtidos apresentam forma fibrilar. Pela Figura 36C a banda característica de agregados amilóides encontra-se presente, onde esta atinge um valor máximo cerca de 75 000 u.a. e pelos resultados de FLIM, apesar de estarem presentes outras estruturas, fibrilas amilóides também se encontram presentes em solução.

Surfactantes são moléculas anfifílicas com cabeça carregada e caudas hidrofóbicas, como é o caso de SDS. As interações proteína-detergente destacam as várias maneiras pelas quais as proteínas respondem às mudanças no seu ambiente. Detergentes iónicos podem desnaturar proteínas pela forte ligação a cadeias laterais carregadas e a cadeias laterais hidrofóbicas em concentrações milimolares, ao contrário de desnaturantes químicos, como cloreto de guanidínio ou ureia, que são apenas eficazes em concentrações molares, presumivelmente devido à fraca ligação ao

esqueleto da proteína. Proteínas que são constituídas por α -hélices e folhas- β desdobram-se muito rapidamente (escalas de tempo de subsegundos) em SDS, sendo que as estruturas de α -hélice são desdobradas primeiro.⁷² Surfactantes carregados negativamente, (SDS), são usados para a solubilização de proteínas de membrana e eletroforese. O SDS contém uma cabeça carregada negativamente e uma cauda hidrofóbica de 12 carbonos. O ponto isoelétrico da proteína HEWL é encontrado em torno de 10.7-11.2, pelo que este deve ser utilizado na combinação de pH's elevados, uma vez que com pH's reduzidos a proteína adquire carga líquida positiva, duas unidades abaixo do seu *pI*.^{40,73} SDS carregado negativamente foi usado para 'antagonizar' as cargas positivas na lisozima.⁷⁴ A presença de SDS a pH reduzido, 2.2, não induziu a formação de fibrilas amilóides. Presume-se que os agregados apresentem uma organização desordenada e uma morfologia indefinida, conforme visualizado por fluorescência, onde se encontra ausente a banda característica da formação amilóide, e por microscopia de tempos de vida de fluorescência, Figura 37E e Figura 44, respetivamente. No entanto, a presença de SDS a pH elevado, 9, induziu a formação de agregados amilóides, conforme visualizado por fluorescência, onde se encontra a banda característica da formação amilóide, que atinge um valor máximo de 130 000 u.a., e por microscopia de tempos de vida de fluorescência, Figura 36D e Figura 43, respetivamente. Estes dois tipos de promotores de agregação comportaram-se de forma diferente, uma vez que a pH's reduzidos esperavam-se agregados amilóides e a pH's elevados esperavam-se agregados amorfos. O SDS induz agregados de estrutura fibrilar na lisozima e a agregação aumenta com a diminuição do pH. Contudo, um estudo⁷⁴ veio corroborar o fato de que a redução do pH promove a agregação de lisozima por SDS, uma vez que o teor de proteína em folha- β , análise por CD, aumentou a pH's elevados e o contrário aconteceu a pH's mais baixos.

Ditiotreitol (DTT), um conhecido agente redutor de dissulfeto de proteína à base de tiol, promove o desdobramento, a perde da estrutura globular da lisozima e faz com que esta se torna um polipeptídeo enrolado aleatório.^{41,42} A adição de DTT à amostra de HEWL, durante a incubação, levou a um desdobramento estrutural óbvio de HEWL (confirmado pela diminuição de auto-fluorescência a partir do quinto dia, Figura 37F), seguido de um rearranjo estrutural através da via que resultou na formação de espécies

agregadas aleatoriamente, sendo que à medida que mais agregados amorfos se formavam, menos fibrilas eram produzidas, Figura 45.

Sabendo que o TCEP, um agente redutor não à base de tiol, tem uma atividade redutora mais forte do que o DTT, sendo que uma alta concentração do mesmo poderá inibir as ligações de dissulfeto, que é a força motriz para a formação de agregados.⁴² Como o TCEP não é estável em tampão fosfato, especialmente a pH neutro, este foi estudado na presença do tampão HEPES.⁴² A partir da Figura 38, é possível se verificar a diminuição da intensidade de fluorescência ao longo do período de incubação, pelo que através das imagens de FLIM, Figura 46, apesar de se estar na presença de agregados com um padrão paralelo e ortogonal, os agregados apresentam uma estrutura amorfa - agregados amorfos.

Capítulo 4 - Conclusões e Perspetivas Futuras

A desregulação do zinco, do cobre e do ferro é considerada uma consequência do envelhecimento e existem evidências consideráveis de que também está envolvida na patogénese da DA como uma doença neurodegenerativa. Além disso, estes iões metálicos demonstraram interagir com péptidos amilóides e potencialmente afetar o dobramento e a agregação de proteínas.

Assim, foi estudado o efeito das concentrações de iões na agregação de A β . O caso do zinco e do cobre mostraram um perfil semelhante, onde a menor concentração, 12.5 μ M na proporção A β :ião – 1:0.5, aumentou a agregação, pois mantiveram o péptido em estado amilóide, contudo a presença de cobre promoveu a passagem do péptido para estados amilóide e amorfo. No caso do ferro, a mesma concentração de A β e de ião provocou aceleração de agregação e o aparecimento de agregados amorfos e amilóides.

No presente trabalho descreve-se os dados experimentais obtidos a partir da medição de intensidade de fluorescência e FLIM para a lisozima em variadas condições. Usando estes métodos foi possível acompanhar quaisquer mudanças no tamanho e na morfologia durante o processo de agregação da proteína lisozima e tentar correlações com a auto-fluorescência observada por espectroscopia de fluorescência em estado estacionário. A lisozima na presença de condições ácidas, solventes, como a ureia, e a sua exposição a detergentes, como o SDS, a pH's elevados provoca a formação de fibrilas amilóides, onde estes apresentam uma banda característica de agregados amilóides, aproximadamente a 460 nm. Estes resultados são apoiados pelas imagens obtidas por FLIM, onde é possível visualizar a presença de fibrilas amilóides organizadas, longas e não ramificadas.

Todos os resultados obtidos a partir das duas técnicas de imagem, onde era possível observar agregados amilóides, também era possível visualizar uma banda de autofluorescência aproximadamente a 450 nm. Contudo, na presença de agregados amorfos, a banda a 450 nm estava igualmente presente, pelo que este estudo precisa de ser aprimorado, de modo a permitir que a correlação afirmada - a banda característica de agregados amiloides é exibida a aproximadamente 450 nm – possa ser aplicada na prática.

Capítulo 5 - Referências Bibliográficas

1. Belo N. R. P. (2014). Formação de placas amilóides em doenças neurodegenerativas. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Coimbra, Coimbra.
2. Emadi S., Behzadi M. (2014). A comparative study on the aggregating effects of guanidine thiocyanate, guanidine hydrochloride and urea on lysozyme aggregation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 450 (4), 1339-1344.
3. Salahuddin P., Khan H. R., Furkan M., Uversky N. V., Islam Z., Fatima T. M. (2021). Mechanisms of amyloid proteins aggregation and their inhibition by antibodies, small molecule inhibitors, nano-particles and nano-bodies, *International Journal of Biological Macromolecules*, 186, 580-590.
4. Kim H., Lee D., Ryu K., Choi I. (2017). A gold nanoparticle-mediated rapid *in vitro* assay of anti-aggregation reagents for amyloid β and its validation. *Chemical Communications*, 53, 4449-4452.
5. Moore A. K., Pate M. K., Soto-Ortega D., Lohse S., Munnik N., Lim M., Jackson S. K., Lyles D. V., Jones L., Glassgow N., Napumecho M. V., Mobley S., Uline J. M., Mahtab R., Murphy J. C., Moss A. M. (2017). Influence of gold nanoparticle surface chemistry and diameter upon Alzheimer's disease amyloid- β protein aggregation. *Journal of Biological Engineering*, 11 (1), 5-.
6. Negahdary M., Heli H. (2019). An ultrasensitive electrochemical aptasensor for early diagnosis of Alzheimer's disease, using a fern leaves-like gold nanostructure. *Talanta*, 198, 510-517.
7. Song M., Sun Y., Luo Y., Zhu Y., Liu Y., Li H. (2018). Exploring the Mechanism of Inhibition of Au Nanoparticles on the Aggregation of Amyloid- β (16-22) Peptides at the Atom Level by All-Atom Molecular Dynamics. *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (6), 1815-.
8. Smeralda W., Since M., Cardin J., Corvaisier S., Lecomte S., Cullin C., Malzert-Fréon A. (2021). β -Amyloid peptide interactions with biomimetic membranes: A multiparametric characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 181, 769-777.

9.

U. Nobbmann, M. Connah, B. Fish, P. Varley, C. Gee, S. Mulot, J. Chen, L. Zhou, Y. Lu, F. Shen, J. Yi, S.E. Harding (2007). Dynamic light scattering as a relative tool for assessing the molecular integrity and stability of monoclonal antibodies. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 24, 117-128.

10. J. Wen, T. Arakawa, J.S. Philo (1996). Size-exclusion chromatography with on-line light-scattering, absorbance, and refractive index detectors for studying proteins and their interactions. *Analytical Biochemistry*, 240 (2), 155-166.

11. A. Hawe, W.L. Hulse, W. Jiskoot, R.T. Forbes (2011). Taylor dispersion analysis compared to dynamic light scattering for the size analysis of therapeutic peptides and proteins and their aggregates. *Pharmaceutical Research*, 28, 2302-2310.

12. S.F. Donovan, M.C. Pescatore (2002). Method for measuring the logarithm of the octanol-water partition coefficient by using short octadecyl-poly(vinyl alcohol) high-performance liquid chromatography columns. *Journal of Chromatography A*, 952 (1-2), 47-61.

13. Klepach A., Tran H., Mohammed A. F., ElSayed H. E. M. (2022). Characterization and impact of peptide physicochemical properties on oral and subcutaneous delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 186, 114322.

14. Tahmasebinia F., Emadi S. (2017). Effect of metal chelators on the aggregation of beta-amyloid peptides in the presence of copper and iron. *Biometals*, 30 (2), 285-293.

15. Weibull M., Simonsen S., Oksbjerg C., Tiwari M., Hemmingsen L. (2019). Effects of Cu(II) on the aggregation of amyloid- β . *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 24, 1197-1215.

16. Rezaei-Ghaleh N., Giller K., Becker S., Zweckstetter M. (2011). Effect of Zinc Binding on β -Amyloid Structure and Dynamics: Implications for A β Aggregation. *Journal Biophysical*, 101 (5), 1202-1211.

17. Rodríguez C., Telpoukhovskaia M., Orvig C. (2012). The art of building multifunctional metal-binding agents from basic molecular scaffolds for the potential application in neurodegenerative diseases. *Coordination Chemistry Reviews*, 256 (19-21), 2308-2332.

18. Kong X., Zhao Z., Lei X., Zhang B., Dai D., Jiang L. (2015). Interaction of Metal Ions with the His13-His14 Sequence Relevant to Alzheimer's Disease. *The Journal of Physical Chemistry*, 119 (14), 3528-3534.
19. Dias L. D. (2014). Espectroscopia de Fluorescência Aplicada ao Estudo das Interações de Formação de Nanoestruturas de Peptídeos Contendo Maguemita - Dissertação Pós-Graduação (Mestrado em Química), Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
20. Suhling K., Hirvonen M. L., Levitt A. J., Chung P., Tregidgo C., Marois L. A., Rusakov A. D., Zheng K., Ameer-Beg S., Poland S., Coelho S., Henderson R., Krstajic. (2015). Fluorescence lifetime imaging (FLIM): Basic concepts and some recent developments. *Medical Photonics*, 27, 3-40.
21. Ranawat H., Pal S., Mazumder N. (2019). Recent trends in two-photon auto-fluorescence lifetime imaging (2P-FLIM) and its biomedical applications. *Biomedical Engineering Letters*, 9, 293-310.
22. Kumari M., Dohare N., Maurya N., Dohare R., Patel R. (2017). Effect of 1-methyl-3-octyleimidazolium chloride on stability and activity of lysozyme: a spectroscopic and molecular dynamics studies. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 35 (9), 2016-2030.
23. Shen X., Ge J., Chen J., Shen Y., Meng H., Li Z., Qu L. (2019). A novel fluorescence method for the highly sensitive detection of T4 polynucleotide kinase based on polydopamine nanotubes. *New Journal of Chemistry*, 43, 16753-16758.
24. Vaney C. M., Maignan S., Riès-Kautt M., Ducruix A. (1996). High-Resolution Structure (1.33 Å) of a HEW Lysozyme Tetragonal Crystal Grown in the APCF Apparatus. Data and Structural Comparison with a Crystal Grown under Microgravity from SpaceHab-01 Mission. *Acta Crystallographica*, 52, 505-517.
25. Wu W. J., Liu K., How S., Chen W., Lai C., Liu H., Hu C., Wang S. (2013). Carnosine's Effect on Amyloid Fibril Formation and Induced Cytotoxicity of Lysozyme. *PLoS ONE*, 8 (12), 81082-.
26. Ramos R. S., Peixoto M., Lucena S. V., Cavalcante L. S. N., Medeiros S. G. B. (2016). Lisozima: estrutura molecular e propriedade antimicrobiana. *Congresso Brasileiro de Ciências da Saúde*.
27. Dias G. L. R. (2010). Acção da lisozima sobre bactérias do ácido láctico isoladas do vinho - A influência de proteínas de superfície (S-layer). Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Católica Portuguesa, Porto.

28. Holley M., Eginton C., Schaefer D., Brown L. (2008). Characterization of amyloidogenesis of hen egg lysozyme in concentrated ethanol solution. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 373 (1), 164-168.
29. Emadi S., Behzadi M. (2014). A comparative study on the aggregating effects of guanidine thiocyanate, guanidine hydrochloride and urea on lysozyme aggregation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 450 (4), 1339-1344.
30. Sarell C., Wilkinson S., Viles J. (2010). Substoichiometric levels of Cu²⁺ ions accelerate the kinetics of fiber formation and promote cell toxicity of amyloid- β from Alzheimer disease. *Journal Biological Chemistry*, 285, 41533–41540.
31. Matheou C., Younan N., Viles J. (2015). Cu²⁺ accentuates distinct misfolding of A β _{1–40} and A β _{1–42} peptides, and potentiates membrane disruption. *Journal Biochemistry*, 466 (2), 233-242.
32. Tõugu V., Karafn A., Zovo K., Chung R., Howells C., West A., Palumaa P. (2009). Zn(II)- and Cu(II)-induced non-fibrillar aggregates of amyloid- β (1–42) peptide are transformed to amyloid fibrils, both spontaneously and under the influence of metal chelators. *Journal Neurochemistry*, 110, 1784–1795.
33. Hu W-P, Chang G-L, Chen S-J, Kuo Y-M (2006). Kinetic analysis of β -amyloid peptide aggregation induced by metal ions based on surface plasmon resonance biosensing. *Journal of Neuroscience Methods*, 154 (1-2), 190–197.
34. House E., Collingwood J., Khan A., Korchazkina O., Berthon G., Exley C. (2004). Aluminium, iron, zinc and copper influence the in vitro formation of amyloid fibrils of A β 42 in a manner which may have consequences for metal chelation therapy in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 6 (3), 291–301.
35. Rodríguez-Rodríguez C., Telpoukhovskaia M., Orvig C. (2012). The art of building multifunctional metal-binding agents from basic molecular scaffolds for the potential application in neurodegenerative diseases. *Coordination Chemistry Reviews*, 256 (19-20), 2308-2332.
36. Rufino A. (2017). Formação de agregados proteicos na presença de líquidos iónicos e a aplicação de simulações de dinâmica molecular. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade de Aveiro, Aveiro.

37. Prummer M., Sick B., Renn A., Urs P. (2004). Multiparameter Microscopy and Spectroscopy for Single-Molecule Analytics. *Analytical Chemistry*, 76 (6), 1633-1640.
38. Becker W. (2012). Fluorescence lifetime imaging – techniques and applications. *Journal of Microscopy*, 247 (2), 119-136.
39. Rowley M., Barber P., Coolen A., Vojnovic B., (2011). Bayesian analysis of fluorescence lifetime imaging data. *Microscopy in the Biomedical Sciences*, 7903, 790325-790337.
40. Khan J.; Chaturvedi S.; Rahman S.; Ishtikhar M.; QAdeer A.; Ahmad E.; Khan R. (2014). Protonation favors aggregation of lysozyme with SDS. *Soft Matter*, 10 (15), 2591–.
41. Wang S.; Liu K.; Wang B. (2010). Effects of dithiothreitol on the amyloid fibrillogenesis of hen egg-white lysozyme. *European Biophysics Journal*, 39, 1229-1242.
42. Yang M., Dutta C., Tiwari A. (2015). Disulfide-Bond Scrambling Promotes Amorphous Aggregates in Lysozyme and Bovine Serum Albumin. *The Journal of Physical Chemistry*, 119, 3969-3981.43. Buell A., Galvagnion C., Gaspar R., Dobson C. (2014). Solution conditions determine the relative importance of nucleation and growth processes in α -synuclein aggregation. *Biophysics and Computational Biology*, 111 (21), 7671-7676.
44. Espinar-Barranco L., Paredes J., Orte A., Crovetto L., Garcia-Fernandez E. (2022). A solvatofluorochromic dye as a fluorescent lifetime-based probe of β -amyloid aggregation. *Dyes and Pigments*, 202, 110274-110283.
45. Rochet J., Lansbury P. (2000). Amyloid fibrillogenesis: themes and variations. *Current Opinion in Structural Biology*, 10 (1), 60-68.
46. Brems D., Alter L., Beckage M., Chance R., DiMarchi R., Green K., Long H., Pekar A., Shields J., Frank B. (1992). Altering the association properties of insulin by amino acid replacement. *Protein Engineering, Design and Selection*, 5 (6), 527-533.
47. Raso W. S., Abel J., Barnes M. J., Maloney M. K., Pipes G., Treuheit J. M., King J., Brems N. D. (2009). Aggregation of granulocyte-colony stimulating factor in vitro involves a conformationally altered monomeric state. *Protein Science*, 14 (9), 2246-2257.

48. Cohen A. I. S., Linse S., Luheshi M. L., Knowles P. T. (2013). Proliferation of amyloid- β 42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110 (24), 9758-9763.
49. Smith S. E. P., Brender R. J., Ramamoorthy A. (2009) Induction of Negative Curvature as a Mechanism of Cell Toxicity by Amyloidogenic Peptides: The Case of Islet Amyloid Polypeptide. *Journal of the American Chemical Society*, 131 (12), 4470-4478.
50. Ferreon M. C. A., Deniz A. (2007). α -Synuclein Multistate Folding Thermodynamics: Implications for Protein Misfolding and Aggregation. *Biochemistry*, 46 (15), 4499-4509.
51. Krishnan S., Chi Y. E., Webb N. J., Chang S. B., Shan D., Goldenberg M., Manning C. M., Randolph W. T., Carpenter F. J. (2002). Aggregation of Granulocyte Colony Stimulating Factor under Physiological Conditions: Characterization and Thermodynamic Inhibition. *Biochemistry*, 41 (20), 6422-6431.
52. Galvagnion C., Brown P. W. J., Ouberai M., Dobson M. C. (2016). Chemical properties of lipids strongly affect the kinetics of the membrane-induced aggregation of α -synuclein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113 (26), 7065-7070.
53. Last B. N., Rhoades E., Miranker D. A. (2011). Islet amyloid polypeptide demonstrates a persistent capacity to disrupt membrane integrity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (23), 9460-9465.
54. Drummond A., Wilke O. C. (2008). Mistranslation-Induced Protein Misfolding as a Dominant Constraint on Coding-Sequence Evolution, 134 (2), 341-352.
55. Ferrone F. (1999). Analysis of protein aggregation kinetics. *Methods in Enzymology*, 309, 256-274.
56. Kumar, S., Udgaonkar, J. (2010). Mechanisms of amyloid fibril formation by proteins. *Current Science*, 98 (5), 639-656.
57. Lomakin A., Teplow B. D., Kirschner A. D., Benedek B. G. (1997). Kinetic theory of fibrillogenesis of amyloid β -protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94 (15), 7942-7947.
58. Ferreira P. A., Yamanaka H, (2006). Microscopia de força atômica aplicada em imunoenensaio. *Química Nova*, 29 (1), 137-142.
59. Filho B. R., Mattoso C. H. L. (2003). Estudo de Polímeros por Microscopia de Força Atômica. *Comunicado Técnico*, 53.

60. Li H., Rahimi F., Sinha S., Maiti P., Bitan G. (2009). Amyloids and Protein Aggregation–Analytical Methods. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*.
61. Oliveira M. Í., Bezerra M. S., Silva A. G. M., Meneghetti R. M. (2020). Self-Assembly of Metal Nanoparticles, an Important Process to the Development of New Nanostructured Materials and Devices. *Revista Virtual de Química*, 12 (1), 99-119.
62. Petkova T. A., Ishii Y., Balbach J., Antzutkin N. O., Leapman D. R., Delaglio F., Tycko R. (2002). A structural model for Alzheimer's β -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99 (26), 16742-16747.
63. Rufino S. C. F. A. (2017). Formação de agregados proteicos na presença de líquidos iônicos e a aplicação de simulações de dinâmica molecular. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Departamento de Química da Universidade de Aveiro, Aveiro.
64. Serpell C. L. (2000). Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1502 (1), 16-30.
65. Langkilde E. A., Morris L. K., Serpell C. L., Svergun I. D., Vestergaard B. (2015). The architecture of amyloid-like peptide fibrils revealed by X-ray scattering, diffraction and electron microscopy. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 71 (4), 882-895.
66. Innocenti M., Salvietti E., Guidotti M., Casini A., Bellandi S., Foresti L. M., Gabbiani C., Pozzi A., Zatta P., Messori L. (2010). Trace Copper(II) or Zinc(II) Ions Drastically Modify the Aggregation Behavior of Amyloid- β 1–42: An AFM Study. *Journal of Alzheimer's Disease*, 19, 1323-1329.
67. Frare E., Laureto P., Zurdo J., Dobson M. C., Fontana A. (2004). A Highly Amyloidogenic Region of Hen Lysozyme. *Journal of Molecular Biology*, 340 (5), 1153-1165.
68. Moosavi-Movahedi A., Pirzadeh P., Hashemnia S., Ahmadian S., Hemmateenejad B., Amani M., Saboury A., Ahmad F., Shamsipur M., Hakimelahi H. G., Tsai F., Alijanvand H., Yousefi R. (2007). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 60 (1), 55-61.
69. Krebs R. M., Wilkins K. D., Chung W. E., Pitkeathly C. M., Chamberlain K. A., Zurdo J. (2000). *Journal of Molecular Biology*, 300, 541-549.

70. Anshuman S, Sourav M, Swati S, Vishal A, KV, Radha K, Guptasarma P (2004). A novel UV laser-induced visible blue radiation from protein crystals and aggregates: scattering artifacts or fluorescence transitions of peptide electrons delocalized through hydrogen bonding? *Archives Biochemistry and Biophysocs*, 428, 144–153.
71. Siddaramaiah M., Satyamoorthy K., Rao S. B., Roy S., Chandra S., Mahato K. (2017). Identification of protein secondary structures by laser induced autofluorescence: A study of urea and GnHCl induced protein denaturation. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spetroscopy*, 174, 44-53.
72. Nielsen M., Anderser K., Westh P., Otzen E. D. (2007). Unfolding of β -sheet proteins in SDS. *Journal Biophysical*, 92 (10), 3674-3685.
73. Khan M. J., Ahmed A., Alamery F. S., Farah A. M., Hussain T., Khan I. M., Khan H. R., Malik A., Fatima S., Sen P. (2019). Millimolar concentration of sodium dodecyl sulfate inhibit thermal aggregation in hen egg white lysozyme via increased α -helicity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 572, 157-173.
74. Khan M. J., Chaturvedi K. S., Rahman K. S., Ishtikhar M., Qadeer A., Ahmad E., Khan H. R. (2014). Protonation favors aggregation of lysozyme with SDS. *Soft Matter*, 10 (15), 2591-2599.
75. Jesus H. S. C., Soares T. H., Piedade P. A., Cortes L., Serpa C. (2021). Using amyloid autofluorescence as a biomarker for lysozyme aggregation inhibition. *The Analyst*, 146 (7), 2383–2391.
76. Pigazzini L. M., Gallrein C., Iburg M., Schierle K. G., Kirstein J. (2020). Characterization of Amyloid Structures in Aging *C. Elegans* Using Fluorescence Lifetime Imaging. *Journal of Visualized Experiments*, 157.
77. Faller P., Hureau C., Berthoumieu O. (2013). Role of Metal Ions in the Self-assembly of the Alzheimer's Amyloid- β Peptide. *Inorganic Chemistry*, 52 (21), 12193-12206.
78. Fricano A., Librizzi F., Rao E., Alfano C., Vetri V. (2019). Blue autofluorescence in protein aggregates “lighted on” by UV induced oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics*, 1867 (11), 140258.
79. Tikhonova N. T., Rovnyagina R. N., Zhrebker Y. A., Sluchanko N., Rubekina A., Orekhov S. A., Nikolaev N. E., Fadeev V., Uversky N. V., Shirshin A. E. (2018). Dissection of the deep-blue autofluorescence changes accompanying amyloid fibrillation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 651, 13-20.

80. Zhao Y., Li J., Wu Z., Zhang H., Zhao Y., Yang R., Lu L. (2021). Curcumin ligand based iridium(III) complexes as inhibition and visualization agent of beta-amyloid fibrillation. *Microchemical Journal*, 160, 105721.
81. Kitauchi K., Sakono M. (2016). Glycoprotein quality control-related proteins effectively inhibit fibrillation of amyloid beta 1–42. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 481 (3-4), 227-231.
82. Nedaei H., Ghaleh-Rezaei N., Giller K., Becker S., Karami L., Moosavi-Movahedi A., Griesinger C., Saboury A. (2022). The calcium-free form of atorvastatin inhibits amyloid- β (1–42) aggregation *in vitro*. *Journal of Biological Chemistry*, 298 (3), 101662.
83. Sampaio I., Quatroni D. F., Lins P. M. P., Nascimento S. A., Zucolotto V. (2022). Modulation of beta-amyloid aggregation using ascorbic acid. *Biochimie*, 200, 36-43.
84. Heo E. C., Choi S. T., Kim I. H. (2018). Competitive homo- and hetero- self-assembly of amyloid- β 1–42 and 1–40 in the early stage of fibrillation. *International Journal of Mass Spectrometry*, 428, 15-21.
85. Mittal C., Kumari A., De I., Singh M., Harsolia R., Yadav K. J. (2021). Heat treatment of soluble proteins isolated from human cataract lens leads to the formation of non-fibrillar amyloid-like protein aggregates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 188, 512-522.
86. Lai Y., Wang T., How S., Lin K., Chou W., Wang S. (2022). Using sugar-derived nanoparticles to mitigate amyloid fibril formation of lysozyme. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 104360.

Material Suplementar

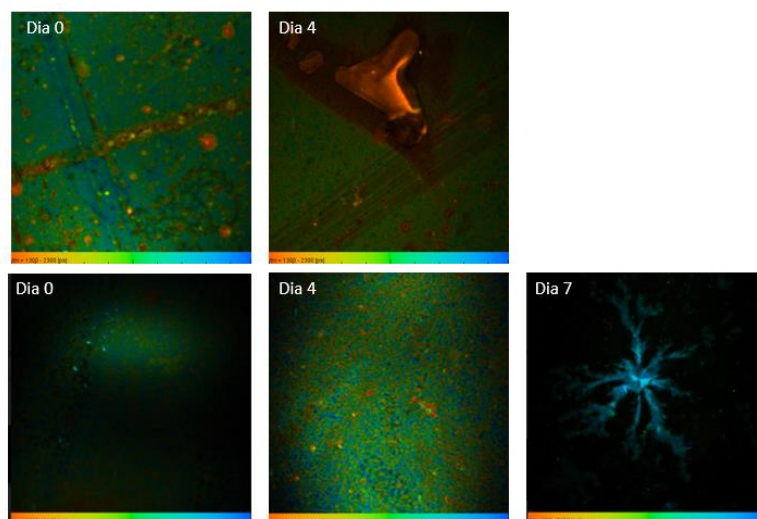


Figura 1. Imagens de fluorescência da lisozima na presença de Gly-HCl a pH 2 e temperatura a 60°C em duas experiências diferentes: A) dias 0 e 4, B) dias 0, 4 e 7.

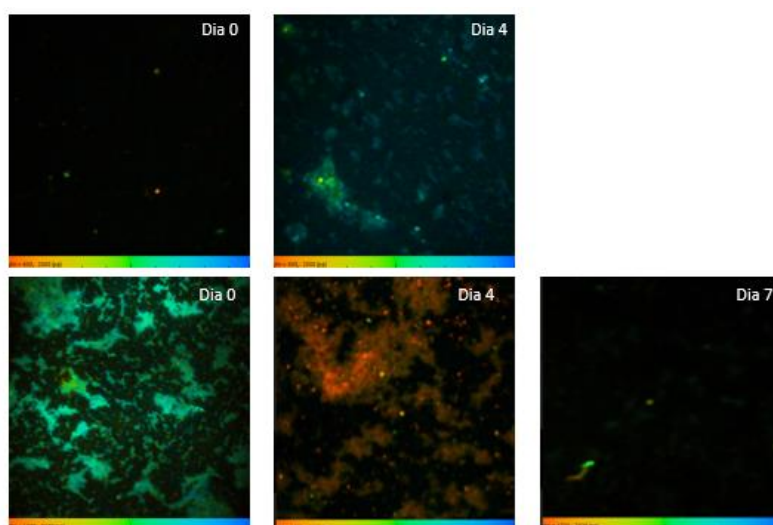


Imagem 2. Imagens de fluorescência da lisozima na presença de 90% de etanol a pH 7.5 e temperatura ambiente em duas experiências diferentes: A) dias 0 e 4, B) dias 0, 4 e 7.

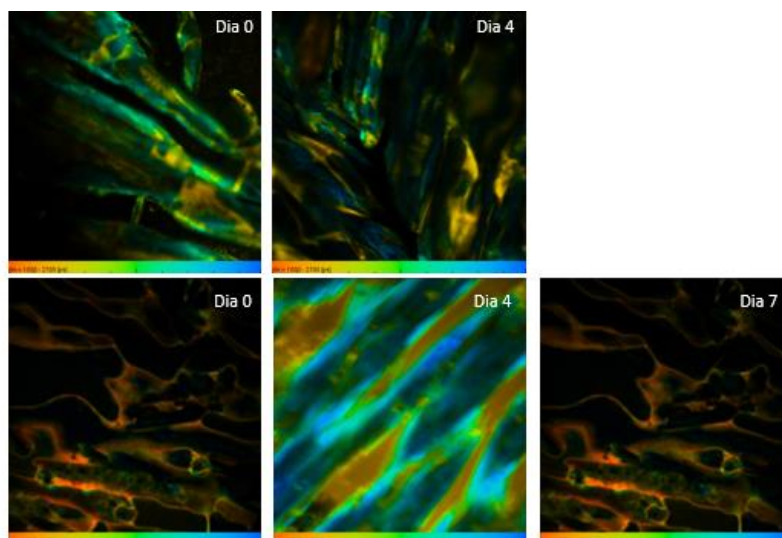


Figura 3. Imagens de fluorescência da lisozima na presença de 2 M de ureia a pH 7.5 e temperatura ambiente em duas experiências diferentes: A) dias 0 e 4, B) dias 0, 4 e 7.

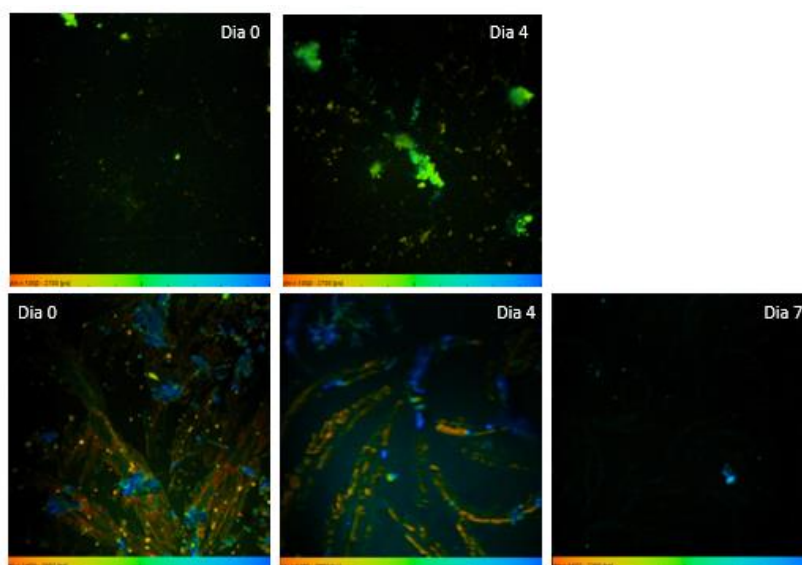


Figura 4. Imagens de fluorescência da lisozima na presença de 200 μ M SDS, Glicina-NaOH, temperatura ambiente a pH 9 em duas experiências diferentes: A) dias 0 e 4, B) dias 0, 4 e 7.

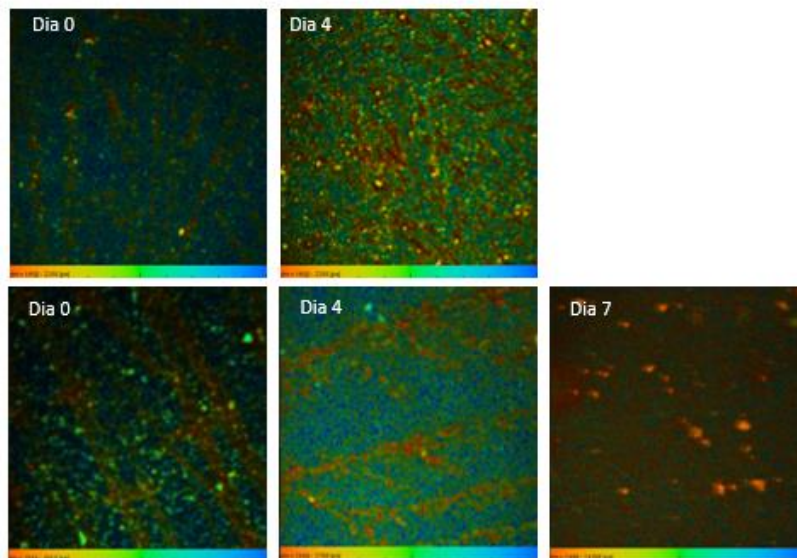


Figura 5. Imagens de fluorescência da lisozima na presença de 200 μ M SDS, Gly-HCl, temperatura ambiente a pH 2.2 em duas experiências diferentes: A) dias 0 e 4, B) dias 0, 4 e 7.

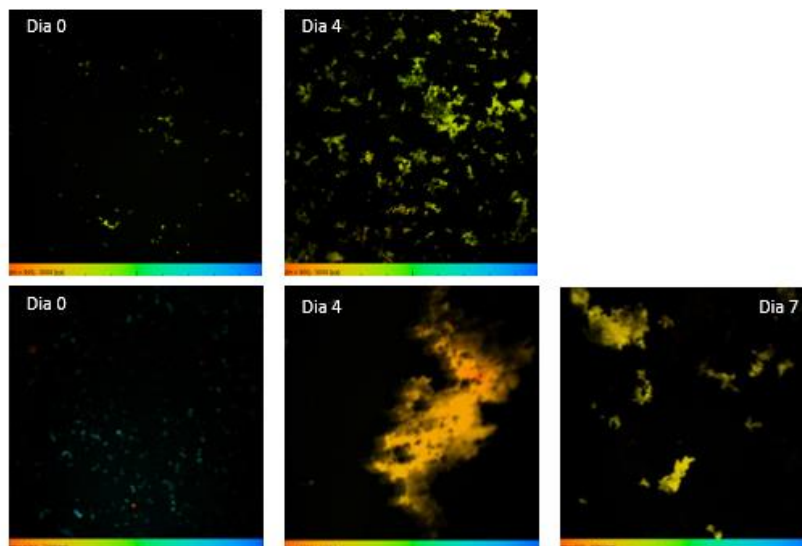


Figura 6. Imagens de fluorescência da lisozima na presença de 2 mM DTT, tampão fosfato, pH=7.5, T = 37°C em duas experiências diferentes: A) dias 0 e 4, B) dias 0, 4 e 7.

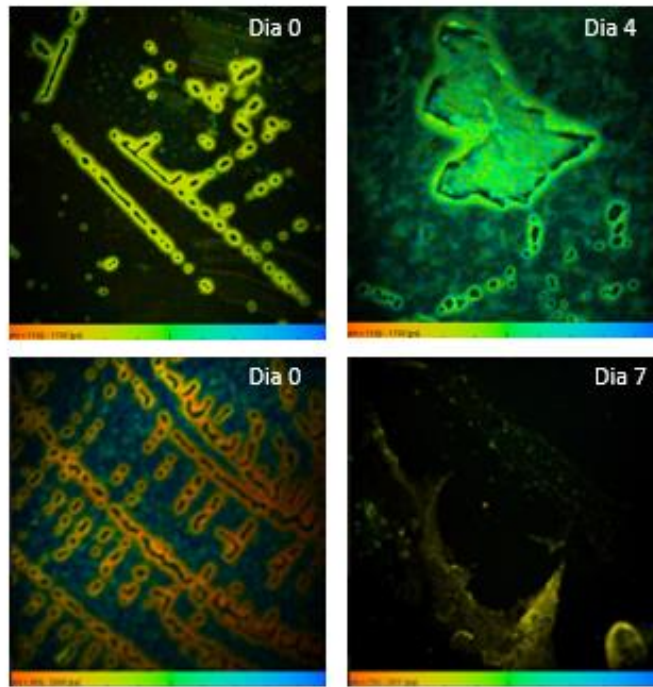


Figura 7. Imagens de fluorescência da lisozima na presença de 10 mM TCEP, tampão HEPES, temperatura a 37°C em duas experiências diferentes: A) dias 0 e 4, B) dias 0, 4 e 7.