

Paulo Ricardo Neiva Belo

Formação de Placas Amilóides em Doenças Neurodegenerativas

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor Luís Miguel Santos Loura e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Paulo Ricardo Neiva Belo, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2009027495, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, ____ de _____ de 2014.

as) _____

**Monografia realizada no âmbito do Mestrado
Integrado em Ciências Farmacêuticas**

Luís Miguel Santos Loura

(assinatura do tutor da faculdade)

Professor Doutor Luís Miguel Santos Loura

Paulo Ricardo Neiva Belo

(assinatura do aluno)

Paulo Ricardo Neiva Belo

Índice

Abreviaturas.....	6
Resumo	7
Abstract	8
1. Introdução.....	9
2. O dobramento das proteínas (<i>protein folding</i>).....	11
2.1 Mau-dobramento das proteínas (<i>protein misfolding</i>)	11
2.2 Mecanismos de defesa celular contra proteínas mal dobradas	12
3. Agregação proteica	13
3.1 Agregação de proteínas globulares.....	14
3.2 Factores que causam agregação e proteínas mal dobradas.....	15
3.2.1 Mutação	15
3.2.2 Stress nitrosativo.....	16
3.2.3 Modificações pós-traducionais	16
3.3 Mecanismos de agregação proteica	17
3.3.1 Mecanismo de crescimento nucleado.....	17
3.3.2 Polimerização linear	19
3.4 Intermediários que intervêm na formação de fibrilhas	19
3.4.1 Protofibrilhas	19
3.4.2 Agregados anulares.....	20
3.4.3 Oligómeros.....	20
3.5 Heterogeneidade das fibrilhas amilóides	20
3.6 Toxicidade dos agregados pré-fibrilares.....	21
4. Métodos para caracterização de intermediários e agregados amilóides	22
4.1 Ressonância magnética nuclear (RMN) de estado sólido	23
4.2 Cristalografia de raios-X	23
4.3 Ressonância de spin electrónico (RSE)	23
4.4 Microscopia electrónica (ME)	24
4.5 Espectroscopias ópticas.....	24
4.5.1 Dicroísmo circular (DC).....	24
4.5.2 Espectroscopia de infra-vermelho	24
4.5.3 Fluorescência.....	25
4.5.4 Métodos de coloração	25

5. Comentários finais e perspectivas terapêuticas	25
5.1 Terapêuticas químicas.....	26
5.2 Terapêuticas biológicas.....	27
6. Bibliografia.....	28

Abreviaturas

DC – Dicroísmo Circular

ELA – Esclerose Lateral Amiotrófica

HSP – Heat Shock Protein

ME – Microscopia Electrónica

NMDA – N-Metil-D-Aspartato

NO – Óxido Nítrico

PAF – Polineuropatia Amiloidótica Familiar

Péptido A β – péptido Amilóide β

Phe – fenilalanina

PPA β – Proteína Precursora Amilóide β

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RSE – Ressonância de Spin Electrónico

Trp – triptofano

TTR – Transtirretina

Tyr – tirosina

Resumo

Para poderem exercer a sua função biológica, as proteínas devem estar na sua adequada conformação tridimensional. Em doenças amiloidogénicas, as proteínas e péptidos no seu estado solúvel alteram-se para um estado termodinamicamente mais favorável, os agregados amilóides. Esta alteração ocorre como resultado do mau-dobramento proteico. Ao mesmo tempo também ocorre a falha dos mecanismos da reparação e destruição destas espécies tóxicas.

As doenças neurodegenerativas são tipos particulares de amiloidoses. Assim, para encontrar estratégias terapêuticas para estas patologias, torna-se importante estudar questões como a origem e mecanismos de formação destes agregados, bem como os mecanismos de defesa que estão afectados.

Diversas investigações têm levado à conclusão de que os intermediários que antecedem as fibrilhas amilóides maduras poderão ser as espécies mais tóxicas e as principais responsáveis pela progressão de doença.

Apesar da sua diversidade em termos de sequência, existem semelhanças notórias entre a formação de agregados a partir das diferentes proteínas amiloidogénicas envolvidas nestas patologias. Deste modo, o presente trabalho aborda os tópicos acima descritos numa perspectiva global, ilustrando-os com exemplos particulares apropriados. Faz-se ainda uma descrição sumária dos fundamentos de algumas das metodologias experimentais mais usadas na detecção e caracterização destas estruturas e conclui-se apontando algumas possíveis direcções para investigação futura, que permitam levar ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas de base química ou biológica.

Palavras-chave: amiloidoses; doenças neurodegenerativas; fibrilhas amilóides; proteínas; estrutura tridimensional.

Abstract

In order to exert their biological function, proteins must be in their proper three-dimensional conformation. In amyloidogenic diseases, proteins and peptides form amyloid aggregates, a thermodynamically favoured state. This happens as a result of protein misfolding. At the same time, reparation and destruction mechanisms of these toxic entities are impaired.

Neurodegenerative diseases are particular types of amyloidosis. In a way to find therapeutic targets for this kind of disease, it is important to study issues like mechanisms for aggregates formation, the reason why they form, and what defense pathways are affected.

Recent research has led to the conclusion that the species preceding mature fibrils formation may be more toxic and the main responsible for disease progression.

Despite their diversity in terms of sequence, there are marked similarities between the formation of aggregates from different amyloidogenic proteins involved in these pathologies. Thus, this work covers the topics described above in a global perspective, illustrating them with particular appropriate examples. Additionally, a brief description of the fundamentals of some of the most used experimental methodologies in the detection and characterization of these structures is given. Finally some possible directions for future research are presented, which will may enable the development of therapeutic strategies of biological or chemical basis.

Key words: amyloidosis; neurodegenerative diseases; amyloid fibrils; proteins; tridimensional structure.

I. Introdução

Muitas doenças são provocadas pela incapacidade das proteínas adoptarem a sua conformação nativa. Estas patologias (das quais vários exemplos particularmente relevantes são indicados na Tabela I) ocorrem como resultado do dobramento errado das proteínas (*protein misfolding diseases*).¹ Este fenómeno pode ter diferentes causas: degradação pelo sistema de controlo do retículo endoplasmático; transporte inadequado da proteína ou transformação da proteína do seu estado solúvel funcional para estados fibrilares, as fibrilhas amilóides (mais frequente). Deste modo, a quantidade de proteína disponível para desempenhar normalmente as suas funções diminui.²

O dobramento das proteínas é o processo através do qual a cadeia polipeptídica na sequência primária dobra, passando a constituir a estrutura terciária funcional. A informação necessária para este processo está contida na sequência de aminoácidos. O ambiente em que a proteína se encontra também influencia o dobramento.³

Durante o processo de dobramento da proteína, ocorre a formação de vários intermediários. 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 desdobrado ou de uma conformação nativa, mas sim de um estado parcialmente desdobrado (contendo estrutura secundária), que tende a agregar.⁴

Tabela I – Doenças humanas que se caracterizam pela presença de fibrilhas amilóides e respectiva proteína/péptido constituinte do agregado.⁵

Doenças	Proteína/ péptido precursor
Doença de Alzheimer ^a	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

^a – doença predominantemente esporádica; ^b – doença predominantemente hereditária

Dependo da sua origem, as amiloidoses podem ser classificadas em esporádicas, como a maioria dos casos de Parkinson e Alzheimer; hereditárias (estão associadas a

Formação de agregados amilóides em doenças neurodegenerativas

mutações específicas), por exemplo as amiloidoses do fibrinogénio e da lisozima; e transmissíveis, tais como as encefalopatias espongiiformes.⁵

As amiloidoses são doenças que se caracterizam pela conversão dos péptidos ou proteínas, no estado solúvel, para agregados fibrilares que contêm estrutura em folha β pregueada e são insolúveis. Embora as proteínas que dão origem a este tipo de depósitos não apresentem sequência semelhante, as fibrilhas formadas possuem propriedades biofísicas equivalentes (Fig. 1). Estas são constituídas por 2 a 6 protofilamentos (cada um com 2 a 5 nm de diâmetro), associados num arranjo helicoidal com 7 a 13 nm de diâmetro. Em cada protofilamento, as cadeias polipeptídicas formam cadeias β perpendiculares ao eixo da fibrilha e ligações de hidrogénio paralelas ao mesmo eixo.⁶ As fibrilhas têm ainda a particularidade de ligar os corantes tioflavina T e vermelho do Congo.⁵

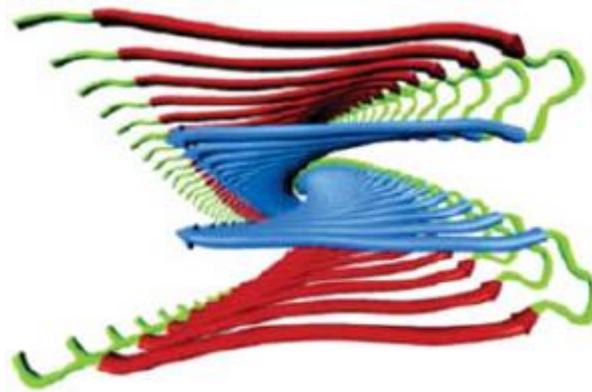


Fig. 1 - Estrutura tridimensional de agregado amilóide β . Podemos ver o protofilamento ao longo do eixo maior da fibrilha⁵

Contudo, estes agregados amilóides podem fazer parte da função de certos organismos. Por exemplo, as fibrilhas formadas a partir da proteína curlina que são usadas pela *Echerichia coli* para mediar a ligação às proteínas do hospedeiro⁷; uma classe de proteína, a chaplina da bactéria *Streptomyces coelicolor* identificada nas hifas, forma fibrilhas amilóides que contribuem para o desenvolvimento aéreo.⁸

Para além das fibrilhas amilóides, as proteínas podem formar outro tipo de agregados, tais como os oligómeros solúveis e os agregados amorfos. Agregados amorfos são formados mais rapidamente do que as fibrilhas. Para a sua formação não é necessária uma conformação específica. Muitas proteínas parcialmente desdobradas e destabilizadas formam agregados amorfos após precipitação. Pelo contrário, a fibrilação é um processo mais complexo. A via de agregação da proteína vai ser determinada pela sequência de aminoácidos e pelas condições externas a que a proteína está sujeita.⁹

2. O dobramento das proteínas (*protein folding*)

Dependendo da proteína, o dobramento pode dar-se em diferentes fases: antes de a síntese estar completa, quando a proteína ainda está ligada ao ribossoma; após a libertação do ribossoma (no citoplasma); ou em organelos específicos da célula (tais como a mitocôndria ou o retículo endoplasmático), após o transporte e translocação.¹⁰

O processo é controlado por chaperonas moleculares que aumentam a eficiência de todo o processo, diminuindo a ocorrência de mecanismos competitivos como a agregação.¹¹

As alterações na proteína são controladas a partir da sequência genética. Assim, resíduos que estão afastados na estrutura primária podem-se tornar próximos na estrutura nativa devido às interações terciárias.

As proteínas têm um núcleo hidrofóbico que é estabilizado pelas cadeias laterais; as cadeias laterais carregadas ou polares na superfície exposta interagem com as moléculas de água. A minimização do número de cadeias hidrofóbicas expostas à água é a principal força que leva a dobragem da proteína.¹²

Sequências de aminoácidos semelhantes não têm necessariamente que dobrar da mesma forma. O ambiente em que a proteína está inserida vai também influenciar o processo; proteínas semelhantes dobram de modo diferente dependendo do local em que são encontradas.³

2.1 Mau-dobramento das proteínas (*protein misfolding*)

O mau-dobramento da proteína é um processo em que a proteína é transformada numa estrutura diferente da nativa. Em vez disso, são formadas interações erradas que levam a uma conformação com energia mais baixa, e assim termodinamicamente mais favorável (Fig. 2). Para que estas moléculas adquiram o estado nativo, devem primeiro desdobrar outra vez de modo a que as interações sejam desfeitas.

Formação de agregados amilóides em doenças neurodegenerativas

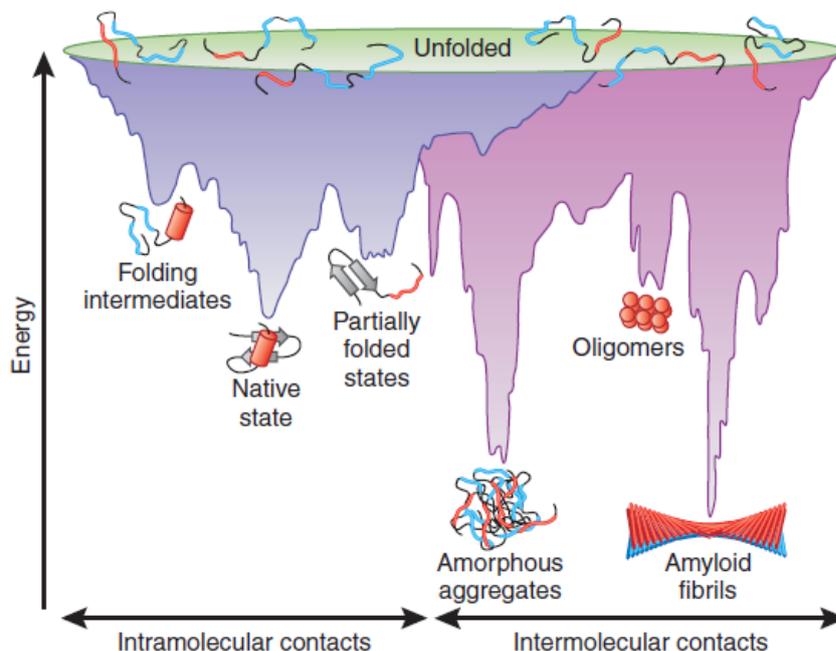


Fig. 2 - Perfil energético do dobramento e agregação proteicos. Na parte azul da imagem podemos ver estruturas que interconvertem por ligações intramoleculares. A rosa estão destacados os intermediários entre os agregados amorfos e as fibrilas amilóides, nestes as ligações são intermoleculares. A agregação pode ocorrer a partir do dobramento da proteína ou por destabilização do estado nativo e formação de intermediários parcialmente dobrados¹³

As proteínas mal dobradas não conseguem assim atingir uma estrutura terciária organizada, e como resultado os grupos hidrofóbicos ficam expostos ao solvente, facilitando a agregação. Pode também ocorrer a formação de ligações atômicas entre as moléculas mal dobradas, o que aumenta o grau de agregação.¹⁴

Proteínas que se encontrem neste estado não têm estrutura secundária ou terciária estável, comprometendo deste modo a sua função biológica. Assim, podem causar o aparecimento de várias doenças.¹⁵

2.2 Mecanismos de defesa celular contra proteínas mal dobradas

A agregação como resultado do mau dobramento das proteínas afecta a normal função celular. Assim, a reparação ou eliminação das proteínas mal dobradas é essencial para o normal funcionamento da célula. Os mecanismos de controlo de qualidade começam a operar quando os agregados se acumulam no citosol. As vias de degradação dos agregados são os proteassomas, as chaperonas moleculares e a macroautofagia.

Em células jovens e saudáveis, as proteínas danificadas são reparadas e eliminadas por estes sistemas de controlo. No entanto, em células que têm defeitos nestes mecanismos de

Formação de agregados amilóides em doenças neurodegenerativas

defesa ou em células envelhecidas, proteínas com defeito podem acumular-se e originar vários problemas.¹⁶

A reparação de proteínas desdobradas é mediada pelas chaperonas moleculares, que facilitam o dobramento correcto e impedem a agregação. A eliminação de proteínas danificadas é feita por sistemas proteolíticos.

As chaperonas estão envolvidas na primeira linha de defesa. Estas ligam-se a zonas de agregação das proteínas, tais como sequências hidrofóbicas e resíduos de cisteína e alteram a conformação local do péptido para que o dobramento ocorra de forma correcta. Também estabelecem interacções hidrofóbicas com regiões hidrofóbicas expostas e estabilizam as proteínas de modo a que não ocorra agregação irreversível. As chaperonas podem ainda facilitar a translocação da proteína para sua correcta localização intracelular. Uma das classes mais importantes de chaperonas, que actuam contra o mal dobramento e a agregação, são as *heat shock proteins* (HSP)¹⁷. As HSP exercem a sua actividade de chaperona por diferentes mecanismos: estabilização de proteínas parcialmente desdobradas, desagregação de inclusões proteicas, ou direccionando as proteínas mal dobradas para degradação. Por exemplo, foi demonstrado que a HST 27 previne a toxicidade induzida pela poliglutamina em modelos celulares para a doença de Huntington. Isto ocorre porque a HST 27 diminui o stress oxidativo, causado pela expressão da proteína mutante.

Caso as chaperonas moleculares falhem o correcto dobramento, a linha de defesa seguinte é a protecção das células contra as proteínas mal dobradas. As proteínas mal dobradas são conjugadas com a ubiquitina, sendo depois proteolisadas pelos proteassomas.⁹

Pensa-se que em doenças neurodegenerativas, os agregados proteicos intra- e extracelulares acumulam-se no cérebro como resultado da diminuição da actividade das chaperonas moleculares e dos proteassomas.

A macroautofagia, é também um processo que contribui para a eliminação de proteínas mal dobradas e agregadas. A diminuição da actividade da via da ubiquitina proteossoma induz a compensação da eliminação por macroautofagia.¹⁸

3. Agregação proteica

A agregação ocorre a partir de estados parcialmente dobrados da mesma proteína, sendo que a estrutura β pregueada é mais importante para a agregação do que a hélice α .

A instabilidade da proteína devida a baixa energia de transição para a conformação desdobrada e para intermediários parcialmente dobrados, que escapam aos sistemas de

Formação de agregados amilóides em doenças neurodegenerativas

controlo das proteínas, é uma condição necessária para que possa ocorrer a agregação.¹ O processo é iniciado pela mudança para um estado desdobrado com propensão para formar estrutura β , ocorrendo em seguida a formação de oligómeros.

A capacidade de agregação das proteínas sugere que este é um processo frequente *in vivo*, e que uma das funções das chaperonas moleculares e do complexo ubiquitina-proteassoma pode ser voltar a dobrar ou eliminar as proteínas mal dobradas.¹⁹

Num estudo, foram criados anticorpos contra os agregados pré-fibrilares do péptido A β . Observou-se que estes anticorpos eram capazes de reagir também com agregados pré-fibrilares de outro tipo de péptidos, mas não com agregados de fibrilhas amilóides maduras. A partir deste resultado pôde concluir-se que estas espécies que antecedem as fibrilhas possuem certas características estruturais em comum que são diferentes das encontradas nos agregados maduros.²⁰

3.1 Agregação de proteínas globulares

As proteínas globulares devem desdobrar antes de ocorrer o processo de agregação. Condições que promovem o desdobramento proteico, tais como altas temperaturas, altas pressões, baixo pH ou a presença de solventes orgânicos em determinadas concentrações, facilitam a ocorrência de agregação.²¹

A destabilização da estrutura nativa da proteína é um dos mecanismos primários de patogenicidade em doenças que envolvem proteínas que normalmente estão dobradas. Foi também demonstrado *in vitro*, que existe uma relação entre a baixa estabilidade do estado nativo e a agregação.²²

Apesar da alteração da conformação das proteínas explicar a formação de fibrilhas amilóides, existem casos em que a alteração de conformação não ocorre até ao início da agregação. Um exemplo é a formação de fibrilhas amilóides pela insulina. A baixos valores de pH, esta é antecedida por um passo de oligomerização em que é mantida uma estrutura alfa-hélice semelhante à nativa, sendo que o estado de fibrilhas com cadeias beta é atingido mais tardiamente.²³ De um modo semelhante, o estado nativo da variante patogénica da ataxina 3 (associada a ataxia espinocerebelar do tipo 3) não é afectado, levando a concluir que o desdobramento das proteínas nem sempre é necessário para a formação de agregados amilóides.²⁴

Apesar das diferenças anteriormente descritas, os mecanismos de agregação para proteínas dobradas e para proteínas em conformação desdobrada, apresentam também

Formação de agregados amilóides em doenças neurodegenerativas

algumas semelhanças. Em ambos os casos, os polipéptidos assumem primeiro características mais semelhantes aos precursores do que aos agregados finais. Estes agregados transformam-se depois em espécies que, apesar de ainda não serem fibrilhas, têm características amilóides, tais como a capacidade para formar estruturas beta ou ligar os corantes tioflavina T e vermelho do Congo.⁵

Um dos factores determinantes para a agregação de uma cadeia polipeptídica desdobrada é a presença de porções hidrofóbicas. A substituição de aminoácidos em regiões que influenciam o comportamento da molécula podem diminuir a tendência para agregação se houver diminuição da hidrofobicidade. Pensa-se que a evolução tenha seleccionado proteínas em que não há muitos resíduos hidrofóbicos consecutivos.²⁵

Uma outra propriedade que pode afectar a agregação é carga global ou local da proteína. O aumento da carga dificulta a agregação. Mutações que dão origem a diminuição da carga positiva da proteína resultam na formação mais rápida de agregados com estrutura beta com a capacidade de ligar vermelho do congo e Tioflavina T. Mutações que aumentam a carga da proteína provocam o efeito contrário. Para além disso, a agregação pode ser facilitada na presença de macromoléculas com carga elevada.²⁶

Proteínas nativas desdobradas têm menos resíduos hidrofóbicos e carga mais elevada do que proteínas nativas dobradas. Estas características permitem que as proteínas nativas desdobradas não formem agregados em condições normais.²⁷

Para além da hidrofobicidade e da carga a baixa propensão para formar estrutura alfa e alta para formar estrutura beta são factores importantes na formação de depósitos amilóides. A alternância entre sequências hidrofílicas e hidrofóbicas é muito mais baixa do que o esperado, o que nos leva a concluir que essa configuração favorece o aparecimento de estrutura beta.²⁸

3.2 Factores que causam agregação e proteínas mal dobradas

3.2.1 Mutação

Uma das principais causas da agregação proteica é a ocorrência de mutação. Uma proteína mal dobrada devido a mutação tende a agregar.

Formação de agregados amilóides em doenças neurodegenerativas

No caso da doença de Parkinson, o aparecimento de corpos de Lewis é causado pela mutação no gene da α -sinucleína. A mutação no gene que codifica a parkina (ligase da ubiquitina E3) e a consequente alteração da via da ubiquitina proteassoma pode estar também na origem do aparecimento da doença.

Outro exemplo é a mutação no gene da rodopsina, que provoca retinite pigmentosa. A rodopsina acumula-se perto dos centrossomas na forma de agregados; estas inclusões são ubiquitinadas e activam chaperonas.

Mutações que provocam o aumento da quantidade do trinucleótido CAG, codificando para a poliglutamina, provocam o aparecimento de diferentes doenças neurodegenerativas, nomeadamente a doença de Huntington.³

3.2.2 Stress nitrosativo

O stress nitrosativo deve-se ao aparecimento de radicais livres de óxido nítrico na célula, nomeadamente na célula neuronal.

A activação de receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) provoca influxo de cálcio. Por sua vez é activada a sintase neuronal do NO. Deste modo, os receptores NMDA influenciam o aparecimento de óxido nítrico.²⁹

A produção de radicais livres de NO pode resultar na formação de proteínas mal dobradas e posterior agregação. O NO provoca a nitrosilação de chaperonas tais como a proteína dissulfureto isomerase e da ubiquitina-E3-ligase como é o caso da parkina. Esta reacção tem como consequência a perda de função destas enzimas.

Uma vez que estas enzimas têm como função manter a conformação adequada da proteína, a nitrosilação pode estar na origem de doenças tais como Parkinson ou Alzheimer.³⁰

3.2.3 Modificações pós-traducionais

A proteína tau sofre modificações pós-traducionais e agrega em doenças designadas taupatias, como é o caso da doença de Alzheimer. Entre as várias modificações possíveis estão a fosforilação, glicosilação, ubiquitinação, glicação, poliaminação, nitração e proteólise. A fosforilação e a glicosilação são necessárias à patogénese da doença de Alzheimer. As outras reacções representam tentativas dos neurónios para remover células danificadas, mal dobradas e agregadas.³¹

Formação de agregados amilóides em doenças neurodegenerativas

A proteína precursora amilóide β (PPA β) é importante nos estádios iniciais da agregação na doença de Alzheimer. A alteração pós-traducional da proteína precursora amilóide por glicosilação é crucial para o processamento.³²

Outra alteração importante é a glicação, em que os açúcares são reduzidos pelos aminoácidos lisina e arginina das proteínas. A glicação altera a conformação da proteína. Por exemplo, a glicação pode originar a estrutura β seguindo-se a agregação. A reacção começa com a formação de uma base de Schiff entre um açúcar na sua conformação de cadeira aberta e um grupo amina de uma proteína, culminando com a formação de produtos de glicação avançada.³³

3.3 Mecanismos de agregação proteica

Existem dois mecanismos que podem explicar a agregação de proteínas: mecanismo de crescimento nucleado e o mecanismo de polimerização linear.

3.3.1 Mecanismo de crescimento nucleado

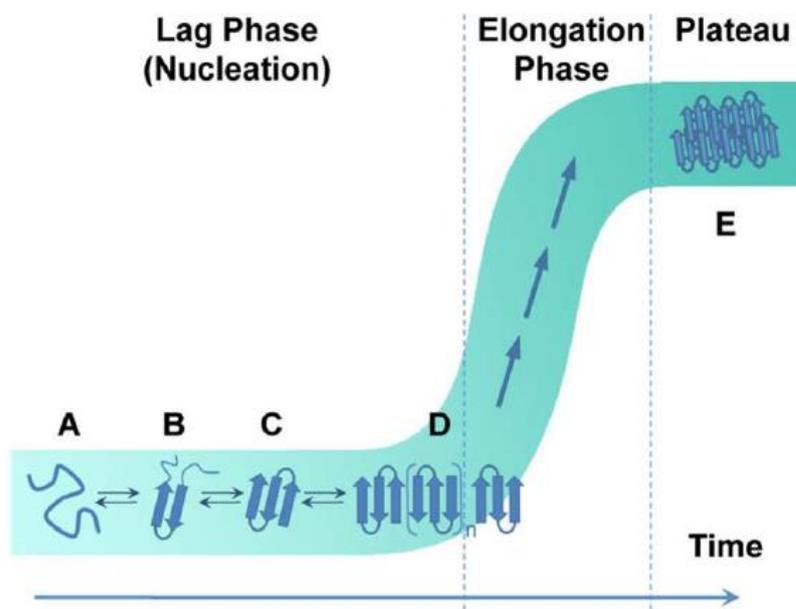


Fig. 3 - Esquema representativo do mecanismo de crescimento nucleado. Inicialmente há uma fase lenta em que proteínas na sua conformação nativa desdobrada (A) formam estrutura β (B) que agrega para formar o núcleo (C) e as protofibrilas (D). Seguidamente, na fase de crescimento (fase mais curta) os monómeros e oligómeros associam-se ao núcleo para formar as fibrilas maduras na fase plateau (E).³⁴

Formação de agregados amilóides em doenças neurodegenerativas

O tempo de conversão da proteína para a forma fibrillar inclui uma fase de latência (*lag phase*) em que o núcleo é formado, e uma fase de crescimento rápido em que monómeros ou oligómeros se associam ao núcleo (Fig. 3).

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, 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.³⁵

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 de proteína aumentando com a primeira e diminuindo com a última. Assim, a uma concentração de proteína suficientemente baixa não haverá formação de polímero. A esta concentração dá-se o nome de concentração crítica. No entanto, em muitos casos, a cinética da reacção 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 fibrilhas já existentes e em impurezas exógenas. No caso da formação de fibrilhas a partir da proteína amilóide 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.³⁶

A adição de fibrilhas 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 de *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.³⁷

Formação de agregados amilóides em doenças neurodegenerativas

A eficiência de fibrilhas pré-formadas para promoção da agregação (*seeding*) é dependente da semelhança entre sequências. Deste modo, a baixa semelhança na sequência pode ser importante na protecção das proteínas contra a agregação.³⁸

3.3.2 Polimerização linear

Num processo de polimerização linear não há fases de nucleação e polimerização separadas. A polimerização pode começar a partir de qualquer espécie monomérica. Cada passo de associação envolve uma ligação semelhante, e deste modo as constantes de associação são independentes do tamanho do polímero. Assim o mecanismo de polimerização linear é semelhante à fase de crescimento do mecanismo de polimerização dependente de nucleação.

Neste tipo de mecanismo não há uma fase lenta e a velocidade de associação é maior no início em que a concentração de monómeros é maior e decresce à medida que a reacção prossegue para o equilíbrio. Não existe nenhum limite de concentração crítica.³⁹

3.4 Intermediários que intervêm na formação de fibrilhas

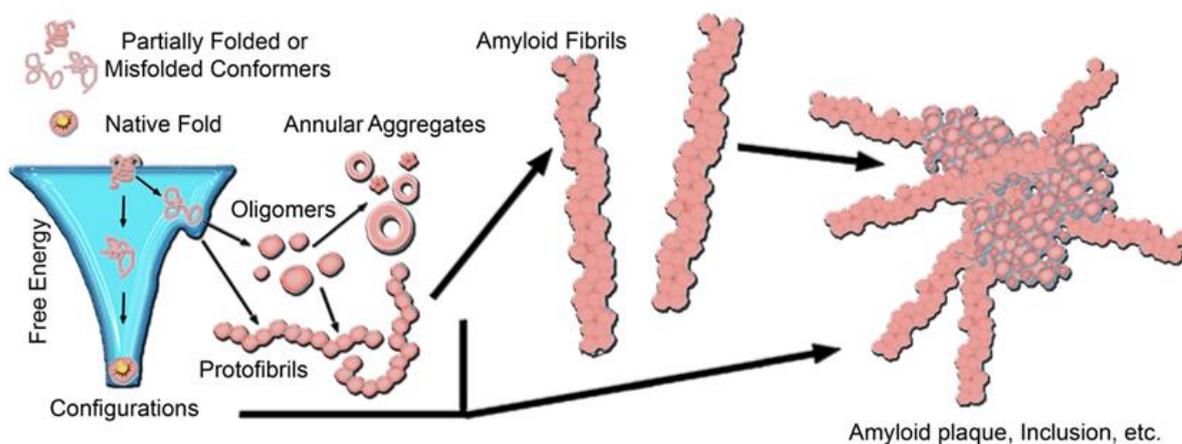


Fig. 4 - A formação de fibrilhas amilóides maduras é precedida pelo aparecimento de intermediários heterogêneos. Entre estes incluem-se as protofibrilhas e os oligómeros. Existem ainda espécies intermediárias que não estão na via de formação de agregados como os agregados anulares.⁴⁰

3.4.1 Protofibrilhas

As protofibrilhas (Fig. 4) são estruturalmente semelhantes às fibrilhas maduras. No entanto, não têm a mesma estrutura ordenada nem a sua simetria. Para além disso são mais

Formação de agregados amilóides em doenças neurodegenerativas

curtas e têm menor diâmetro. Podem ser distinguidas dos oligómeros pela sua forma alongada e linear.

Um dos casos mais estudados é a formação de agregados amilóides pelo péptido A β que está implicado na patogénese da doença de Alzheimer. Antes da formação do péptido A β ocorre formação de espécies não fibrilares, as protofibrilas.

Observam-se estruturas análogas para outros péptidos amiloidogénicos como a alfa-sinucleína, amilina, cadeia leve das imunoglobulinas, transtirretina ou beta-2 microglobulina. Estas espécies contêm cadeias beta e possuem a capacidade de ligar os corantes tioflavina T e vermelho do Congo.⁴¹

3.4.2 Agregados anulares

Estes agregados têm forma de anel e um canal central que contém água. Pela sua semelhança com toxinas formadoras de poros, pensa-se que podem ter a capacidade de interferir com a integridade da membrana. A sua formação pode ocorrer a partir do péptido A β ou α -sinucleína entre outros péptidos.⁴¹

3.4.3 Oligómeros

Os oligómeros são espécies esféricas. Geralmente são considerados pequenos agregados, devido aos dados da solubilidade em condições de centrifugação. No entanto, sabe-se através de outras técnicas que nestes oligómeros ocorre extensão lateral, e assim dão origem a oligómeros de alto peso molecular.⁴¹

3.5 Heterogeneidade das fibrilhas amilóides

Uma proteína pode dar origem a fibrilhas amilóides muito diferentes como resultado da alteração da sequência de aminoácidos, alteração das condições de agregação, ou mesmo mantendo-se as mesmas condições de agregação. Foi observado em determinadas variantes, diferenças no número de protofilamentos, bem como na sua estrutura. Por exemplo, a proteína β_2 microglobulina forma fibrilhas com três tipos de morfologia dependendo do número de protofilamentos e na sua orientação.³⁶

Formação de agregados amilóides em doenças neurodegenerativas

O facto de protofilamentos com características semelhantes estarem dispostos de modo diferente, pode dar origem a fibras amilóides diferentes para a mesma proteína. No entanto, foi também observado polimorfismo devido a diferentes estruturas moleculares. No caso da proteína amiloide β , após comparação espectral de dois polimorfos, formados em diferentes condições de agregação, concluiu-se que havia diferenças na sua estrutura molecular.

A heterogeneidade das fibrilhas amilóides pode ser originada a partir de alterações internas na estrutura β . Estas variações, podem ocorrer na natureza das folhas β , no número de resíduos das cadeias β , ou no espaçamento entre as folhas β . A presença ou ausência de ligações dissulfureto pode alterar a morfologia das fibrilhas por alterar a estrutura β . As alterações na estrutura podem residir na orientação das cadeias (paralela ou antiparalela), orientação das folhas (paralela ou antiparalela) e empacotamento das folhas.⁴²

A proteína contém vários segmentos que podem formar fibrilhas amilóides de diferente estrutura. Diferentes combinações desses segmentos contribuem também para o polimorfismo das fibrilhas amilóides. As condições de agregação também provocam a utilização preferencial de determinados segmentos proteicos em detrimento de outros, influenciando também a variabilidade.⁴³

3.6 Toxicidade dos agregados pré-fibrilares

A presença de depósitos organizados e estáveis nos órgãos de pacientes que sofrem de patologias em que ocorre deposição de proteínas, levou ao pressuposto de que estes agregados são os agentes causadores de doença. No caso da doença de Alzheimer, por exemplo, descobriu-se que as fibrilhas formadas a partir do péptido A β são tóxicas para as células neuronais em cultura, causando despolarização da membrana e alterando a frequência de potenciais de acção.⁴⁴ Para além disso, foi demonstrado que a injeção destas fibrilhas no córtex cerebral de macacos causa perda neuronal e activação microglial.

Recentemente chegou-se a conclusão de que as espécies precursoras das fibrilhas amilóides deverão ser as principais responsáveis pela patogenicidade, sobretudo no que diz respeito a doenças neurológicas.⁴⁵ Murganhos transgénicos começam a ter défices cognitivos, na função celular e na transmissão sináptica antes de ocorrer acumulação de placas amilóides. A injeção de anticorpos anti A β não reduz os depósitos amilóides de murganhos transgénicos, mas reverte a perda de memória.⁴⁶

Formação de agregados amilóides em doenças neurodegenerativas

A doença de Parkinson está associada à formação de agregados intracelulares, nomeadamente corpos de Lewis nos neurónios dopaminérgicos da substância nigra. Também nesta doença se verificou a toxicidade aumentada de espécies precursoras dos agregados fibrilares. Os neurónios dopaminérgicos que sobrevivem, contendo corpos de Lewis ou não, têm a mesma viabilidade. Para além disso, mutações associadas a parkinsonismo juvenil ou Parkinson de início precoce, provocam degeneração neuronal antes de haver a formação de agregados. Em murganhos transgénicos, por exemplo não há uma relação directa entre a presença de agregados de α -sinucleína e a perda de função neuronal. No entanto, a presença de depósitos não fibrilares em várias regiões do cérebro leva a deficiências motoras e perda de neurónios dopaminérgicos.⁴⁷

Após investigação em proteínas amiloidogénicas não relacionadas com doença, como por exemplo em lisozima de cavalo ou o domínio N-terminal da HypF da *E. coli*, observou-se que as espécies pré-fibrilares eram muito tóxicas para neurónios e fibroblastos em cultura. O mesmo não se verificava com espécies com comportamento amilóide e com monómeros no estado nativo, que tinham baixa toxicidade.⁴⁸

A conversão de uma proteína na sua forma solúvel para formas oligoméricas vai fazer com que haja formação de espécies não nativas. Estas espécies mal dobradas são tóxicas, uma vez que contêm grupos que normalmente estão contidos nas proteínas globulares ou dispersos em proteínas desdobradas. Agregados mais pequenos têm maior proporção de resíduos à superfície do que agregados maiores, como os amilóides, e assim têm maior toxicidade. A interacção destes agregados com componentes celulares, tais como membranas, metabolitos, proteínas e outras macromoléculas pode ser prejudicial ao normal funcionamento dos processos bioquímicos podendo em último caso levar a morte celular.⁴⁹

4. Métodos para caracterização de intermediários e agregados amilóides

Na detecção e caracterização da estrutura e evolução dos agregados amilóides e seus intermediários, utiliza-se uma grande diversidade de metodologias experimentais. Nesta breve secção, procede-se à enumeração, descrição do fundamento e utilidade destas técnicas no contexto geral do tema.

4.1 Ressonância magnética nuclear (RMN) de estado sólido

A 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.⁵⁰

4.2 Cristalografia de raios-X

Esta técnica examina estruturas atómicas, utilizando padrões de difracção de raios-X direccionados 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 difracção, 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.⁵⁰

4.3 Ressonância de spin electrónico (RSE)

A partir de RSE é possível caracterizar estados de energia de um sistema com electrões 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 RSE mede spin electrónico.

RSE é actualmente aplicada para estudar a estrutura de péptidos e proteínas nomeadamente a orientação molecular e a interacção com ligandos.⁵⁰

4.4 Microscopia electrónica (ME)

A microscopia electrónica 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.⁵⁰

4.5 Espectroscopias ópticas

Os métodos de espectroscopia óptica são utilizados 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.

4.5.1 Dicroísmo circular (DC)

O dicroísmo circular 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 reflecte 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 protofibrilhas e fibrilhas é acompanhada pela formação de estrutura 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.

4.5.2 Espectroscopia de infra-vermelho

É uma técnica complementar ao DC. É 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

Formação de agregados amilóides em doenças neurodegenerativas

a 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 hélice α tem três bandas a 1654 cm^{-1} , 1644 cm^{-1} e 1662 cm^{-1} .⁵⁰

4.5.3 Fluorescência

A fluorescência de resíduos aromáticos tais como triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe) pode ser utilizada para estudar o dobramento proteico. 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. Tyr tem emissão mais fraca do que Trp, no entanto pode ser útil devido a sua abundância relativa na natureza. Phe é o fluoróforo mais fraco entre os três e a sua fluorescência apenas é observada quando não estão presentes Trp e Tyr.⁵⁰

4.5.4 Métodos de coloração

As sondas de tioflavina t e vermelho do congo têm a capacidade de se ligar às fibrilhas 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.⁵⁰

5. Comentários finais e perspectivas terapêuticas

Nos últimos anos têm sido feitos progressos no que diz respeito ao mecanismo de agregação de proteínas amiloidogénicas e como este se relaciona com a progressão das doenças a elas associadas.

Há muito conhecimento relativamente à via de dobramento das proteínas mais simples, proveniente da conjugação de informação diversa obtida usando técnicas experimentais sofisticadas. Em particular, é já possível promover o dobramento de proteínas

Formação de agregados amilóides em doenças neurodegenerativas

mais pequenas. No entanto, é ainda difícil perceber bem esta questão em proteínas mais complexas.

Algumas das questões a ser estudadas futuramente deverão ser:

- A estrutura das protofibrilhas e dos agregados que precedem as fibras amilóides;
- Estabelecer a relação entre os princípios da agregação proteica e as condições de agregação na célula;
- Estudar melhor a interacção das fibrilhas amilóides com estruturas celulares para que se possam desenvolver novas estratégias terapêuticas.⁵

Com base no estado actual do conhecimento, consideram-se várias hipóteses terapêuticas para as amiloidoses.

5.1 Terapêuticas químicas

Uma das estratégias mais promissoras baseia-se na estabilização do estado solúvel da proteína, diminuindo assim a velocidade a que ocorre a conversão para o estado amilóide. Estudos deste tipo foram feitos com a transtirretina (TTR). TTR é um tetrâmero que transporta a proteína que liga o retinol e hormonas da tiróide, tais como a tiroxina. A mutação no gene deste tetrâmero leva a deposição de fibrilhas amilóides no coração e nervos periféricos. O uso de ligandos específicos para TTR impede a formação de fibrilhas amilóides.⁵¹ Uma estratégia análoga pode ser utilizada em proteínas que tenham uma conformação nativa estável.

Uma segunda alternativa é a pesquisa de pequenas moléculas que possam inibir a formação de fibrilhas e oligómeros. Algumas investigações já referiram vários compostos com essa capacidade, no entanto ainda não foram desenvolvidos compostos com eficácia terapêutica.⁵²

Outra possibilidade é “desenhar” moléculas com a capacidade de interromper o crescimento das fibrilhas amilóides. As cadeias β crescem pela adição de novas porções amilóides. Se conseguirmos adicionar um péptido à extremidade que não ligue mais nenhuma molécula amilóide, o crescimento das fibras é interrompido.⁵³ Por exemplo, o N-terminal da proteína básica mielina foi capaz de inibir o crescimento da fibra $A\beta$.⁵⁴

Um outro processo é uma variante do anterior. Consiste em desenvolver uma estrutura para bloquear a extremidade da fibra amilóide. Sabendo a estrutura atómica de “ziperes estereoquímicos” (*steric zippers*) da proteína Tau desenvolveu-se um péptido que funcionou como uma “capa molecular” e impediu a agregação.⁵⁵

5.2 Terapêuticas biológicas

A formação amilóide depende da concentração das proteínas que dão origem aos agregados. Assim a inibição dos seus precursores pode ser uma boa estratégia terapêutica. A supressão do processo inflamatório que conduz a produção exagerada da proteína A amilóide sérica é uma opção terapêutica para a AA amiloidose; a eliminação dos clones das células B que produzem as cadeias leves de imunoglobulina poderia ser uma possibilidade para a terapia da AL amiloidose.⁵⁶ Pelo facto de haver variabilidade genética, a produção de proteínas amiloidogénicas pode ser maior que o normal, aumentando também o risco de doença. O controlo dessa expressão pode ser a solução para muitas doenças.⁵⁷

Algumas proteínas amilóides derivam de outras entidades proteicas maiores, que necessitam de ser clivadas. Um exemplo é a PPA β que necessita de ser clivada pela β secretase e pela γ secretase para que seja libertado o péptido A β . Inibidores das secretases estão em ensaios clínicos. No entanto precisam de ser melhorados para que não haja efeitos laterais como por exemplo a clivagem de outros substratos.⁵⁸

O facto de a vacinação em murganhos transgénicos PPA β reduzir a amiloidose, fez com que se desenvolvessem técnicas baseadas em anticorpos para a doença de Alzheimer.⁵⁹ Ensaios em humanos mostraram uma redução de A β no cérebro. Contudo, a falta de melhorias cognitivas e o aparecimento de efeitos laterais faz com que seja necessário direccionar os próximos estudos para a prevenção ao invés do tratamento no que diz respeito a esta técnica.⁶⁰ Também já foram feitas imunizações em murganhos para outras proteínas como a proteína Tau e α -sinucleína.⁶¹

6. Bibliografia

1. AMARAL, M.D. - CFTR and chaperones processing and degradation. *J. Mol. Neurosc.*, 23 (2004) 41–48.
2. WEOSTERMARK, P., BENSON, M.D., BUXBAUM, J.N, COHEN, A.S., FRANGIONE, B., IKEDA, S., MASTERS, C.L., MERLINI, G., SARAIVA, M.J., SIPE, J.D. - Amyloid: toward terminology clarification. Report from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid*, 12 (2005) 1–4.
3. NAEEM, A., FAZILI, N.A. - Defective protein folding and aggregation as the basis of neurodegenerative diseases: the darker aspect of proteins. *Cell Biochem Biophys*, 61 (2011) 237-250
4. NAEEM, A., KHAN, T.A., MUZAFFAR, M., AHMAD, S., SALEEMUDDIN, M. - A partially folded state of ovalbumin at low pH tends to aggregate. *Cell. Biochem. Biophys*, 59 (2011) 29–38.
5. CHITI, F., DOBSON, C.M. - Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.*, 75 (2006) 333-366.
6. SUNDE, M., BLAKE, C. - The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction. *Adv. Protein. Chem*, 50 (1997) 123–159.
7. CHAPMAN, M.R., ROBINSON, M.S., PINKNER, J.S., ROTH, R., HEUSER, J., HAMMAR, M., NORMARK, S., HULTGREN, S.J. - Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science*, 295 (2002) 851–855.
8. CLAESSEN, D., RINK, R., DE JONG, W., SIEBRING, J., DE VREUDP, P., BOERSMA, F.G., DIJKHIZEN, L., WOSTEN, H.A. - A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils. *Genes Dev*, 17 (2003) 1714–1726.
9. UVERSKY, V.N. - Mysterious oligomerization of the amyloidogenic proteins. *FEBS J*, 277 (2010) 2940-2953.
10. BUKAU, B., HORWICH, A.L. - The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, 92 (1998) 351–366.
11. HARTL, F.U., HAYER-HARTL, M. - Molecular chaperones in the cytosol: From nascent chain to folded protein. *Science*, 295 (2002) 1852–1858.
12. ANFINSEN, C. - The formation and stabilization of protein structure. *Biochem. J*, 128 (1972) 737–749.
13. HARTL, F.U., HAYER-HARTL, M. - Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat. Struct. Mol. Biol*, 16 (2009) 574-581.
14. NAEEM, A., FAZILI, N.A. - Defective protein folding and aggregation as the basis of neurodegenerative diseases: the darker aspect of proteins. *Cell. Biochem. Biophys*, 61 (2011) 237-250.
15. THOMAS, P.J., QU, B.H., PEDERSEN, P.L. - Defective protein folding as a basis of human disease. *Trends Biochem. Sci*, 20 (1995) 456–459.
16. SABATE, R., DE GROOT, N.S., VENTURA, S. - Protein folding and aggregation in bacteria. *Cell. Mol. Life Sci*, 67 (2010) 2695–2715.
17. UVERSKY, V.N. - Intrinsic disorder in proteins associated with neurodegenerative diseases. *Front. Biosci*, 14 (2009) 5188–5238.
18. CUERVO, A.M., WONG, E.S., MARTINEZ-VICENTE, M. - Protein degradation, aggregation and misfolding. *Mov. Disord*, 25 (2010) S49–S54.
19. PULLARA, F., EMANUELE, A. - Early stages of b2-microglobulin aggregation and the inhibiting action of aB crystallin. *Proteins*, 73 (2008) 1037–1046.

Formação de agregados amilóides em doenças neurodegenerativas

20. SHERMAN, M.Y., GOLDBERG, A.L. - Cellular defenses against unfolded proteins: A cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron*, 29 (2001) 15–32.
21. GOSAL, W.S., MORTEN, I.J., HEWITT, E.W., SMITH, D.A., THOMSON, N.H., RADFORD, S.E. - Competing pathways determine fibril morphology in the self-assembly of beta2-microglobulin into amyloid. *J.Mol. Biol*, 351 (2005) 850–864.
22. RAFFEN, R., DIECKMAN, L.J., SZPUNAR, M., WUNSCHL, C., POKKULRI, P.R., DAVE, P., WILKINS STEVENS, P., CAI, X., SCHIFFER, M., STEVENS, F.J. - Physicochemical consequences of amino acid variations that contribute to fibril formation by immunoglobulin light chains. *Protein. Sci*, 8 (1999) 509–517.
23. BOUCHARD, M., ZURDO, J., NETTLETON, E.J., DOBSON, C.M., ROBINSON, C.V. - Formation of insulin amyloid fibrils followed by FTIR simultaneously with CD and electron microscopy. *Protein Sci*, 9 (2000) 1960–1967.
24. CHOW, M.K., ELLISDON, A.M., CABRITA, L.D., BOTOMLEY, S.P. - Polyglutamine expansion in ataxin-3 does not affect protein stability: implications for misfolding and disease. *J. Biol. Chem*, 279 (2005) 47643–47651.
25. SCHWARTZ, R., ISTRAIL, S., KING, J. - Frequencies of amino acid strings in globular protein sequences indicate suppression of blocks of consecutive hydrophobic residues. *Protein Sci*, 10 (2001) 1023–1031.
26. FANDRICH, M., DOBSON, C.M. - The behaviour of polyamino acids reveals an inverse side chain effect in amyloid structure formation. *EMBO J*, 21 (2002) 5682–5690.
27. UVERSKY, V.N. - Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics. *Protein Sci*, 11 (2002) 739–756.
28. BROOME, B.M., HECHT, M.H. - Nature disfavors sequences of alternating polar and non-polar amino acids: implications for amyloidogenesis. *J. Mol. Biol*, 296 (2000) 961–968.
29. GARTHWAITE, J., CHARLES, S.L., CHESS-WILLIAMS, R. - Endothelium derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intracellular messenger in the brain. *Nature*, 336 (1988) 385–388.
30. BREDT, D.S., HWANG, P.M., GLATT, C.E., LOWENSTEIN, C., REED, R.R., SNYDER, S.H. - Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*, 351 (1991) 714–718.
31. NAKAMURA, T., LIPTON, S.A. - Molecular mechanisms of nitrosative stress-mediated protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Cell. Mol. Life Sci*, 64 (2007) 1609–1620.
32. FUKUSHIMA, N., FURUTA, D., HIDAKA, Y., MORIYAMA, R., TSUJIUCHI, T. - Post translational modifications of tubulin in nervous system. *J Neurochem*, 109 (2009) 683–693.
33. GOMES, R., SOUSA SILVA, M., QUINTAS, A., CORDEIRO, C., FREIRE, A., PEREIRA, P., MARTINS, A., MONTEIRO, E., BARROSO, E., PONCES FREIRE, A. - Argpyrimidine, a methylglyoxal-derived advanced glycation end-product in familial amyloidotic polyneuropathy. *Biochem. J*, 385 (2005) 339–345.
34. SAVELLIEF, M.G., LEE, S., LIU, Y., LIM, M.H. - Untangling amyloid- β , tau, and metals in Alzheimer's disease. *ACS Chem. Biol*, 8 (2013) 856-865.
35. FERRONE, F. - Analysis of protein aggregation kinetics. *Meth. Enzymol.* 309 (1999) 256–274.
36. KUMAR, S., UDGAONKAR, J. B. - Mechanisms of amyloid fibril formation by proteins. *curr. Sci.*, 98 (2010) 639-656.
37. LOMAKIN, A., TELOW, D.B, KIRSCHNER, D.A., BENEDEK, G.B. - Kinetic theory of fibrillogenesis of amyloid beta-protein. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.*, 94 (1997) 7942–7947.

Formação de agregados amilóides em doenças neurodegenerativas

38. TANAKA, M., CHIEN, P., YONEKURA, K., WEISSMAN, J.S. - Mechanism of cross-species prion transmission: an infectious conformation compatible with two highly divergent yeast prion proteins. *Cell*, 121 (2005) 49–62.
39. FRIEDEN, C. - Protein aggregation processes: in search of the mechanism. *Protein Sci*, 16 (2007) 2334–2344.
40. BURKE, K.A. - Biophysical insights into how surfaces, including lipid membranes, modulate protein aggregation related to neurodegeneration. *Front Neurol*, 1 (2013) 4-17.
41. FANDRICH, M. - Oligomeric intermediates in amyloid formation: structure determination and mechanisms of toxicity. *J. Mol. Biol.*, 421 (2012) 427-440.
42. PETKOVA, A.T., LEAPMAN, R.D., GUO, Z., YAU, W.M., MATTSON, M.P., TYCKO, R. - Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's β -amyloid fibrils. *Science*. 307 (2005) 262–265.
43. SAWAYA, M. R., SAMBASHIVAN, S., NELSON, R., IVANOVA, M.I., SIEVERS, S.A., APOSTOL, M.I., THOMPSON, M.J., BALBIRNIE, M., WILTZIUS, J.J., MCFARLANE, H.T., RIEKEL, C., EISENBERG, D. - Atomic structures of amyloid cross- β spines reveal varied steric zippers. *Nature*, 447 (2007) 453–457.
44. LORENZO, A; YANKNER, BA. (1994). - Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 91 (1994) 12243-12247.
45. GEULA, C., WU, C.K., SAROFF, D., LORENZO, A., YUAN, M., YANKNER, B.A. - Aging renders the brain vulnerable to amyloid beta-protein neurotoxicity. *Nat Med*, 4 (1998) 827-831.
46. MOECHARS, D., DEWACHTER, I., LORENT, K., REVERSÉ, D., BAEKELANDT, V., NAIDU, A., TESSEUR, I., SPITTAELS, K., HAUTE, C.V., CHECLER, F., GODAUX, E., CORDELL, B., VAN LEUVEN, F. - Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. *J Biol Chem*, 274 (1999) 6483-6492.
47. KITADA, T., ASAKAWA, S., HATTORI, N., MATSUMINE, H., YAMAMURA, Y., MINOSHIMA, S., YOKOCHI, M., MIZUNO, Y., SHIMIZU, N. (1998). - Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, 392 (1998) 605-608.
48. BUCCIANTINI, M., GIANNONI, E., CHITI, F., BARONI, F., FORMIGLI, L., ZURDO, J., TADDEI, N., RAMPONI, G., DOBSON, C.M., STEFANI, M. - Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature*, 416 (2002) 507-511.
49. DOBSON, C.M. - Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem. Sci*, 24 (1999) 329-332.
50. HUIYUAN, L., RAHIMI, F., SINHA, S., MAITI, P., BITAN, G. - Amyloids and Protein Aggregation—Analytical Methods. In: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd, 2009, ISBN: 9780470027318.
51. JOHNSON, S.M., CONNELLY, S., FEARN, C., POWERS, E.T., KELLY, J.W. - The transthyretin amyloidoses: from delineating the molecular mechanism of aggregation linked to pathology to a regulatory-agency-approved drug. *J Mol Biol*, 421 (2012) 185-203.
52. CHEN, J., ARMSTRONG, A.H., KOEHLER, A.N., HECHT, M.H. - Small molecule microarrays enable the discovery of compounds that bind the Alzheimer's A β peptide and reduce its cytotoxicity. *J. Am. Chem. Soc.*, 132 (2010) 17015–17022.
53. SCIARRETTA, K.L., GORDON, D.J., MEREDITH, S.C. - Peptide-based inhibitors of amyloid assembly. *Methods Enzymol*, 413 (2006) 273–312.

Formação de agregados amilóides em doenças neurodegenerativas

54. LIAO, M.C., HOOS, M.D., AUCCOIN, D., AHMED, M., DAVIS, J., SMITH, S.O., VAN NOSTRAND, W.E. - N-terminal domain of myelin basic protein inhibits amyloid beta-protein fibril assembly. *J. Biol. Chem.*, 285 (2010) 35590–35598.
55. SIEVERS, S.A., KARANICOLAS, J., CHANG, H.W., ZHAO, A., JIANG, L., ZIRAFI, O., STEVENS, J.T., MÜNCH, J., BAKER, D., EISENBERG, D. - Structure-based design of non-natural amino-acid inhibitors of amyloid fibril formation. *Nature*, 475 (2011) 96–100.
56. PEPYS, M.B., HERBERT, J., HUTCHINSON, W.L., TENNENT, G.A., LACHMANN, H.J., GALLIMORE, J.R., LOVAT, L.B., BARTFAI, T., ALANINE, A., HERTEL, C., HOFFMANN, T., JAKOB-ROETNE, R., NORCROSS, R.D., KEMP, J.A., YAMAMURA, K., SUZUKI, M., TAYLOR, G.W., MURRAY, S., THOMPSON, D., PURVIS, A., KOLSTOE, S., WOOD, S.P., HAWKINS, P.N. - Targeted pharmacological depletion of serum amyloid P component for treatment of human amyloidosis. *Nature*, 417 (2002) 254–259.
57. SINGLETON, A., MYERS, A., HARDY, J. - The law of mass action applied to neurodegenerative disease: a hypothesis concerning the etiology and pathogenesis of complex diseases. *Hum. Mol. Genet.*, 13(2004) 123–126.
58. DE STROOPER, B. - Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: a multifactorial view on the disease process. *Physiol. Rev.*, 90 (2010) 465–494.
59. BRODY, D.L., HOLTZMAN, D.M. - Active and passive immunotherapy for neurodegenerative disorders. *Annu. Rev. Neurosci.*, 31(2008) 175–193.
60. GOLDE, T.E., SCHNEIDER, L.S., KOO, E.H. - Anti-ab therapeutics in Alzheimer's disease: the need for a paradigm shift. *Neuron*, 69 (2011) 203–213.
61. AGUZZI, A., O'CONNOR, T. - Protein aggregation diseases: pathogenicity and therapeutic perspectives. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9 (2010) 237–248.