

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Efeito do fibrinogénio na formação de fibras de TTR em  
doentes com amiloidose familiar**

Samuel Filipe da Graça Gilberto

Mestrado em Bioquímica

2011



UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Efeito do fibrinogénio na formação de fibras de  
TTR em doentes com amiloidose familiar**

**Samuel Filipe da Graça Gilberto**

Mestrado em Bioquímica

Dissertação de Tese de Mestrado orientada por

**Doutor Gonçalo da Costa e Doutor Carlos Cordeiro**

Lisboa

2011



---

## AGRADECIMENTOS

Eu gostaria de agradecer, em primeiro lugar, à professora Ana Ponces Freire por me ter acolhido novamente no grupo que lidera, proporcionando sempre as melhores condições para a realização do trabalho apresentado nesta dissertação. Gostaria ainda de agradecer a todos os restantes membros do grupo de enzimologia, em especial ao dr. Carlos Cordeiro, por me ajudar a desenvolver o espírito científico, permitindo-me crescer tanto ao dar os meus primeiros passos como investigador e ao dr. Gonçalo da Costa pelo acompanhamento “em tempo real” de todo o trabalho por mim realizado, por não me deixar desistir em momento algum e por direccionar o trabalho de forma a responder às questões mais pertinentes. A ambos, tenho ainda de agradecer a constante disponibilidade para discussão de resultados e ideias e pela preocupação de que, no laboratório, tudo estivesse sempre “a fluir”. Quero ainda agradecer ao Ricardo, bem como à Cristina, colega e amiga, por ter estado sempre ao meu lado nos momentos de festejo, mas também nas alturas em que nem tudo corria como pretendido. Aos restantes colegas e amigos de outros grupos de investigação, quero salientar o quão importante foram neste último ano, pela companhia e por serem pessoas com que sempre pude contar.

Pretendo ainda salientar a importância de todos aqueles não mencionados que, directa ou indirectamente, contribuíram para a minha formação como investigador, concretamente os diversos docentes do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, que sempre se empenharam em transmitir da melhor forma os seus vastos conhecimentos em bioquímica, dando-me as melhores bases para seguir uma carreira de investigação científica. Quero também deixar um obrigado à Fundação para a Ciência e Tecnologia, FCT, pelo financiamento concedido a este projecto, de forma directa ou através da Rede Nacional de Espectrometria de Massa, RNEM, e sem a qual teria sido impossível o desenvolvimento de todo o trabalho apresentado nesta dissertação.

Não posso deixar de agradecer a todos aqueles que estiveram do meu lado quando mais foi preciso fora do ambiente académico. Em primeiro lugar quero agradecer à Maria João, com quem podia contar para qualquer desabafo, seja em conversas de almoço ou de café, estando ao meu lado nas vitórias, mas sendo também alguém com quem podia contar para ultrapassar as derrotas. Ao Francisco, pela disponibilidade para os momentos de lazer, à Joana e ao André também devo um grande obrigado. Quero ainda salientar o grande valor que tem para mim a amizade de todos aqueles de onde sou natural, que têm estado ao meu lado desde há largos anos e que foram sempre uma força para eu ser bem sucedido.

---

Finalmente, quero agradecer a toda a minha família. Pelas mais diversas razões, sem eles é claro que eu não tinha chegado onde cheguei. Em especial, quero agradecer aos meus pais, Joaquim e Esmeralda, por todo o apoio e toda a dedicação, que sempre significaram muito para mim. Obrigado por me terem ajudado sempre a tomar as decisões difíceis e a seguir as minhas ambições, apesar de muitas vezes tanto vos custar. Quero ainda deixar um obrigado aos meus irmãos Nelson e Jorge por me terem acompanhado todos os dias e, em conjunto com a Daniela e o Isac, por me contagiarem constantemente com a sua alegria.

---

# ÍNDICE

<b>RESUMO</b> .....	vii
<b>SUMMARY</b> .....	ix
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xi
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xv
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xvii
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	xix
1 Polineuropatia Amiloidótica Familiar .....	1
1.1 Resumo histórico .....	1
1.2 Sintomática.....	1
2 Agregação proteica e mecanismos de defesa extracelular.....	2
2.1 Formação de fibras amilóides.....	2
2.2 Chaperones extracelulares.....	6
3 Transtirretina.....	6
3.1 Estrutura e Função.....	6
3.2 Transtirretina no sistema nervoso.....	7
3.3 Mutações e amiloidogenicidade.....	8
4 PAF: Para além das mutações na TTR.....	9
4.1 Diferenças fenotípicas entre indivíduos FAP .....	9
4.2 Outros factores genéticos .....	10
4.3 Factores não genéticos.....	11
5 O Fibrinogénio como interactuante da TTR .....	11
5.1 O Fibrinogénio: estrutura e função.....	11
5.2 Fibrinogénio como chaperone extracelular .....	13
6 Glicação.....	14
6.1 Conceitos gerais.....	14
6.2 Glicação e PAF.....	18
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	19
1 Obtenção de TTR recombinante.....	21
1.1 Sobreexpressão de TTR .....	21
1.2 Obtenção do extracto proteico .....	22
1.3 Purificação da TTR com <i>tag</i> GST .....	23
1.4 Hidrólise do <i>tag</i> GST.....	23
1.5 Quantificação proteica .....	23
2 Glicação <i>in vitro</i> do fibrinogénio .....	24
3 SDS-PAGE .....	24
3.1 Fundamentos da técnica .....	24

---

3.2	Preparação dos géis .....	25
3.3	Preparação da amostra .....	26
3.4	Corrida electroforética .....	26
3.5	Quantificação proteica relativa em géis de SDS-PAGE.....	27
4	Western blotting.....	28
4.1	Fundamentos da técnica .....	28
4.2	Transferência e detecção do antigénio.....	28
5	Espectrometria de massa.....	29
5.1	Fundamentos da técnica .....	29
5.1.1	Métodos de ionização .....	30
5.1.2	Analisadores de massa .....	32
5.1.3	Espectrometria de massa <i>tandem</i> .....	34
5.2	Preparação da amostra para <i>peptide mass fingerprinting</i> .....	36
5.2.1	Preparação das cadeias para digestão proteolítica.....	36
5.2.2	Digestão proteolítica em gel .....	37
5.2.3	Purificação e concentração dos digeridos .....	37
5.2.4	Aplicação na placa de MALDI.....	38
5.3	Preparação da amostra para análise de proteína intacta .....	38
5.4	Aquisição e análise dos espectros.....	39
5.4.1	Espectrometria de massa .....	39
5.4.2	Espectrometria de massa <i>tandem</i> .....	40
6	Indução da agregação de insulina e TTR.....	40
6.1	Efeito do pH na agregação de insulina e TTR .....	41
6.2	Efeito do fibrinogénio na formação de fibras de insulina e TTR.....	41
7	Espectroscopia de fluorescência .....	42
7.1	Fundamentos da técnica .....	42
7.1.1	Arquitectura do espectrofluorímetro.....	43
7.2	Espectros de excitação e emissão de fibrinogénio glicado .....	44
7.3	Detecção da formação de fibras amilóides com a sonda tioflavina T.....	44
<b>RESULTADOS</b> .....		<b>45</b>
1	Locais de glicação do Fibrinogénio .....	47
1.1	Glicação do Fibrinogénio <i>in vitro</i> .....	47
1.2	Cobertura de sequência: Abordagem simples.....	50
1.3	Cobertura de sequência: Abordagem utilizando condições múltiplas .....	52
1.3.1	Optimização de condições para hidrólise com Glu-C.....	53
1.3.2	Cobertura de sequência das cadeias não glicadas .....	55
1.3.3	Cobertura de sequência das cadeias glicadas.....	56
1.4	Locais de glicação.....	58
1.4.1	Importância do uso de várias condições no mapeamento dos locais glicados .....	62
1.4.2	Heterogeneidade da glicação.....	63
1.4.3	Locais de glicação na estrutura do Fibrinogénio.....	66
1.5	Estudo da detecção de péptidos glicados utilizando outras matrizes .....	67
2	Função de <i>chaperone</i> do Fibrinogénio .....	69
2.1	Insulina .....	69
2.1.1	Optimização das condições para agregação da insulina .....	69

---

---

2.1.2	Agregação de insulina na presença de Fibrinogénio.....	72
2.1.3	Glicação e perda da função de <i>chaperone</i> do Fibrinogénio .....	73
2.2	Transtirretina.....	74
2.2.1	Preparação de TTR recombinante.....	74
2.2.2	Confirmação da presença de TTR por <i>electrospray-MS</i> .....	76
2.2.3	Optimização das condições para agregação da TTR.....	78
2.2.4	Agregação de TTR na presença de Fibrinogénio .....	80
2.2.5	Glicação e perda da função de <i>chaperone</i> do Fibrinogénio .....	81
<b>DISCUSSÃO</b> .....		83
Conclusão e perspectivas futuras.....		88
<b>REFERÊNCIAS</b> .....		91
<b>ANEXOS</b> .....		105
1	Dados suplementares .....	107
2	Publicações em revistas científicas internacionais.....	109
2.1	Quantidades relativas de formas de transtirretina na PAF .....	109
2.2	$\alpha$ -sinucleína como biomarcador de PAF .....	110
2.3	Mapeamento dos locais de glicação do fibrinogénio .....	111



---

## RESUMO

A Polineuropatia Amiloidótica Familiar (PAF) é uma doença neurodegenerativa hereditária caracterizada pela deposição de transtirretina (TTR) no sistema nervoso periférico. Como consequência, verifica-se perda de sensibilidade nos membros dos pacientes, seguida de atrofia muscular, fraqueza e morte 10 a 20 anos após o início dos sintomas. O desenvolvimento desta doença requer a presença de TTR mutada, conhecendo-se mais de 80 mutações que levam à formação de fibras amilóides. Como mecanismo para a formação destes agregados, estudos *in vitro* apontam para uma destabilização dos tetrâmeros que contêm variantes da TTR, resultando na formação de monómeros amiloidogénicos. No entanto, existem diversas observações que sugerem um mecanismo mais complexo *in vivo*, envolvendo factores não genéticos. Por exemplo, indivíduos que possuem a mesma mutação no gene da TTR, incluindo gémeos monozigóticos, não mostram o início da sintomatologia com a mesma idade. Existem ainda diferenças geográficas no que toca à idade de desenvolvimento dos sintomas e na própria morfologia dos agregados. Ao contrário do expectável, indivíduos homozigóticos para genes de TTR mutada não apresentam uma forma mais agressiva da doença. Com um papel central nestas diferenças fenotípicas poderão constar mecanismos de defesa, como é o caso do conjunto de proteínas denominadas *chaperones* moleculares. Seguindo esta hipótese, observou-se recentemente uma interacção da TTR com o *chaperone* extracelular fibrinogénio. Curiosamente, o fibrinogénio encontra-se selectivamente modificado em pacientes PAF. Esta modificação pós-traducional, denominada glicação, foi descrita como estando envolvida noutras doenças de natureza semelhante à PAF, como é o caso da doença de Alzheimer ou de Parkinson.

Neste trabalho, investigou-se o efeito do fibrinogénio e da glicação na amiloidogénese da TTR. Verificou-se que o fibrinogénio tem a capacidade de prevenir a sua agregação, atingindo-se a actividade máxima numa proporção molar fibrinogénio:TTR de 1:20, sugerindo uma relevância desta interacção *in vivo*, já que neste caso esta proporção é aproximadamente 1:2. Adicionalmente, observou-se que a glicação do fibrinogénio leva a uma abolição da referida função. Paralelamente, foi realizado um mapeamento dos locais modificados do fibrinogénio com vista a estabelecer a correlação entre os locais modificados e a perda de função deste. Desta forma, foi estabelecido um método optimizado para realizar este mapeamento por espectrometria de massa, tendo-se identificado um total de 60 locais modificados nas três cadeias do fibrinogénio,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , com uma cobertura de sequência média de 82%.

**Palavras-chave:** Polineuropatia Amiloidótica Familiar, Transtirretina, Glicação, Fibrinogénio, Espectrometria de massa



---

## SUMMARY

Familial Amyloidotic Polyneuropathy (FAP) is an hereditary neurodegenerative disease characterized by the deposition of transthyretin (TTR) in the peripheral nervous system. As a consequence, sensibility loss in the patients' arms and legs takes place, followed by muscle atrophy and death after 10 to 20 years of the disease onset. The development of this disease requires the presence of a mutated variant of TTR, being described more than 80 mutations that result in amyloid fiber formation. As a mechanism for TTR aggregation, *in vitro* studies suggest that in these patients TTR tetramer (its native form) is destabilized, resulting in the formation of amyloidogenic monomers. However, several observations suggest a more complex mechanism *in vivo*, with the implication of non-genetic factors. For instance, patients that share the same mutation in the TTR gene, including monozygous twins, do not show the same disease onset age. There are also geographical differences when it comes to the aggregates' morphology and also the disease onset age. Opposite from the expected, homozygous individuals to mutated TTR genes do not show a more aggressive form of the disease. With a central role in these phenotypic differences may be defense mechanisms, such as molecular chaperones. Following this hypothesis, recently an interaction between TTR and the extracellular chaperone fibrinogen was described. Surprisingly, fibrinogen is selectively modified in FAP patients. This post-translational modification, termed glycation, was previously described as being involved in other conformational diseases, such as Alzheimer's and Parkinson's diseases.

In this work, the effect of fibrinogen and glycation in TTR amyloidogenesis was studied by monitoring the aggregation process using spectroscopic methods. It was observed that fibrinogen has the ability to prevent its aggregation, achieving its maximum activity in a molar ratio of 1:20 (fibrinogen:TTR), suggesting a relevance of this interaction *in vivo*, as in this case the ratio fibrinogen:TTR is approximately 1:2. Moreover, it was observed that fibrinogen glycation abolishes its chaperone function. Additionally, the glycation sites in fibrinogen were mapped, in order to correlate those sites with the loss of fibrinogen's chaperone function. Therefore, here is also established an optimized method to perform such mapping using mass spectrometry, having been identified a total of 60 modified sites in the three fibrinogen chains,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , with an average sequence coverage of 82%.

**Keywords:** Familial Amyloidotic Polyneuropathy, Transthyretin, Glycation, Fibrinogen, Mass spectrometry

---



---

## LISTA DE ABREVIATURAS

3'-UTR	do inglês <i>3'-Untranslated region</i>
AAs	aminoácidos
ACN	acetonitrilo
AGE	do inglês <i>advanced glycation endproducts</i>
AGP	argpirimidina
APS	do inglês ammonium persulfate
ATP	adenosina trifosfato
BSA	do inglês <i>bovine serum albumin</i>
cDNA	do inglês <i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
CEL	N <sub>ε</sub> -carboxietil-lisina
CHCA	ácido α-ciano-4-hidroxicinamínico
CID	do inglês <i>collision-induced dissociation</i>
CS	cobertura de sequência
DHB	ácido 2,5-diidroxibenzóico
DNA	do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ERK 1/2	do inglês <i>Extracellular signal-regulated protein kinases</i>
ESI	do inglês <i>electrospray ionization</i>
FTICR	do inglês <i>Fourier transform ion cyclotron resonance</i>
FTIR	do inglês <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
GRAVY	do inglês <i>grand average of hydropathicity index</i>
GST	glutathione S-transferase
HABA	ácido 2-(4-hidroxifenilazo)benzóico
HMB	ácido 2-hidroxi-5-metoxibenzóico
Hsc70	do inglês <i>Heat shock chaperone 70</i>
ICR	do inglês <i>ion cyclotron resonance</i>
I <sub>F</sub>	intensidade de fluorescência
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo
L55P	substituição de um resíduo de leucina por um resíduo de prolina na posição 55
LB	do inglês <i>lysogeny broth</i>
LC-MS	do inglês <i>liquid chromatography – mass spectrometry</i>

---

MALDI	do inglês <i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MAPK	do inglês <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MG	metilglioxal
MG-HI	Nδ-(5-hidro-5-metil-4-imidazolón-2-il)-ornitina e respectivos isómeros
miRNA	do inglês <i>micro ribonucleic acid</i>
MODIC	do inglês <i>methylglyoxal-derived imidazolium cross-link</i>
MOLD	do inglês <i>methylglyoxal lysine dimer</i>
MS	do inglês <i>mass spectrometry</i>
<i>m/z</i>	razão massa/carga
Nf-kB	factor nuclear kappa B
PAF	polineuropatia amiloidótica familiar
PAGE	do inglês <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PAM	do inglês <i>peptidylglycine α-amidating monooxygenase</i>
PBS	do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
PBS-T	do inglês <i>phosphate buffered saline – tween-20</i>
PDB	do inglês <i>Protein Data Bank</i>
PI3K	do inglês <i>phosphoinositide 3-kinases</i>
PMF	do inglês <i>peptide mass fingerprinting</i>
PVDF	do inglês <i>polyvinylidene difluoride</i>
RAGE	receptor de produtos avançados de glicação
RBP	do inglês <i>retinol binding protein</i>
SA	ácido sinapínico
SAP	do inglês <i>plasma pentraxin serum amyloid P component</i>
SDS	do inglês <i>sodium dodecyl sulphate</i>
SDS-PAGE	do inglês <i>sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SNAP	do inglês <i>sophisticated numerical annotation procedure</i>
SNC	sistema nervoso central
SNP	sistema nervoso periférico
SSA	do inglês <i>senile systemic amyloidosis</i>
T <sub>4</sub>	tiroxina
TBE	Tris/Borato/EDTA
TBS	do inglês <i>tris buffered saline</i>
TBS-T	do inglês <i>tris buffered saline – tween-20</i>
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina

---

---

TFA	ácido trifluoroacético
THAP	2,4,6-triidroxi-acetofenona
ThT	do inglês <i>thioflavin T</i>
TOF	do inglês <i>time-of-flight</i>
TTR	transtirretina
V30M	substituição de um resíduo de valina por um resíduo de metionina na posição 30
WT	do inglês <i>wild-type</i>



---

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Protocolo para a realização dos géis de SDS-PAGE .....	26
Tabela 2 – Cobertura de sequência da BSA e do fibrinogénio após digestão com tripsina .....	51
Tabela 3 – Aferição das condições mais adequadas à digestão de BSA com Glu-C.....	54
Tabela 4 – Aumento de cobertura de sequência com cada um dos passos acrescentados à preparação da amostra. ....	56
Tabela 5 – Cobertura de sequência das três cadeias de fibrinogénio glicadas.....	58
Tabela 6 - Locais de glicação da cadeia $\alpha$ do fibrinogénio.....	60
Tabela 7 - Locais de glicação da cadeia $\beta$ do fibrinogénio.....	61
Tabela 8 - Locais de glicação da cadeia $\gamma$ do fibrinogénio .....	62
Tabela 9 – Locais de glicação da cadeia $\beta$ do fibrinogénio para as sete matrizes testadas.....	68



---

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Competição cinética entre vias promotoras da homeostase celular ( <i>folding</i> e vias de controlo de qualidade), e vias de agregação .....	3
Figura 2 – Estrutura de fibras amilóides .....	4
Figura 3 – Mecanismos propostos para a formação de fibras amilóides .....	5
Figura 4 – Estrutura da Transtirretina humana na presença de RBP .....	7
Figura 5 – Modelo da formação de fibras amilóides da TTR .....	9
Figura 6 – Estrutura do Fibrinogénio humano .....	12
Figura 7 – Esquema da reacção de Maillard exemplificada para a glicação com glucose.....	15
Figura 8 – AGE formados após glicação com metilglioxal .....	16
Figura 9 – Sistema de electroforese em gel de poliacrilamida vertical.....	27
Figura 10 – Diagrama representativo da arquitectura de um espectrómetro de massa .....	30
Figura 11 – Representação esquemática dos métodos de ionização <i>electrospray</i> e MALDI .....	31
Figura 12 – Representação esquemática dos analisadores de massa TOF e FTICR .....	34
Figura 13 – Nomenclatura dos fragmentos peptídicos originados por espectrometria de massa tandem .....	36
Figura 14 – Diagrama de Jablonski que representa as transferências de energia ocorridas aquando da absorção de fotões por um fluoróforo.....	43
Figura 15 – Extensão da glicação do fibrinogénio.....	47
Figura 16 – Extensão da glicação do fibrinogénio ao longo do tempo e com concentrações crescentes de metilglioxal .....	49
Figura 17 - Espectros de excitação e de emissão de fluorescência do fibrinogénio glicado .....	50
Figura 18 - Representação esquemática do método de preparação da amostra utilizado neste trabalho .....	53
Figura 19 – Cobertura de sequência da BSA após hidrólise com tripsina e Glu-C .....	55
Figura 20 – Comparação dos espectros de digeridos da cadeia $\beta$ do fibrinogénio com Glu-C.....	57
Figura 21 – Comparação dos péptidos glicosados e não glicosados de fibrinogénio detectados em diferentes condições. ....	59

---

Figura 22 - Espectro parcial da cadeia $\beta$ do fibrinogénio após digestão com Glu-C e espectros de fragmentação do péptido TVNSNIPTNLRVLSILE .....	64
Figura 23 – Espectro parcial da cadeia $\beta$ do fibrinogénio após digestão com Glu-C e espectros de fragmentação do péptido ALLQQERPIRNSVDE.....	66
Figura 24 – Locais de glicação na estrutura do fibrinogénio .....	67
Figura 25 – Cinética de agregação da insulina 0,6 mg/mL a pH 4,6.....	70
Figura 26 – Agregação de insulina a baixas concentrações.....	71
Figura 27 – Efeito do fibrinogénio na agregação da insulina.....	72
Figura 28 – Efeito da glicação na actividade supressora da agregação da insulina .....	73
Figura 29 – Tratamento de esferas contendo TTR-GST com crescentes unidades de trombina, com as espécies resultantes a serem analisadas por SDS-PAGE.....	75
Figura 30 – Regressão linear absorvência vs concentração proteica para quantificação em amostras de TTR pelo método de Bradford.....	76
Figura 31 – Confirmação da presença de TTR por espectrometria de massa e análise da presença de contaminantes .....	77
Figura 32 – Influência do tempo de incubação na amiloidogénese da TTR .....	79
Figura 33 – Formação de fibras amilóides de TTR a pH 4,6 durante 3 dias a 37°C.....	80
Figura 34 – Efeito do fibrinogénio na agregação da TTR.....	81
Figura 35 – Efeito da glicação na actividade de chaperone do fibrinogénio em condições propícias à agregação da TTR.....	82
Figura 36 – Possíveis vias de actuação do fibrinogénio na formação de fibras amilóides de TTR, com base no modelo apresentado por Quintas <i>et al.</i> .....	86

## **ANEXO 1**

Figura suplementar 1 – Espectro de massa da BSA após digestão com tripsina e Glu-C, obtido por MALDI-MS seguindo uma abordagem simples.....	107
Figura suplementar 2 – Espectros de massa das três cadeias de fibrinogénio após digestão com tripsina, obtidos por MALDI-MS seguindo uma abordagem simples.....	108

# INTRODUÇÃO



# 1 Polineuropatia Amiloidótica Familiar

## 1.1 Resumo histórico

A Polineuropatia Amiloidótica Familiar (PAF) é uma doença hereditária neurodegenerativa autossómica dominante que tem por base a mutação numa proteína abundante no plasma sanguíneo denominada transtirretina (TTR, também denominada prealbumina) (Costa *et al*, 1978; Buxbaum *et al*, 2009; Fleming *et al*, 2009). Esta doença foi descrita pela primeira vez em 1952 em famílias portuguesas pelo médico Corino de Andrade na revista “Brain” (Andrade, 1952). Em Portugal, os dois principais focos da doença são nas zonas da Póvoa de Varzim e Vila do Conde (Saraiva *et al*, 1984; Sousa *et al*, 1995). Foram também descritos focos da doença no Japão e na Suécia em 1983 e 1984, em que os pacientes apresentam a mesma mutação que os indivíduos portugueses (Andersson, 1976; Tawara *et al*, 1983). Tem sido sugerido que estes indivíduos apresentam um antepassado comum, sendo que a “migração” desta versão mutada da TTR se terá dado para o Japão durante os descobrimentos portugueses e, para o caso sueco, durante as investidas *vickings* à Península Ibérica (Sales Luís, 2006). De facto, surgiram também focos da doença noutros países de emigração portuguesa, nomeadamente Estados Unidos da América, França e Brasil, que suportam esta hipótese (Sales Luís, 2006).

## 1.2 Sintomática

A PAF caracteriza-se pela deposição sistémica de fibras amilóides de TTR, com especial incidência sobre o sistema nervoso periférico (SNP) (Coimbra *et al*, 1971). Como consequência, inicia-se a degeneração axonal, que se inicia pelas fibras nervosas não mielinizadas (Thomas *et al*, 1974). Os primeiros sintomas ocorrem normalmente antes dos 40 anos, com perda de sensibilidade motora nos membros inferiores. Posteriormente, dá-se atrofia e fraqueza muscular e, por fim, morte 10 a 20 anos após o início dos sintomas (Coutinho *et al*, 1980; Sousa *et al*, 1995). Para além dos sintomas relacionados com o sistema nervoso periférico, é também comum entre os pacientes PAF ocorrer uma disfunção no sistema nervoso autónomo, com consequências ao nível do sistema gastrointestinal, renal e cardiovascular (Guimarães *et al*, 1980).

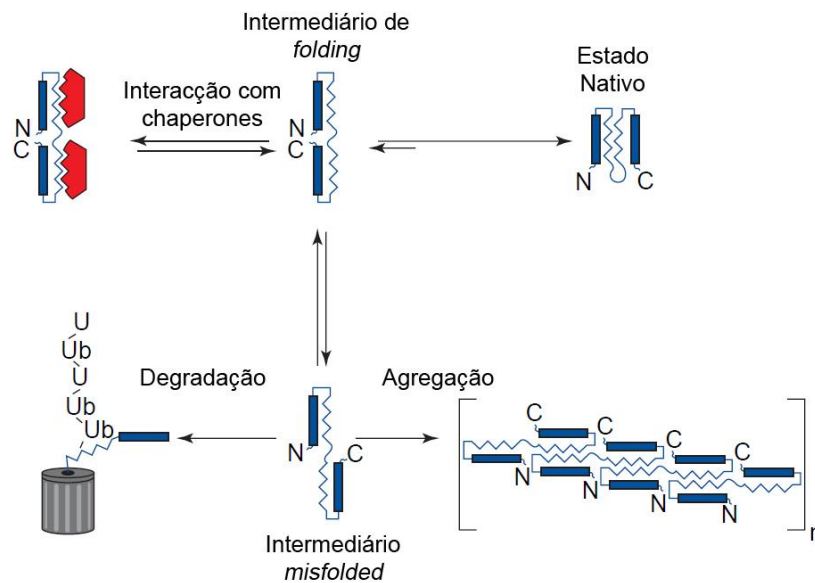
## 2 Agregação proteica e mecanismos de defesa extracelular

### 2.1 Formação de fibras amilóides

O mecanismo de deposição de agregados proteicos que se observa na PAF é comum a outras patologias, nomeadamente às doenças de Alzheimer e Parkinson, a doença de Huntington, a doença de Creutzfeld–Jacob ou a amiloidose associada à hemodiálise, entre outras (Uversky, 2010). Estas doenças têm como principal característica a conversão de certas proteínas solúveis e inofensivas em agregados estáveis, ordenados e filamentosos denominados fibras amilóides e que se podem acumular numa diversidade de órgãos e tecidos (Fink, 1998; Uversky, 2010). Foram já descritos vários mecanismos potenciais para a citotoxicidade que advém desta deposição proteica, como o desencadeamento da apoptose celular, a quebra da arquitectura membranar, stress oxidativo, a quebra da homeostase celular devido à exaustão dos mecanismos de defesa celular, a perda de função proteica crucial à célula ou o próprio ganho de funções tóxicas (Uversky, 2010).

Em condições normais da célula, a aquisição da estrutura funcional de uma proteína (conformação nativa, obtida através da via de *fold*ing) é muito favorecida quando comparada com processos de agregação proteica (Figura 1). Para que isto ocorra, a célula possui mecanismos que favorecem a via de *fold*ing. Esta maquinaria de ‘controlo de qualidade’ suprime a formação de agregados assegurando o *fold*ing correcto de proteínas nascentes ou desnaturadas através da sua interacção com chaperones moleculares ou promovendo a degradação selectiva de polipéptidos com uma conformação incorrecta (*misfolded*) (Kopito, 2000).

Em termos gerais, os chaperones moleculares ajudam a minimizar a ocorrência de vias alternativas ao *fold*ing protegendo as regiões hidrófobas de intermediários desestruturados ou com uma conformação não nativa. Este processo evita a ocorrência de interacções intra ou intermoleculares desapropriadas que levariam à agregação proteica. Alternativamente, proteínas com uma conformação incorrecta podem ser marcadas para degradação no retículo endoplasmático ou no citosol através de poliubiquitinação, sendo assim sujeitos a proteólise por parte do proteassoma (Kopito, 2000).

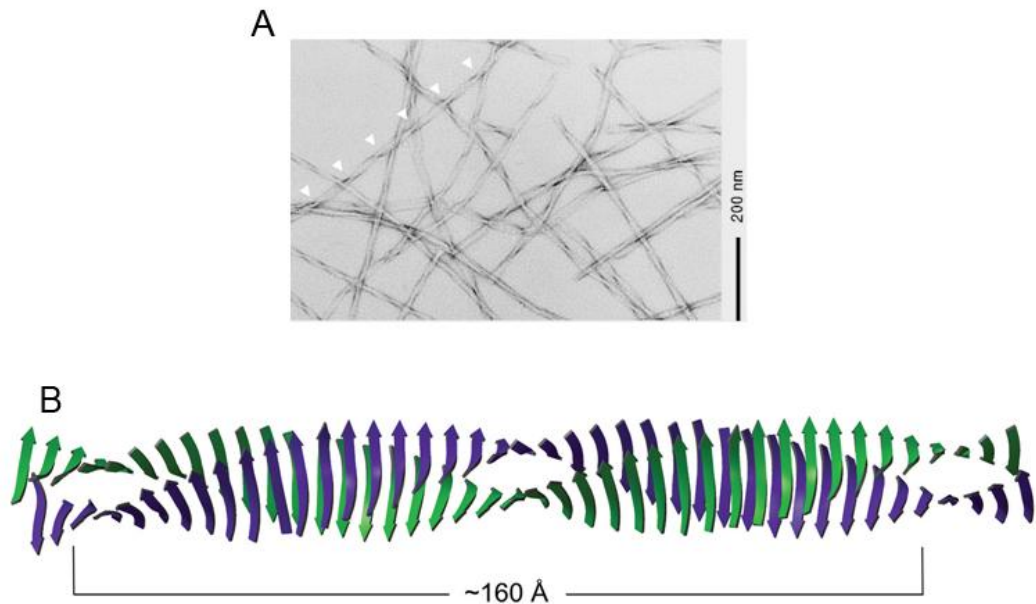


**Figura 1** – Competição cinética entre vias promotoras da homeostase celular (*folding* e vias de controlo de qualidade), e vias de agregação. Note-se que a agregação é um processo considerado irreversível. N, C: terminal amina e carboxilo, respectivamente. Adaptado de Kopito, 2000.

Os mecanismos referidos permitem vencer a “corrida cinética” existente entre vias de *folding* e agregação em condições normais da célula. No entanto, existem factores que favorecem a aquisição de conformações *misfolded* por parte de certas proteínas, onde constam factores de ordem ambiental (pH, temperatura, concentração da proteína, presença de metabolitos caotrópicos e ausência de mecanismos de ‘controlo de qualidade’) ou de natureza genética (caso esteja presente uma variante mutada instável da proteína). Caso um número excessivo de proteínas adoptem uma conformação incorrecta, os mecanismos de defesa da célula saturam e a via de agregação torna-se cineticamente favorável (Fink, 1998).

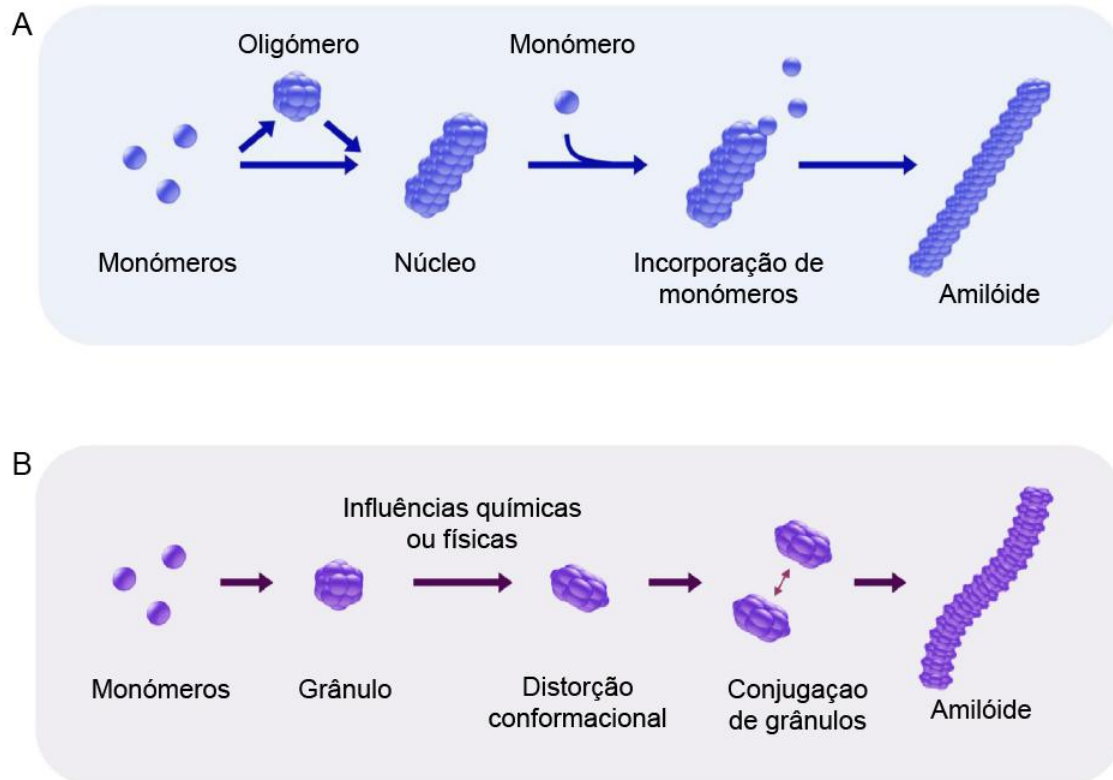
Os agregados proteicos formados como consequência dos factores acima referidos podem ser ordenados (fibras amilóides) ou desordenados (por exemplo, corpos de inclusão). As fibras amilóides originadas pela polimerização de diferentes proteínas apresentam entre si propriedades semelhantes, em especial a sua estrutura em folha  $\beta$  cruzada. As fibras apresentam ainda periodicidade estrutural que tem origem na sua estrutura contorcida (Fandrich, 2007). Neste tipo de estrutura, os elementos polipeptídicos constituintes da fibra apresentam estrutura em folha  $\beta$ , de forma paralela entre si mas perpendicular ao eixo da fibra (Figura 2) (Fink, 1998; Fandrich, 2007). As fibras podem ser constituídas por mais do que um filamento de estrutura em folha  $\beta$  cruzada (Esposito *et al*, 2006; Fandrich, 2007). A detecção da

formação deste tipo de estrutura pode ser realizado por cristalografia de raios-X, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) ou através de sondas, tais como o vermelho Congo ou a Tioflavina T (Fandrich, 2007).



**Figura 2** – Estrutura de fibras amilóides. (A) Imagem de microscopia electrónica de um conjunto de fibras do péptido  $\beta$  amilóide. As setas brancas indicam zonas de cruzamento das folhas  $\beta$  e que se repetem ao longo da fibra. (B) Simulação da estrutura de uma fibra amilóide de um péptido da proteína priónica Sup35 de levedura. A fibra é constituída por dois filamentos. As setas indicam estrutura em folha  $\beta$ . Adaptado de Esposito *et al*, 2006 e Frandrich, 2007.

A formação de fibras amilóides inicia-se com a associação intermolecular de proteínas *misfolded* através das respectivas regiões hidrófobas expostas, dando origem a agregados oligoméricos solúveis (Fink, 1998). No entanto, com a amplificação desses agregados chega-se a uma situação em que se atinge o respectivo limite de solubilidade e ocorre a deposição das fibras insolúveis. O mecanismo de amiloidogénese é ainda alvo de alguma controvérsia. No entanto, existem dois mecanismos descritos na literatura: fibrilhação dependente de nucleação (*nucleation-dependent fibrillation*) e a fibrilhação concertada dupla (*double-concerted fibrillation*). Estes mecanismos diferem na forma como a “semente” iniciadora da fibrilhação é formada, bem como no respectivo mecanismo de amplificação (Figura 3) (Bhak *et al*, 2009).



**Figura 3** – Mecanismos propostos para a formação de fibras amilóides: (A) fibrilhação dependente de nucleação e (B) fibrilhação concertada dupla. Adaptado de Bhak *et al*, 2009.

Segundo o primeiro modelo referido, a formação de fibras amilóides inicia-se com a associação de vários monómeros da proteína amiloidogénica com consequente formação de um oligómero denominado núcleo, já que se trata do impulsionador da formação de toda a fibra. A formação do núcleo é termodinamicamente desfavorável, sendo por isso este o passo limitante da amiloidogénese. A sua presença induz alterações conformacionais nos monómeros amiloidogénicos presentes, dando-se agora o rápido acréscimo de mais monómeros, ocorrendo propagação da fibra amilóide de forma exponencial (Bhak *et al*, 2009; Uversky, 2010). Já no caso do modelo da fibrilhação concertada dupla, sugeriu-se que haveriam dois passos de associação de espécies: primeiro entre monómeros, dando origem a espécies oligoméricas granulares que depois se associam entre si para dar origem à fibra amilóide (Bhak *et al*, 2009). Curiosamente, a toxicidade verificada em doenças degenerativas aparenta advir das espécies oligoméricas solúveis ao invés das fibras amilóides (Uversky, 2010). Concretamente para a polineuropatia amiloidótica familiar, Sousa, M. *et al* descrevem que os processos neurodegenerativos são iniciados por estes agregados não fibrilares de transtirretina, referindo ainda as fibras maduras como sendo inertes, incapazes de causar dano celular (Sousa *et al*, 2001a).

## 2.2 Chaperones extracelulares

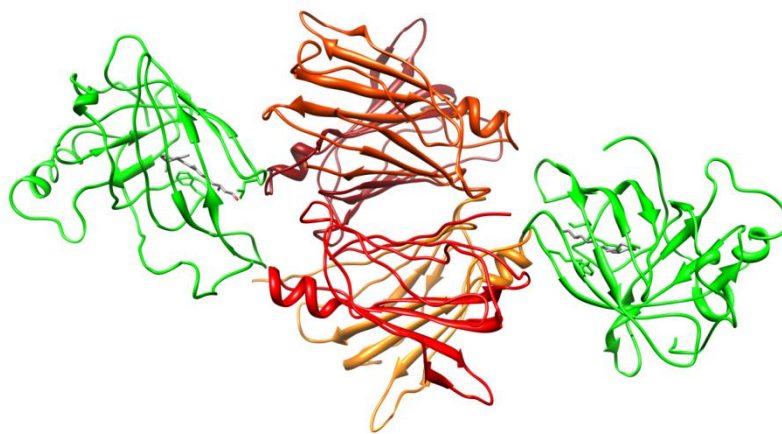
Da mesma forma que existem no meio intracelular, eventuais mecanismos de defesa do organismo que previnam a aquisição de uma conformação *misfolded* de proteínas do plasma (como a TTR) têm sido também descritos no meio extracelular (Yerbury *et al*, 2005b). No entanto, este é um tema ainda largamente inexplorado. A clusterina foi referida como sendo um *chaperone* extracelular eficiente, inibindo a agregação de proteínas com uma conformação incorrecta de forma independente do ATP (Humphreys *et al*, 1999; Poon *et al*, 2002). Outra proteína, a haptoglobina (conhecida por se ligar à hemoglobina) é uma proteína de fase aguda abundante que também aparenta ser um *chaperone* extracelular, de função semelhante à clusterina (Yerbury *et al*, 2005a). No entanto, nem a clusterina nem a haptoglobina conseguem induzir o *refolding*, mantendo sim um estado competente para se dar a acção de *chaperones* indutores do *foldings* dependentes do ATP, tal como acontece no meio intracelular (por exemplo, por acção da Hsc70, *Heat shock chaperone 70*). No entanto, ainda não foi confirmada a presença de *chaperones* com actividade de *refolding* no meio extracelular (Yerbury *et al*, 2005b). Uma proteína potencial que pode desempenhar esta função é o *plasma pentraxin serum amyloid P component* (SAP), com actividade independente do ATP. No entanto, para exercer esta função os autores tiveram de utilizar uma concentração molar do *chaperone* sobre a proteína-alvo 10 vezes superior, suscitando algumas dúvidas ao nível da sua relevância *in vivo* (Coker *et al*, 2000; Yerbury *et al*, 2005b). Mais recentemente, o fibrinogénio foi também descrito como um *chaperone* extracelular, mas pouco se sabe acerca do mecanismo envolvido (Tang *et al*, 2009a; Tang *et al*, 2009b).

## 3 Transtirretina

### 3.1 Estrutura e Função

A Transtirretina (TTR) é uma proteína homotetramérica de 55kDa, com 127 aminoácidos por monómero, presente em abundância no sangue mas também no líquido cérebro-espinhal. É maioritariamente produzida no fígado e no plexus coróide do cérebro, mas também no epitélio pigmentar retinal e no pâncreas (Buxbaum *et al*, 2009). A nível de estrutura terciária, o *foldings* de cada monómero deve-se maioritariamente à associação intra-cadeia das duas folhas  $\beta$  existentes (Figura 4) (Blake *et al*, 1978).

A Transtirretina tem como principais funções o transporte da hormona tiroxina ( $T_4$ ) e de retinol, este último através da formação de um complexo TTR:retinol binding protein (RBP) (Buxbaum *et al*, 2009; Fleming *et al*, 2009), Figura 4. Apesar de transportar 15% da  $T_4$ , estudos com ratinhos *knockout* no gene da TTR demonstraram que a sua ausência não afecta a função desta hormona (Fleming *et al*, 2009). No caso do retinol (vitamina A), este é essencial para que se dê a cascata de estímulos químicos e eléctricos interpretados como visão no córtex visual. Neste processo, a TTR tem um papel preponderante, já que o retinol necessário provém do fígado, que o segrega ligado ao complexo transportador TTR:RBP (Buxbaum *et al*, 2009).



**Figura 4** – Estrutura da Transtirretina humana (cor-de-laranja) na presença de RBP (verde) e do respectivo ligando, o retinol (cinzento). Código do PDB: 1QAB (Naylor *et al*, 1999).

Apesar de ao longo de vários anos se conhecerem apenas as funções de transporte da transtirretina (as quais lhe deram o nome), têm sido descobertas outras funções que denotam um papel bastante relevante desta proteína na homeostase a diferentes níveis. Recentemente, a TTR foi também descrita como tendo actividade proteolítica. Foi sugerido que esta actividade seria importante no efluxo de colesterol, conferindo à TTR um papel na aterosclerose (Fleming *et al*, 2009).

### 3.2 Transtirretina no sistema nervoso

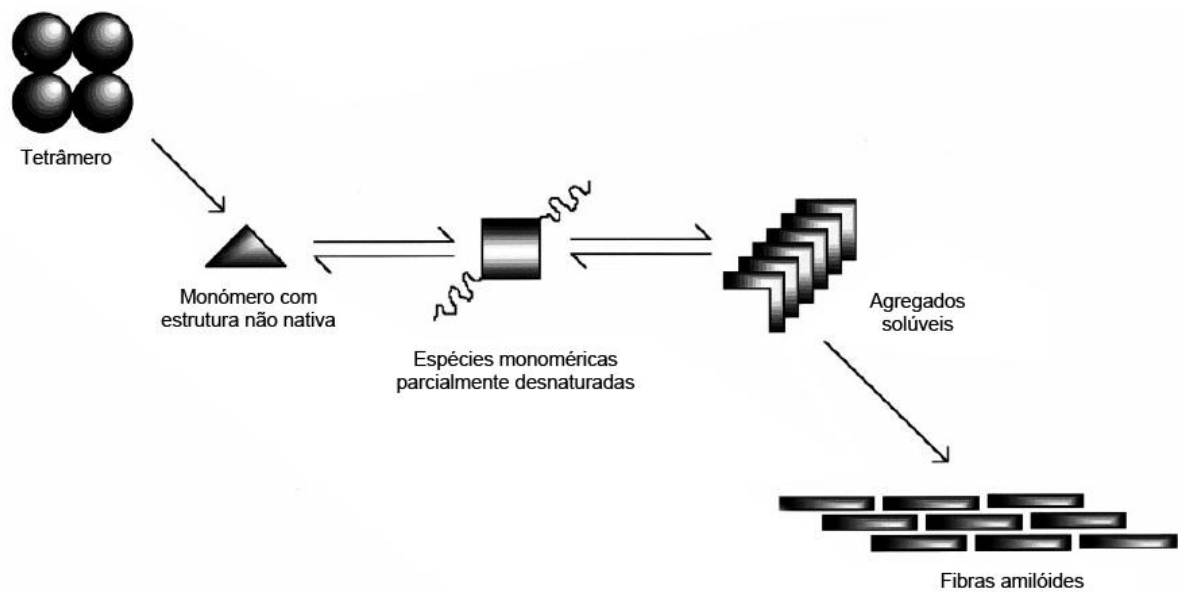
A TTR também aparenta ter um papel negativo na maturação do neurotransmissor anti-depressivo neuropéptido Y, por regulação da expressão do *peptidylglycine  $\alpha$ -amidating*

*monoxygenase* (PAM). Este factor explica as observações de que ratinhos *knockout* no gene da TTR são menos sujeitos a depressão que ratinhos *wild-type* (Fleming *et al*, 2009). Para além disto, foi descrito adicionalmente que o neuropéptido Y está, também ele, sujeito à actividade proteolítica da TTR. O processamento deste péptido foi sugerido como responsável pela alteração da sua selectividade aos respectivos receptores (Medeiros *et al*, 1996). A TTR é ainda um impulsionador da regeneração nervosa (Fleming *et al*, 2007), estimulando o crescimento axonal, de forma dependente da sua actividade proteolítica (Fleming *et al*, 2009).

Em modelos animais da doença de Alzheimer, demonstrou-se que a TTR tem um papel protector do sistema nervoso, possivelmente através da interacção com o péptido  $\beta$ -amilóide (Buxbaum *et al*, 2009). De facto, este péptido está também sujeito a proteólise pela TTR (Costa *et al*, 2008). O facto de pacientes com esta doença apresentarem um decréscimo da quantidade de TTR no fluido cérebro-espinhal (Serot *et al*, 1997) indica que a actividade proteolítica da TTR pode ter um papel preponderante como mecanismo de defesa contra a agregação do  $\beta$ -amilóide.

### 3.3 Mutações e amiloidogenicidade

Foram descritas mais de 80 mutações no gene que codifica a TTR com implicações no desenvolvimento de fibras amilóides (Quintas *et al*, 1999). A mutação mais comum em pacientes PAF resulta numa substituição de um resíduo de Valina na posição 30 por uma Metionina (TTR V30M) (Connors *et al*, 2000). Esta variante é denominada PAF tipo I ou tipo português. Esta é a mutação mais recorrente nas regiões endémicas mencionadas (Portugal, Suécia e Japão), reforçando a hipótese do antepassado comum responsável pela existência de portadores da mutação pelas várias regiões. No entanto, a mutação presente nos pacientes que apresentam a forma mais agressiva da doença resulta na substituição de um resíduo de Leucina por uma Prolina na posição 55 (TTR L55P) (Jacobson *et al*, 1992). Estudos *in vitro* sugerem como mecanismo para a crescente amiloidogenicidade a reduzida estabilidade da forma tetramérica nos indivíduos que possuem a TTR mutada. Os monómeros resultantes (com uma estrutura não nativa) são mais instáveis no caso das variantes amiloidogénicas, adquirindo uma estrutura parcialmente desnaturada com uma elevada tendência a agregar (Figura 5) (Quintas *et al*, 1999; Quintas *et al*, 2001). Dá-se então a formação de agregados oligoméricos solúveis que precede a deposição na forma de fibras amilóides observada nos nervos do SNP.



**Figura 5** – Modelo da formação de fibras amilóides da TTR. Adaptado de Quintas *et al*, 2001.

As mutações na TTR aparentam ser apenas um factor que acentua a amiloidogenicidade desta proteína, já que a transtirretina não mutada (*wild-type*) tem também propensão para agregar, estando este processo na base do desenvolvimento da Amiloidose Sistémica Senil (SSA, do inglês *Senile Systemic Amyloidosis*) (Pitkanen *et al*, 1984; Westermark *et al*, 1990). Esta doença verifica-se apenas em indivíduos de idade avançada, e caracteriza-se pela deposição de TTR preferencialmente nos tecidos cardíacos, mas também no intestino e túnel carpal (Pitkanen *et al*, 1984; Kyle *et al*, 1992; Rocken *et al*, 1994; Buxbaum *et al*, 2009).

## 4 PAF: Para além das mutações na TTR

### 4.1 Diferenças fenotípicas entre indivíduos FAP

Apesar de se tratar de uma doença genética com as suas origens na mutação da TTR, já Corino de Andrade sugeria, no seu artigo original, que outros factores estariam envolvidos no desenvolvimento da PAF (Andrade, 1952). De facto, outros autores viriam a afirmar o mesmo, uma vez que o mecanismo proposto com base em estudos *in vitro* não consegue justificar factores importantes. Em primeiro lugar, está o facto de a própria TTR *wild-type* agregar na forma de fibras amilóides (Westermark *et al*, 1990), indicando que a mutação apenas acelera a

formação de fibras amilóides. Deste modo, as mutações na TTR aparentam ser apenas um acelerador para a aquisição de uma estrutura incorrecta, mas esta propriedade é já intrínseca à própria TTR.

Existem diferenças geográficas no fenótipo da doença em indivíduos que apresentam a mesma mutação, por exemplo, ao nível da morfologia e composição dos depósitos amilóides de pacientes suecos e portugueses, e também na idade média do início da sintomatologia, que se dá de forma tardia nos pacientes suecos (Koike *et al*, 2009). Para além disto, os indivíduos que expressam a mesma variante de TTR não apresentam sintomas com a mesma idade e podem inclusivamente permanecer assintomáticos toda a sua vida (Coelho *et al*, 1994). Existem também diferenças na idade de início da sintomatologia em gémeos idênticos (Munar-Ques *et al*, 1999; Saporta *et al*, 2009; da Costa *et al*, 2011). Para além disto, detectou-se uma penetrância mais elevada da doença no caso de transferência materna do alelo mutado em regiões endémicas portuguesas (Bonaiti *et al*, 2010). Por fim, ao contrário do espectável, indivíduos homozigóticos para o gene mutado da TTR não desenvolvem uma forma mais agressiva da doença (Olsson *et al*, 2010).

## 4.2 Outros factores genéticos

Alguns autores explicaram as diferenças fenotípicas observadas com base noutros factores genéticos para além da mutação na região codificante da TTR. Olsson *et al* encontraram um polimorfismo na região 3'-UTR (região 3' do mRNA que não é traduzida) do gene da TTR V30M em pacientes suecos que pode ser um local de ligação de um miRNA. Esta ligação pode regular a expressão do gene da TTR mutada nestes pacientes, justificando as diferenças observadas (Olsson *et al*, 2010). Por outro lado, Bonaiti *et al* justificaram a penetrância superior da doença no caso de transmissão materna com polimorfismos existentes no DNA mitocondrial (Bonaiti *et al*, 2010). No entanto, estes relatos são incapazes de justificar todas as diferenças observadas entre pacientes desta doença, especialmente as observadas entre gémeos idênticos, sugerindo um papel importante de factores não genéticos no desenvolvimento desta doença (Munar-Ques *et al*, 1999; da Costa *et al*, 2011).

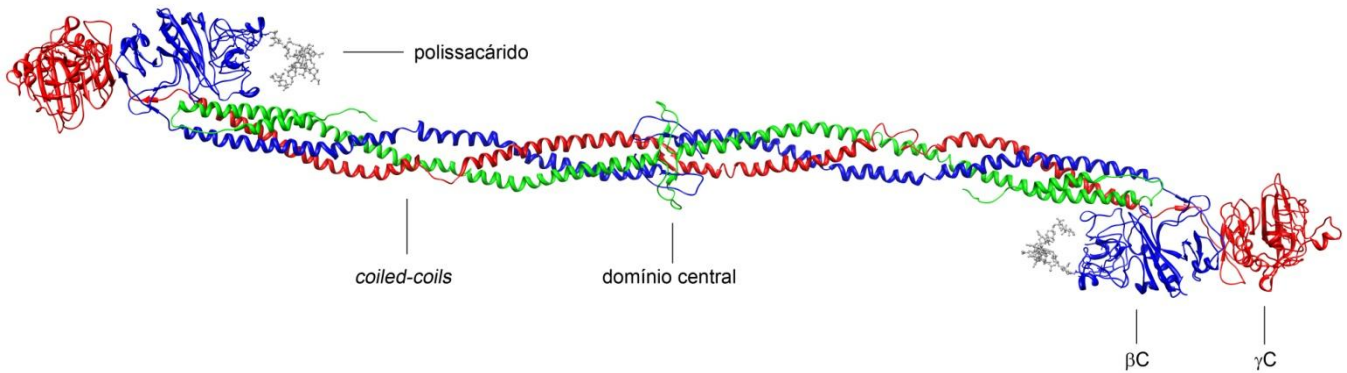
### 4.3 Factores não genéticos

Os factores não genéticos envolvidos nesta doença podem não afectar a TTR de forma directa, podendo ao invés estar envolvidos noutros processos, como na saturação dos mecanismos de defesa celular. Concretamente, existem outras doenças conformacionais nas quais já se verificou o envolvimento dos *chaperones* moleculares, tais como a doença de Parkinson e de Alzheimer (Evans *et al*, 2006; Ali *et al*, 2010). No caso da TTR, sabe-se que a sua ligação à RBP estabiliza a forma tetramérica (Hyung *et al*, 2010). No entanto, o papel desta interacção na dinâmica do tetrâmero na PAF não foi estabelecido. Muito recentemente, o fibrinogénio foi descrito como um forte interactuante da TTR (da Costa *et al*, 2011), podendo estar envolvido nos mecanismos de prevenção da amiloidogénese antes de se verificar o início da sintomatologia. É desta forma que neste estudo abordámos o papel do fibrinogénio na prevenção da agregação da TTR, já que somada às várias funções que têm sido recentemente descobertas, o fibrinogénio aparenta ter uma função de chaperone molecular (Tang *et al*, 2009a; Tang *et al*, 2009b).

## 5 O Fibrinogénio como interactuante da TTR

### 5.1 O Fibrinogénio: estrutura e função

O fibrinogénio é uma glicoproteína de múltiplos domínios, tendo uma massa de aproximadamente 340kDa. Em termos de estrutura quaternária, o fibrinogénio é um dímero de heterotrímeros constituídos pelas cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (Kollman *et al*, 2009). Estas cadeias têm 610, 461 e 411 aminoácidos, respectivamente (Watt *et al*, 1979; Kant *et al*, 1983; Herrick *et al*, 1999), possuem extensas regiões em hélice  $\alpha$  enroladas entre si (*coiled-coils*) e, na região C-terminal, domínios globulares denominados  $\beta$ C e  $\gamma$ C e o domínio relativamente desestruturado  $\alpha$ C (Figura 6) (Kollman *et al*, 2009; Falvo *et al*, 2010). A aquisição da estrutura quaternária inicia-se com a dimerização  $\alpha$ - $\gamma$  ou  $\beta$ - $\gamma$  ao qual se liga a terceira cadeia. Posteriormente os trímeros  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$  dimerizam, formando o hexâmero. As 29 pontes persulfureto intra- e inter-cadeia permitem uma estabilização acrescida deste complexo (Asselta *et al*, 2006).



**Figura 6** – Estrutura do Fibrinogénio humano. Cadeia  $\alpha$ , verde; Cadeia  $\beta$ , azul; Cadeia  $\gamma$ , vermelho; Polissacárido, cinzento. Código do PDB: 3GHG. Segundo os autores, a flexibilidade dos domínios  $\alpha$ C impediu a sua identificação nos mapas de densidade electrónica (Kollman *et al*, 2009).

O fibrinogénio é uma proteína de fase aguda maioritariamente produzida no fígado e tem como principal função ser o substrato para a formação do coágulo após dano nos vasos sanguíneos (Drury *et al*, 1929; Tennent *et al*, 2007). A sua concentração no sangue ronda os 2 a 4 g/L em condições normais (Dudek *et al*, 2010). Após uma lesão, ocorrem uma série de reacções na superfície das células afectadas que levam à activação do protease trombina. Este hidrolisa as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  do Fibrinogénio junto ao domínio central, libertando-se os fibrinopéptidos A e B, respectivamente. Como consequência, forma-se uma rede denominada fibrina e cujas propriedades permitem evitar a ruptura do coágulo sanguíneo então formado (Falvo *et al*, 2010). Em resposta à ocorrência de lesões vasculares, o fibrinogénio também interage com a integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 existente nas plaquetas, levando à sua aglomeração (Phillips *et al*, 1988). Após a recuperação da lesão, o protease plasmina hidrolisa as três cadeias de fibrinogénio em múltiplos locais permitindo a desintegração da fibrina (Falvo *et al*, 2010). O fibrinogénio participa ainda em interacções célula-matriz extracelular ao interagir com o glicosaminoglicano heparina, a proteína da matriz extracelular fibronectina e com moléculas de adesão celular. Tais interacções ajudam em processos como a angiogénese (crescimento de novos vasos sanguíneos), proliferação celular e cicatrização das feridas (Asselta *et al*, 2006).

Mais recentemente têm sido descritas outras funções do fibrinogénio, nomeadamente no sistema nervoso em processos como a neuroinflamação, neurodegeneração e também remielinização/regeneração. Quanto ao primeiro, detectou-se que a ligação do fibrinogénio à integrina CD11b/CD18 activa as células imunitárias do sistema nervoso central, denominadas microglia. Como consequência, são activadas as vias do factor nuclear kappa B (Nf-kB) e *mitogen-activated protein kinase/phosphoinositide 3-kinases* (MAPK/PI3K), promovendo processos como a adesão celular, migração, quimiotaxia e fagocitose. Foi então sugerido que a

activação destas células pelo fibrinogénio pode ser um mecanismo geral de indução da inflamação no sistema nervoso após a ocorrência de lesões vasculares (Akassoglou *et al*, 2002a).

Foi também descrito que o fibrinogénio pode interagir directamente com integrinas dos neurónios, nomeadamente com a integrina  $\beta 3$  (Ryu *et al*, 2009). Através desta interacção o fibrinogénio pode inibir o crescimento de neurites (conjunto dos axónios e dendrites), modulando respostas neuronais locais na presença de lesões ou hemorragia no sistema nervoso central (SNC). A deposição de fibrina está correlacionada com dano neuronal durante um enfarte. Este fenómeno pode desencadear processos neuroinflamatórios ao nível da microglia e também neurodegenerativos para controlo das funções neuronais (Ryu *et al*, 2009).

Após dano nos nervos periféricos, o fibrinogénio activa a via do cinase ERK 1/2 em células de Schwann (células da glia no SNP), promovendo a sua proliferação enquanto inibe a função de mielinização. Este processo permite a regeneração do nervo afectado, sendo a deposição de mielina reposta após degradação da fibrina (Akassoglou *et al*, 2002b).

## 5.2 Fibrinogénio como chaperone extracelular

Recentemente foi descrito que o fibrinogénio interage com uma série de proteínas sob stress, prevenindo a sua agregação (Tang *et al*, 2009a). Foi observado que esta proteína inibe a formação de fibras da proteína priónica Sup35, as quais partilham diversas características com as fibras amilóides de proteínas priónicas de mamíferos (Dobson, 1999). Foi ainda sugerido que o fibrinogénio pode interagir com espécies pré-fibrilares, redireccionando o processo de amiloidogénese. Níveis elevados de fibrinogénio são ainda encontrados na doença de Alzheimer e demência vascular (van Oijen *et al*, 2005).

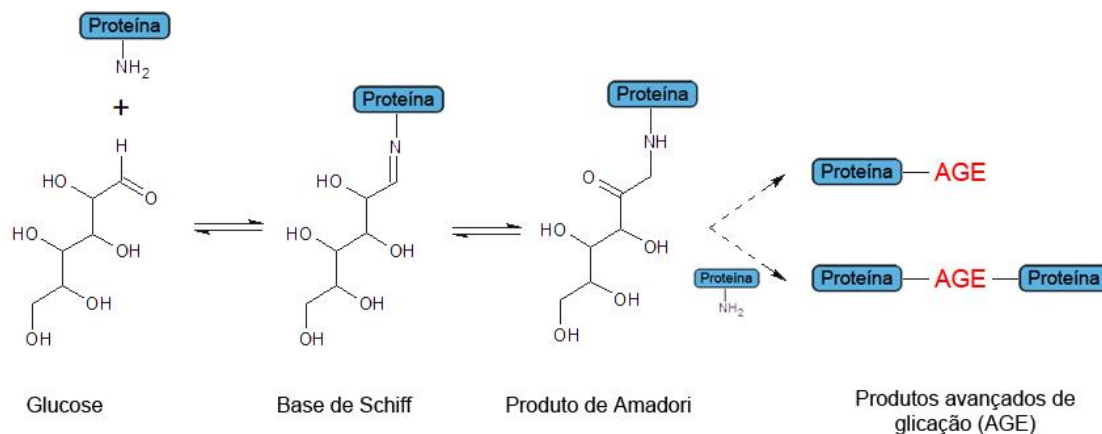
Como referido anteriormente, o fibrinogénio é um interactuante da TTR, podendo prevenir o processo de agregação dada a sua função de *chaperone molecular*. Como tal, é possível que esta proteína seja um factor não genético preponderante no desenvolvimento da PAF (da Costa *et al*, 2011). Deve-se assim explorar se o fibrinogénio tem realmente capacidade de prevenir a agregação da TTR e explorar o porquê de se dar a saturação deste mecanismo de defesa em indivíduos portadores da doença. Neste âmbito, foi proposto recentemente pelo nosso grupo que o fibrinogénio se encontra modificado de forma específica nesta doença (da Costa *et al*, 2011). Desta forma, neste trabalho focámo-nos no estudo desta modificação, a

glicação, e nas suas consequências ao nível da função do fibrinogénio como supressor da agregação da TTR.

## 6 Glicação

### 6.1 Conceitos gerais

A glicação, ou glicosilação não enzimática, é uma modificação pós-traducional onde glúcidos redutores e compostos dicarbonilo reagem com os grupos amina das cadeias laterais dos resíduos de lisina e arginina (Priego Capote *et al*, 2009; Rabbani *et al*, 2010). No entanto, esta modificação não é exclusiva de proteínas, podendo também ocorrer nos ácidos nucleicos, nomeadamente ao nível das bases azotadas que contêm aminas primárias: guanina, citosina e adenina ou mesmo em lípidos (Niwa, 2006; Thornalley, 2008). A glicação envolve uma série de reacções denominadas colectivamente por reacção de Maillard. Esta reacção inicia-se com um ataque nucleofílico do grupo amina livre a um carbonilo, gerando uma base de Schiff (composto com uma ligação C=N). Dada a relativa instabilidade da base de Schiff, esta é convertida à forma de cetoamina, mais estável, denominada produto de Amadori (Figura 7). Posteriormente, o produto de Amadori pode sofrer uma série de rearranjos e reacções de desidratação e fragmentação, dando origem a produtos irreversíveis denominados produtos avançados de glicação (AGE, do inglês *advanced glycation end-products*) (Priego Capote *et al*, 2009). Os intermediários dos últimos passos da reacção de Maillard (após a formação do produto de Amadori) possuem também eles grupos aldeído ou cetona sujeitos ao ataque por um grupo amina de uma outra proteína. Desta forma, é possível ocorrer um novo ataque nucleofílico por parte de um grupo amina livre de uma outra proteína, com consequente formação de um *cross-link* entre as proteínas envolvidas por intermédio do AGE (Luthra *et al*, 1993; Niwa, 2006).

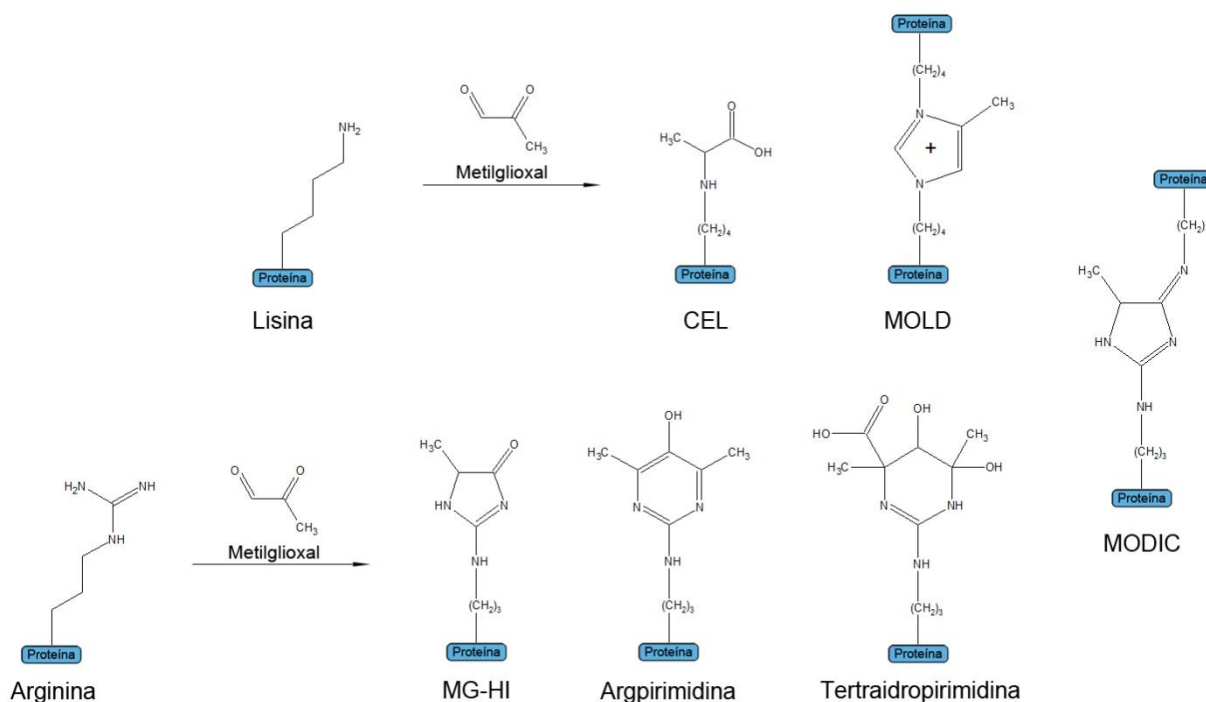


**Figura 7** – Esquema da reacção de Maillard exemplificada para a glicação com glucose. Após as reacções reversíveis de formação da base de Schiff e do produto de Amadori, dá-se uma série de reacções de desidratação e fragmentação que dão origem a produtos avançados de glicação. É possível a ocorrência de um novo ataque nucleofílico por um grupo amina de outra proteína, com consequente *cross-linking* entre as proteínas envolvidas. Adaptado de Luthra *et al*, 1993, Niwa, 2006 e Priego Capote *et al*, 2009.

Existem diversos compostos contendo grupos carbonilo que modificam proteínas pela reacção de Maillard, com especial relevância para  $\alpha$ -dicarbonilos, entre os quais os  $\alpha$ -oxoaldeídos. Estes podem ser formados aquando da desidratação e fragmentação dos produtos de Amadori e reagem mais activamente com grupos amina livres do que a ose original (Priego Capote *et al*, 2009). Alguns exemplos de  $\alpha$ -carbonilos formados por esta via são o glioxal, metilglioxal, glucosonas, desoxiglucosonas e deidroascorbato (Priego Capote *et al*, 2009). Foi também descrita a formação dos  $\alpha$ -oxoaldeídos glioxal, metilglioxal e 3-desoxiglucosona por degradação espontânea da glucose (Thornalley *et al*, 1999). Dos compostos referidos, o metilglioxal foi descrito como o agente de glicação de maior relevância *in vivo* (Shinohara *et al*, 1998; Bourajjaj *et al*, 2003; Thornalley, 2008; Fleming *et al*, 2011). Para além das vias referidas que levam à sua formação, este é também um produto inevitável do metabolismo celular, estando por isso presente em todas as células, tanto em condições saudáveis como patológicas (Thornalley, 2008). De facto, a via mais relevante para a sua formação em células eucarióticas é por *by-pass* à glicólise, através da  $\beta$ -eliminação não enzimática do grupo fosfato dos metabolitos da via glicolítica fosfato de dihidroxiacetona e gliceraldeído-3-fosfato (Richard, 1993; Inoue *et al*, 1995; Fleming *et al*, 2011).

A ocorrência da reacção entre o metilglioxal e os grupos amina livres dos resíduos de arginina é algo heterogénea e aparentemente imprevisível, sendo possível a formação de vários AGE (Figura 8). No entanto, o conjunto de aductos que se formam de forma mais proeminente é

a Nδ-(5-hidro-5-metil-4-imidazolón-2-il)-ornitina e os respectivos isómeros, denominados colectivamente MG-HI. Outro AGE passível de se formar é a N-(5-hidroxi-4,6-dimetilpirimidina-2-il)-L-ornitina, ou argpirimidina, bem como a tetraidropirimidina (Shipanova *et al*, 1997; Ahmed *et al*, 2002). A reacção com resíduos de lisina dá-se de forma menos acentuada, levando frequentemente à formação do aducto Nε-carboxietil-lisina (CEL) e do *cross-link* entre dois resíduos de lisina MOLD (*methylglyoxal lysine dimer*) (Brock *et al*, 2007; Thornalley, 2008). Está também descrito na literatura um AGE onde se dá o *cross-link* entre um resíduo de lisina e um de arginina, o MODIC (Lederer *et al*, 1999).



**Figura 8** – AGE formados após glicação com metilgloxal. Na reacção de Maillard podem participar uma ou mais moléculas de metilgloxal. Apesar de MG-HI se referir a um conjunto de isómeros, apenas o 5-hidro-5-metilimidazonola é apresentado. MOLD: *cross-link* entre dois resíduos de lisina. MODIC: *cross-link* entre um resíduo de lisina e um de arginina. Adaptado de Bourajjaj *et al*, 2003 e Brock *et al*, 2007.

Apesar de não envolver catálise enzimática, a glicação dá-se de forma específica em certas lisinas e argininas na cadeia de uma proteína (Walton *et al*, 1991; Shilton *et al*, 1993; Gomes *et al*, 2008). Factores como a exposição dos resíduos ao solvente e as propriedades ácido-base dos aminoácidos vizinhos parecem estar directamente envolvidos na determinação se a reacção de Maillard ocorre ou não (Baynes *et al*, 1989; Walton *et al*, 1991; Shilton *et al*, 1993). Foi descrito que resíduos de lisina que se encontram significativamente glicosados são

adjacentes a resíduos de aspartato, glutamato, lisina ou histidina devido à catálise de certos passos da reacção de Maillard que esta proximidade proporciona (Walton *et al*, 1991).

A acumulação de aductos de glicação em proteínas está associada à inactivação de enzimas, desnaturação proteica e ao desencadeamento da resposta imunitária (Thornalley, 2008). A glicação de nucleótidos está associada a mutagénese e apoptose e uma glicação excessiva pode provocar a desintegração da bicamada fosfolipídica (Thornalley, 2008). Esta modificação foi associada ao desenvolvimento de várias doenças, tais como a diabetes e as respectivas complicações vasculares (Bourajjaj *et al*, 2003; Rabbani *et al*, 2010), a doença de Alzheimer (Ahmed *et al*, 2005a), esquizofrenia (Arai *et al*, 2010), doença de Parkinson (Kurz *et al*, 2011) e com a própria PAF (Gomes *et al*, 2005). Foi ainda detectada uma formação de AGEs acrescida em tecidos tumorais humanos (van Heijst *et al*, 2005), onde a glicação da *Heat Shock Protein 27* leva a uma actividade anti-apoptótica (van Heijst *et al*, 2006). No caso da diabetes, descobriram-se uma série de proteínas do plasma sanguíneo com níveis elevados de glicação, como as imunoglobulinas, transferrina, fibrinogénio e a fibrina (Jaleel *et al*, 2005). No caso das imunoglobulinas e da transferrina, estes relatos são acompanhados pela verificação que a glicação implica perda da função destas (Dolhofer *et al*, 1985; Fujimoto *et al*, 1995). Quanto ao fibrinogénio e fibrina, os pacientes diabéticos apresentam a rede de fibrina com uma estrutura anormal, mais resistente à proteólise pela plasmina. Já que o controlo glicémico destes pacientes reverteu estas observações, sugeriu-se que a glicação do fibrinogénio e da fibrina seria directamente responsável por estas observações, mas tal não foi comprovado de forma irrefutável (Pieters *et al*, 2008).

Como acima exposto, a glicação e a formação dos  $\alpha$ -oxoaldeídos apresentam elevada citotoxicidade. No entanto, as células possuem mecanismos de defesa contra estes compostos altamente reactivos (Thornalley, 2008). Um destes mecanismos é o sistema dos glioxalases, constituído pelos enzimas glioxalase I e glioxalase II. Este sistema tem um papel preponderante na defesa enzimática contra a glicação já que catalisa a conversão de  $\alpha$ -oxoaldeídos (por exemplo, o metilglioxal) nos  $\alpha$ -hidroácidos correspondentes (Thornalley, 2003). De forma a serem substrato do glioxalase I, é necessária a ocorrência prévia da reacção espontânea entre os  $\alpha$ -oxoaldeídos e o glutatióno, dando origem a um hemitioacetal. No caso do metilglioxal, o hemitioacetal é isomerizado pelo glioxalase I a S-D-lactóilglutatio e posteriormente convertido a D-lactato pelo glioxalase II (Thornalley, 2003; Thornalley, 2008).

## 6.2 Glicação e PAF

Nyhlin *et al* referiram em 2000, pela primeira vez, um possível envolvimento da glicação no desenvolvimento da PAF, ao detectar uma imunoreactividade acrescida a um anticorpo anti-AGE em tecidos contendo depósitos amilóides de pacientes com PAF (Nyhlin *et al*, 2000). Sucedendo-se a esta observação, Sousa *et al* detectaram que as fibras de TTR tinham a capacidade de activar a via pró-inflamatória do NF- $\kappa$ B de forma dependente do receptor de AGEs (abreviado para RAGE) em cultura celular, sugerindo que este poderia ser um mecanismo-chave no desencadeamento da neurodegeneração nesta doença (Sousa *et al*, 2000). De facto, os mesmos autores descreveram posteriormente um aumento da expressão do RAGE nos nervos periféricos de pacientes PAF, referindo também que a activação deste receptor na presença de fibras de TTR promove a síntese de citocinas (responsáveis pela inflamação neuronal) seguido de activação do caspase-3, desencadeando processos apoptóticos (Sousa *et al*, 2001b). Aliado a estas observações, Monteiro *et al* referiu que a incubação dos agregados de TTR com a forma solúvel do RAGE inibe os referidos processos citotóxicos (Monteiro *et al*, 2006).

Em 2005, Gomes *et al* identificaram pela primeira vez a presença de um produto avançado de glicação derivado do metilglioxal em fibras amilóides de indivíduos com PAF, a argpirimidina (Gomes *et al*, 2005). Mais recentemente, da Costa *et al* verificaram um aumento da glicação ao longo do tempo em proteínas do plasma de indivíduos sujeitos a transplante hepático que receberam um fígado PAF. Este aumento da glicação aparenta estar correlacionado com a destabilização dos dímeros de TTR, apesar desta não aparentar ser directamente afectada por esta modificação (da Costa *et al*, 2011). No mesmo estudo, apontou-se o fibrinogénio como uma das proteínas alvo de glicação acrescida no soro de pacientes PAF. Esta modificação aparenta ainda ser responsável pela perda da respectiva função de *chaperone*. Deste modo, estes autores propõem um novo mecanismo para o desenvolvimento da PAF, em que consideram a perda da função de *chaperone* do fibrinogénio derivada da glicação como um factor crucial na destabilização dos tetrâmeros de TTR e consequente amiloidogénese (da Costa *et al*, 2011).

Neste estudo, pretendeu-se investigar os mecanismos não genéticos que levam à evolução da PAF e consequente citotoxicidade, com vista a controlá-los no futuro. Já que a glicação foi dada como responsável pela perda de função, foram determinados os locais de glicação do fibrinogénio, de forma a estabelecer uma relação entre os locais a serem glicados e a perda de função de *chaperone* deste.

# **MATERIAIS E MÉTODOS**



## 1 Obtenção de TTR recombinante

Para obter TTR purificada recorreremos à técnica de DNA recombinante para expressar esta proteína. Esta técnica baseia-se na introdução num organismo (neste caso, a bactéria *E. coli*) de um gene externo a este, introduzido num vector que permite o uso da maquinaria genética do próprio organismo hospedeiro na expressão do gene introduzido. Neste caso o organismo hospedeiro foi a estirpe de *E. coli* BL21, deficiente em proteases e que assim possibilita um maior rendimento de proteína recombinante (Choi *et al*, 1997). O vector utilizado foi um plasmídeo pGEX 4T.2. Este plasmídeo tem a particularidade de possuir, a montante do gene que se pretende expressar, o cDNA que codifica para o enzima glutathione S-transferase (GST) de *Schistosoma Japonicum* (Berthold *et al*, 1992). Esta construção faz com a TTR seja sintetizada ligada covalentemente ao GST (denominado *tag*). A grande vantagem deste procedimento prende-se com a forte ligação do *tag* a esferas contendo glutathione imobilizado, facilitando assim o processo de purificação da TTR: Por incubação das esferas com o extracto proteico de bactéria, apenas o GST fica retido nestas e, com ele, a TTR, sendo possível remover todas as restantes proteínas por lavagem das esferas (Berthold *et al*, 1992). Dado que entre a TTR e o *tag* o vector possui uma sequência de hidrólise pelo protease trombina, é possível adicionalmente obter a proteína-alvo numa forma isolada, desprovida de GST. O pGEX inclui ainda uma região que confere à bactéria resistência ao antibiótico ampicilina, permitindo a selecção das bactérias que contêm o vector. É ainda possível regular a expressão da proteína recombinante, já que está incluído no vector o gene do repressor *tacI* (expresso constitutivamente). Este, ao ligar-se ao promotor *tac* (de Boer *et al*, 1983) também presente a montante do gene do GST, impede a expressão da proteína recombinante até ser fornecido ao meio de cultura o respectivo inibidor IPTG (Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo) (Berthold *et al*, 1992). Resumidamente, o IPTG liga-se ao repressor *tacI*, que então perde afinidade de ligação ao operador *tac* (de Boer *et al*, 1983). Consequentemente, ocorre transcrição e tradução da TTR.

### 1.1 Sobreexpressão de TTR

A clonagem do cDNA da TTR e transformação da estirpe BL21 foi realizada pelo Dr. Gonçalo da Costa previamente à execução deste trabalho. Resumidamente, o cDNA que codifica para a TTR não mutada (*wild-type*, TTR WT), clonado num plasmídeo p426GPD (fornecido pelo Dr. Tiago Outeiro) foi hidrolisado através do uso dos enzimas de restrição *Bam*HI e *Xho*I e purificado através de electroforese em gel de agarose 1% (m/v) em tampão TBE

(Tris/Borato/ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA). O plasmídeo pGEX 4T.2 TTR WT foi obtido através da ligação do cDNA isolado a um plasmídeo pGEX 4T.2 (Amersham biosciences) digerido duplamente com *Bam*HI e *Xho*I. O vector foi primeiramente introduzido na estirpe de *E. coli* DH5 $\alpha$  e preparado utilizando um *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche). Células BL21 competentes foram preparadas por incubação em cloreto de cálcio 50 mM durante 20 minutos em gelo. A introdução do plasmídeo purificado foi realizada incubando células competentes (ressuspensas em cloreto de cálcio 50 mM) com o DNA plasmídico no gelo durante 30 a 40 minutos, seguindo-se choque térmico a 42°C durante 2 a 3 minutos e nova colocação em gelo. As colónias resultantes foram plaqueadas em meio de cultura LB-agar estéril (*Lysogeny broth*, 10 g/L triptona, 10 g/L extracto de levedura, 10 g/L NaCl, 15 g/L agar, pH 7,2) com ampicilina 0,1 mg/mL e incubadas a 37°C durante a noite.

Para sobreexpressar TTR em *E. coli*, procedeu-se a um crescimento de BL21 com o plasmídeo pGEX 4T.2 TTR WT em meio de cultura LB líquido (*Lysogeny broth*, 10 g/L triptona, 10 g/L extracto de levedura, 10 g/L NaCl, pH 7,2) contendo ampicilina 0,1 mg/mL, incubando-se a 37°C durante a noite, com agitação a 250 rotações por minuto. Posteriormente, diluiu-se esta cultura 100x em meio de cultura LB estéril (contendo ampicilina 0,1 mg/mL) e incubou-se numa estufa Edmund Bühler TH 15 (Johanna Otto GmbH) a 37°C, com agitação a 250 rotações por minuto até uma densidade óptica a 600 nm entre 0,3 e 0,6 (que corresponde à fase exponencial de crescimento). A expressão de TTR foi então induzida com a adição do análogo da lactose IPTG ao meio de cultura, numa concentração final de 1mM.

## 1.2 Obtenção do extracto proteico

De forma a proceder à lise das bactérias, após 4h de crescimento centrifugou-se o meio de cultura com as células a 8000 rpm durante 3 min numa centrífuga 5804R (Eppendorf) a 4°C em falcons de 50mL (Sarstedt) e desperdiçou-se o sobrenadante. Posteriormente, ressuspenderam-se as células em PBS (*phosphate buffered saline*, 10 mM fosfato de sódio, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4), 1 mL por cada 100 mL de cultura e procedeu-se à sua lise por sonificação num *ultrasonic processor* UP200S (Hielscher). Este passo foi repetido 15 vezes, 20 ciclos de 0,5 s cada com uma amplitude de onda de 80%. Entre cada repetição, colocou-se o falcon em gelo durante 30 s para evitar a proteólise da TTR.

Para remover detritos celulares, centrifugou-se o lisado celular a 14000 rpm durante 10 min à temperatura a 4°C. O sobrenadante (extracto proteico) é então colectado e guardado a -20°C.

### **1.3 Purificação da TTR com *tag* GST**

De forma a purificar a TTR, 30 µL de esferas com glutationo imobilizado (GE Healthcare) foram lavadas com 1 mL de PBS e decantadas, desperdiçando-se o sobrenadante. Seguidamente, incubou-se 1mL de extracto proteico diluído em PBS (300 µL de extracto para 700 µL de PBS) com 30µL de esferas com glutationo imobilizado (GE Healthcare) durante 3h a 4°C num agitador orbital mini gyro-rocker SSM3 (Stuart). Após decantação e remoção do sobrenadante, removeram-se proteínas contaminantes através de três lavagens das esferas com 1 mL de PBS contendo 0,1% do detergente Tween-20 (PBS-T), tendo-se eliminado o sobrenadante.

### **1.4 Hidrólise do *tag* GST**

Para obtenção da TTR isolada, removeu-se o PBS-T após decantação das esferas e adicionou-se 100 µL de PBS, mais a quantidade de trombina 1U/µL (Merck) adequada, sendo que se fez variar a actividade final entre 1 U/mL e 150 U/mL. As condições estabelecidas como sendo mais favoráveis (hidrólise completa com menor gasto de trombina) correspondiam uma actividade de 15 U/mL de trombina, com incubação a 37°C durante 3h, com agitação orbital. Após incubação, centrifugaram-se as esferas a 5000 rpm durante 2 minutos numa centrífuga *miniSpin* (eppendorf), sendo que o sobrenadante foi aproveitado e guardado a -20°C.

### **1.5 Quantificação proteica**

De forma a determinar a concentração proteica total do extracto proteico purificado, recorreu-se ao método de Bradford. Este método baseia-se na ligação do corante azul de coomassie G-250 às proteínas, principalmente a resíduos de lisina e arginina (Kruger, 1994), alterando o seu máximo de absorção para 595 nm (Bradford, 1976). O elevado coeficiente de

absorção molar garante a elevada sensibilidade da técnica, que é também bastante robusta perante contaminantes (Bradford, 1976; Kruger, 1994).

A quantificação de proteína total foi realizada em triplicado utilizando um leitor de microplacas Sunrise (Tecan). Para tal, colocou-se em cada poço da microplaca de 96 poços pureGrade™ BRANDplates® (BRAND) 10 µL de solução proteica diluída 2 vezes e 200 µL de reagente de Bradford (Bio-Rad) diluído 5 vezes em água bidestilada. O leitor de microplacas foi configurado para ler a 595 nm, com agitação prévia de 30 segundos. Para o cálculo da concentração proteica, realizou-se uma curva de calibração com padrões de albumina do soro bovino (BSA) 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mg/mL. O cálculo da concentração de TTR foi realizado por aplicação da fórmula  $C = (Abs - b) / m$ , em que “C” se refere à concentração da proteína, “Abs” à absorvência a 595 nm, “b” à ordenada na origem e “m” ao declive da recta de calibração

## 2 Glicação *in vitro* do fibrinogénio

De forma a glicar o fibrinogénio *in vitro*, utilizou-se o agente glicante de maior relevância biológica, o metilglioxal. Este foi preparado no laboratório previamente à realização deste trabalho pelo Dr. Carlos Cordeiro, tal como descrito na literatura (Gomes *et al*, 2008). Fibrinogénio humano 1 mg/mL (Calbiochem) em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,4 foi incubado com 0,2; 0,5; 2,5 e 10 mM de metilglioxal durante 1 a 4 dias a 37°C com agitação a 800 rpm num *Thermo-shaker PHMT* (Grant-bio). De forma a evitar o crescimento de microorganismos, colocou-se azida de sódio (Merck) a 0,002%.

## 3 SDS-PAGE

### 3.1 Fundamentos da técnica

A separação, detecção e determinação da massa molecular de proteínas pode ser realizada recorrendo à técnica de electrophorese em gel de poliacrilamida (*polyacrylamide gel electrophoresis*, PAGE). Esta técnica baseia-se na aplicação de um campo eléctrico onde as proteínas migram em direcção ao pólo de carga oposta à sua própria carga. Já que estão inseridas numa rede de acrilamida, existe um efeito de crivo molecular que separa as proteínas de acordo com a sua massa molecular. No entanto, a velocidade de migração em torno de cada

pólo depende também da carga da proteína, mas este efeito é grandemente abolido com o uso do detergente aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS), denominando-se a técnica SDS-PAGE (do inglês *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*). O uso de SDS permite assim que a separação das proteínas se dê unicamente em função da sua massa molecular, já que se liga fortemente a estas, conferindo-lhes uma forte carga negativa ao mesmo tempo que as desnatura (Shapiro *et al*, 1969). Através do uso de padrões de massa molecular conhecida, pode-se assim estimar a massa molecular de uma proteína, já que existe uma relação linear entre o logaritmo da massa molecular e a mobilidade electroforética (Price *et al*, 2000).

Nesta técnica, são utilizados dois tipos de gel, denominados de resolução e de concentração. O gel de resolução é o que confere as características separativas ao gel e o de concentração promove a focagem das proteínas na fronteira entre ambos os tipos de gel dada a diferença de pH e força iónica, aumentando a resolução da técnica.

### **3.2 Preparação dos géis**

Neste trabalho, todos os géis foram preparados no formato minigel (8,3 x 7,3 cm), no sistema Mini-PROTEAN® 3 Cell (Bio-Rad), com uma espessura de 1 ou 1,5mm, conforme indicado.

A percentagem de acrilamida e do respectivo crosslinker bisacrilamida determinam o intervalo de massas onde se consegue uma boa separação das proteínas. Desta forma, quanto maior a percentagem de acrilamida, maior o crivo molecular exercido sobre as proteínas (Lovric, 2011). Para separação das cadeias de fibrinogénio e BSA, utilizou-se uma percentagem de acrilamida/bisacrilamida (Bio-Rad) de 10%. No caso da TTR, os géis apresentados contêm 15% de acrilamida/bisacrilamida. O modo de preparação dos géis de SDS-PAGE encontra-se apresentado na Tabela 1.

Após adição dos reagentes de polimerização APS (persulfato de amónio, Bio-Rad) e TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletenodiamina, Sigma), a solução é colocada entre os vidros destinados para o efeito, sendo esta solução imediatamente coberta com água para evitar protuberâncias na superfície deste gel. Finalizada a polimerização do gel de resolução, este é coberto pela solução do gel de concentração. Este gel polimeriza com um “pente” que cria poços adequados à posterior colocação da amostra, como indicado na Figura 9 (Lovric, 2011).

**Tabela 1** – Protocolo para a realização dos géis de SDS-PAGE. As quantidades apresentadas destinam-se à preparação de 2 géis. APS: persulfato de amónio; TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina.

Volume	Gel de concentração (4%)	Gel de resolução (10%)	Gel de resolução (15%)
Água bidestilada	3,12 mL	4,85 mL	3,6 mL
Tampão Tris-HCl 1,5M pH 8,8	-	2,5 mL	2,5 mL
Tampão Tris-HCl 0,5M pH 6,8	1260 µL	-	-
Acrilamida/bisacrilamida 37,5:1, 40%	500 µL	2,5 mL	3,75 mL
SDS 10%	50 µL	100 µL	100 µL
APS 10%	25 µL	50 µL	50 µL
TEMED	5 µL	5 µL	5 µL

### 3.3 Preparação da amostra

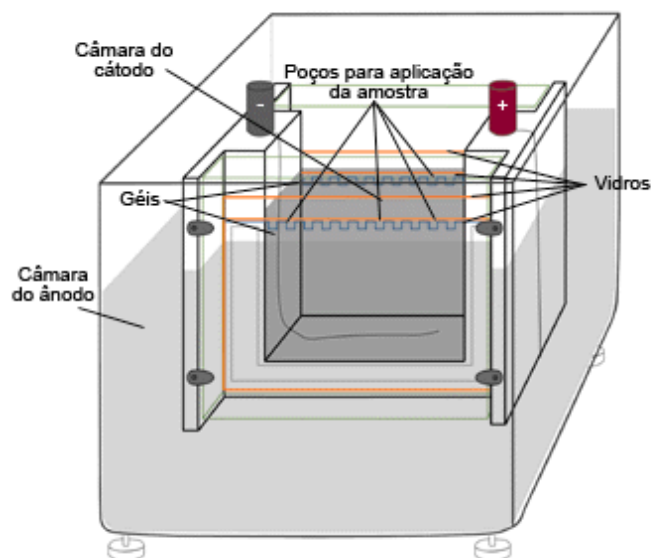
Previamente à aplicação no gel adiciona-se à amostra tampão de aplicação de Laemmli (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 20% glicerol, 2% SDS, 5% β-mercaptoetanol, 0,01% azul de bromofenol) (Laemmli, 1970). No caso das amostras de fibrinogénio, para *western blot* adicionaram-se 5 µL de tampão de aplicação a 2 µL de fibrinogénio 1 mg/mL e para PMF (do inglês *peptide mass fingerprinting*) e mapeamento dos locais de glicação 10 µL de tampão de aplicação a 8 µL de fibrinogénio 1mg/mL (por poço). No caso da TTR, a 10 µL de purificado adicionou-se 10 µL de tampão de aplicação. Previamente à aplicação no gel, as amostras são aquecidas a 95°C durante 2 min num *Analog Dry Block Heater* (VWR).

Dadas as características do tampão de aplicação, as pontes persulfureto presentes na amostra sofrem redução. Todas estas condições desnaturantes visam evitar interferência da estrutura tridimensional das proteínas na migração. No mesmo tampão, é ainda utilizado glicerol, que promove a deposição da amostra no fundo do poço aquando da sua aplicação e azul de bromofenol, que permite o acompanhamento da corrida.

### 3.4 Corrida electroforética

Após montagem dos géis de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante, colocou-se tampão de corrida (25 mM Tris base, 192 mM glicina, 0,1% SDS, pH 9,3) na tina de electroforese (Figura 9). Posteriormente, aplicaram-se as amostras em cada poço do gel e

adicionou-se 5  $\mu\text{L}$  de marcadores de massa molecular *Precision Plus Protein™ All Blue Standards* (Bio-Rad) a um poço livre. Os eléctrodos foram então ligados à fonte de alimentação *PowerPac Basic Power Supply™* (Bio-Rad), programada para correr a uma diferença de potencial fixa de 100 V.



**Figura 9** – Sistema de electroforese em gel de poliacrilamida vertical. A separação física entre as câmaras do ânodo e do cátodo (a única ligação entre as câmaras é o próprio gel) permite um controlo preciso e reprodutível do gradiente de voltagem no gel. Adaptado de [http://www.nationaldiagnostics.com/article\\_info.php/articles\\_id/13](http://www.nationaldiagnostics.com/article_info.php/articles_id/13) (26/09/2011).

Quando todo o azul de bromofenol migra para fora do gel, este é retirado e deixado a corar durante a noite numa solução de azul de coomassie R-250 da Bio-Rad (2 g/L, 10% ácido acético, 40% metanol em solução aquosa). Posteriormente, o excesso de coomassie é removido com solução descorante (10% ácido acético, 40% metanol em solução aquosa) e conservado em água bidestilada. Os géis foram digitalizados utilizando um *scanner* HP scanjet 2400 e a imagem resultante guardada em formato *.tiff* com uma resolução de 600 pontos por polegada.

### 3.5 Quantificação proteica relativa em géis de SDS-PAGE

De forma a realizar uma quantificação relativa das várias espécies proteicas num gel de SDS-PAGE, utilizou-se o programa Phoretix 1D® (TotalLab, [www.totallab.com](http://www.totallab.com)). O programa realiza uma análise densitométrica do gel, após obtenção de uma imagem do mesmo, determinando o volume de cada banda observada para cada faixa do gel com base na cor dos

pixéis detectados para cada banda. O volume da banda é tido como proporcional à quantidade de proteína (Vincent *et al*, 1997) e pode-se fazer uma quantificação relativa comparando os volumes das várias bandas numa mesma corrida. A percentagem de uma proteína em solução

pode ser determinada através da fórmula  $Quantidade (\%) = \frac{Volume\ da\ banda}{Volume\ total} \times 100$

## 4 Western blotting

### 4.1 Fundamentos da técnica

A técnica de *Western blotting* permite a identificação de uma proteína no seio de uma mistura de proteínas através da reacção com um anticorpo específico que funciona como sonda, sendo também uma abordagem semi-quantitativa. Este anticorpo contém um grupo ligado covalentemente que permite a sua detecção, usualmente um enzima repórter. No entanto, é mais comum utilizar-se um segundo anticorpo (denominado anticorpo secundário) que reconhece o anticorpo que está ligado ao antigénio (anticorpo primário). É o anticorpo secundário que contém o grupo que permite a sua detecção, sendo que este pode ser utilizado perante uma grande variedade de anticorpos primários (Hayes *et al*, 1989). A visualização da posição desta “sonda” é realizada por quimoluminescência, em que o enzima ligado ao anticorpo secundário (normalmente o peroxidase de rábano) catalisa a reacção do luminol com peróxido de hidrogénio, com consequente libertação de luz (Kricka, 1991). A emissão de luz é utilizada para excitar uma chapa fotográfica, permitindo a sua detecção.

### 4.2 Transferência e detecção do antigénio

A técnica de *Western blotting* iniciou-se com a realização da técnica de SDS-PAGE em géis 10% (sem coloração), colocando-se 2 µg de fibrinogénio glicado por poço. As proteínas foram transferidas para uma membrana de Difluoreto de Polivinilidina (PVDF Immobilon-P IPVH00010, Millipore) num sistema Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad), após se ter montado a respectiva cassette com a membrana directamente sobre o gel e posicionada do lado do eléctrodo negativo, com tiras de papel absorvente no lado exterior. A cassette foi então posicionada num suporte próprio e colocada numa tina electroforética, mergulhada em tampão de transferência (39 mM glicina, 48 mM Tris, 0.0375% SDS (m/v), 20% metanol (v/v)). Aplicou-se

uma diferença de potencial de 100 V durante 65 minutos. Para evitar aquecimento do tampão, o sistema foi montado com gelo no lado exterior da tina.

Após a transferência, a membrana foi colocada numa caixa de petri e preveniu-se a ligação de mais proteínas à membrana (entre os quais os anticorpos a utilizar) bloqueando-a numa solução 5% de leite magro em tampão TBS (*Tris Buffered Saline*, 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5) durante 1h num agitador orbital mini gyro-rocker SSM3 (Stuart). A solução de bloqueio foi então substituída pela solução de anticorpo primário anti-argpirimidina (JalCA, feito em ratinho), diluído 20 000 vezes em 10 mL de leite magro 1% em TBS-T (TBS com 0,1% Tween-20), seguindo-se incubação overnight a 4°C com agitação.

Para a incubação com o anticorpo secundário (acoplado ao enzima peroxidase de rábano), lavou-se a membrana três vezes com tampão TBS (*Tris Buffered Saline*) durante 15 min e com agitação. Posteriormente, incubou-se a membrana com solução de anticorpo secundário anti-IgG de ratinho (Roche) diluído 4000 vezes em 10 mL de leite magro 1% em TBS-T durante 3 horas à temperatura ambiente com agitação. Seguidamente, lavou-se novamente a membrana com TBS em 4 períodos de 10 minutos.

De forma a detectar a posição do antigénio, utilizou-se o kit de quimioluminescência *BM Chemiluminescence Western Blotting Kit* (Roche), cobrindo-se a membrana com solução de quimioluminescência. Sobre esta, colocou-se uma mica e uma chapa fotográfica (Kodak) durante 10 segundos. A chapa foi então colocada na solução de revelação (GBX, Kodak) até serem visíveis as regiões excitadas da chapa, seguindo-se a solução de fixação (GBX, Kodak) e lavagem em água.

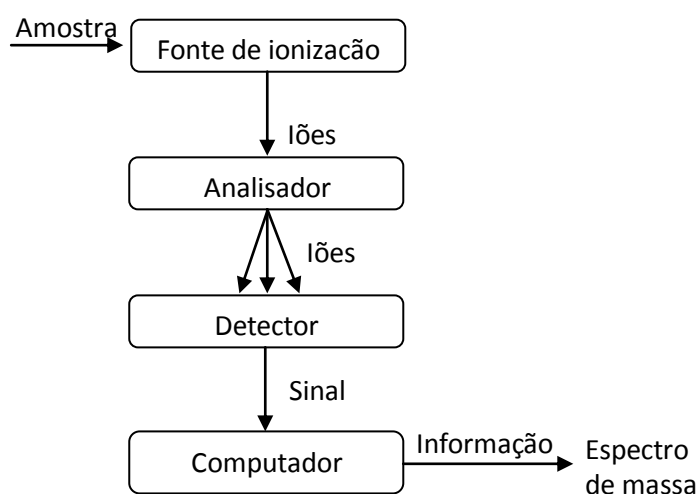
## **5 Espectrometria de massa**

### **5.1 Fundamentos da técnica**

A espectrometria de massa é uma técnica que permite determinar a massa molecular de diversos compostos, desde pequenas moléculas a péptidos (Tanaka, 2003), proteínas intactas (Fenn, 2003) ou mesmo grandes complexos proteicos não covalentes (Heck, 2008; Kukrer *et al*, 2010). Qualquer espectrómetro de massa requer que os compostos se encontrem na fase gasosa e se apresentem carregados, já que a separação dos iões no analisador de massa passa pelo desvio destes através da aplicação de campos eléctricos e magnéticos. Partículas neutras

---

não são detectadas já que não sofrem desvios aquando da incidência destes campos. O desvio sofrido pelos iões em fase gasosa depende da sua massa, mas também da sua carga, pelo que as medições em espectrometria de massa se traduzem em razões massa/carga ( $m/z$ ) e não na massa nominal do composto em função da abundância do ião, representado na forma de um espectro. A operação em alto vácuo assegura que não ocorram colisões com átomos ao longo do percurso óptico, de forma não existirem outros factores que possam desviar as partículas a serem analisadas (Hoffmann *et al*, 2007). Um esquema simplificado da arquitectura de um espectrómetro de massa é apresentado na Figura 10.



**Figura 10** – Diagrama representativo da arquitectura de um espectrómetro de massa. Adaptado de Hoffmann *et al*, 2007.

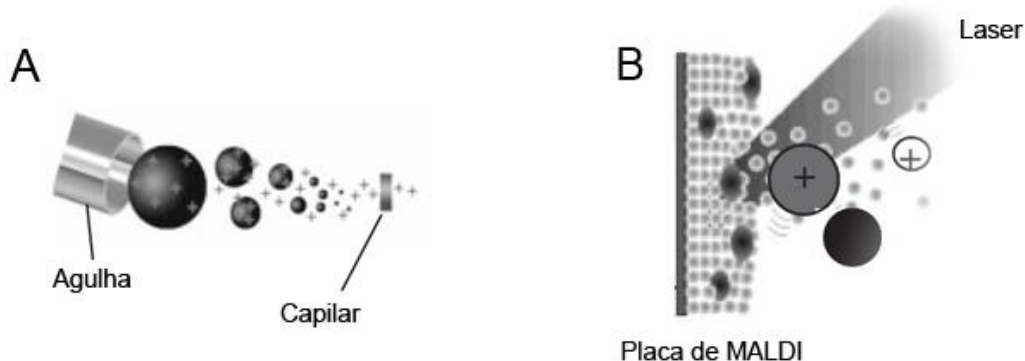
### 5.1.1 Métodos de ionização

A fonte de ionização de um espectrómetro de massa é o componente que permite a formação de iões positivos ou negativos a partir de moléculas de um dado composto. Permite também a passagem de compostos não voláteis à fase gasosa, podendo ainda ser aplicada para análise de compostos em solução, como é o caso de péptidos e proteínas (Hoffmann *et al*, 2007). Existe uma grande variedade de métodos de ionização, mas em proteómica são utilizados maioritariamente dois métodos, o *Electrospray* (ESI) e *Matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI) (Canas *et al*, 2006). Estes métodos, chamados de ionização suave, permitem a passagem de grandes moléculas em solução à fase gasosa (promovendo a sua dessolvatação) sem se dar a respectiva fragmentação, permitindo a análise na sua forma intacta.

O processo de ionização dá-se por protonação ou desprotonação, também já na fase gasosa.

### 5.1.1.1 *Electrospray*

Este método baseia-se na aplicação de um forte campo eléctrico (diferença de potencial na ordem dos 3 a 6 kV) à amostra líquida que flui no capilar metálico, à pressão atmosférica. Este campo provoca a formação de gotículas da solução altamente carregadas. Posteriormente, ocorre dessolvatação do analito por evaporação do solvente, enquanto que as cargas por unidade de volume aumentam. Dá-se então desabsorção das moléculas carregadas ou, no caso de grandes moléculas (como proteínas), a evaporação do solvente prossegue até completa dessolvatação (Figura 11 A). Com esta técnica de ionização, chegam ao analisador de massa espécies multiplamente carregadas. Este factor tem a vantagem de permitir a análise de moléculas de elevada massa molecular em detectores com um baixo limite de massa nominal. Uma grande vantagem do *electrospray* é poder ser acoplado um HPLC (LC-MS) para análise directa dos compostos à medida que eluem (*on-line*).



**Figura 11** – Representação esquemática dos dois métodos de ionização (A) *electrospray* e (B) MALDI. Adaptado de Canas *et al*, 2006.

### 5.1.1.2 *MALDI*

MALDI reside na incidência de um laser a um composto orgânico sólido, denominado matriz, e que permite tanto a ionização como volatilização da amostra. Nesta técnica, o analito é solubilizado previamente numa solução de matriz, a qual é posteriormente aplicada numa placa metálica onde se dá evaporação do solvente, deixando o analito retido nos cristais de matriz. Faz-se então incidir sobre a amostra um laser a um comprimento de onda para o qual a matriz

apresenta um elevado nível de absorção (usualmente, na região ultravioleta) (Figura 11 B). Apesar do processo não estar bem elucidado, a excitação das moléculas de matriz aparenta induzir a sua sublimação dado ao aquecimento repentino, com consequente co-vaporização do analito. Já no caso da ionização, foi sugerido que ocorre transferência protónica entre moléculas de matriz fotoionizadas e o analito.

Este método apresenta as vantagens de ter uma elevada tolerância a contaminantes, tais como sais, tampões e detergentes neutros. Para além disso, os espectros obtidos são simples dado que os analitos obtêm geralmente apenas uma carga. A preparação da amostra é também relativamente fácil. Como desvantagens, o desgaste de matriz e de amostra pelo laser impede uma completa reprodutibilidade na aquisição de espectros. Existe também a possibilidade de fragmentação do analito (Hoffmann *et al*, 2007).

### 5.1.2 Analisadores de massa

Após produção de iões na fase gasosa, é necessário separá-los de acordo com a sua razão massa/carga. Existem diversos tipos de analisadores de massa, que diferem nos princípios de separação dos iões de diferente  $m/z$ , mas todos utilizam campos eléctricos e magnéticos de forma a influenciar a trajectória e/ou velocidade dos iões (Canas *et al*, 2006). Para evitar colisões que possam desviar a trajectória dos iões, os analisadores estão sempre sujeitos a alto vácuo. A escolha do analisador de massa depende do tipo de aplicação que se pretende, tendo em conta a performance do analisador de massa e o intervalo de valores de  $m/z$  que podem ser analisados.

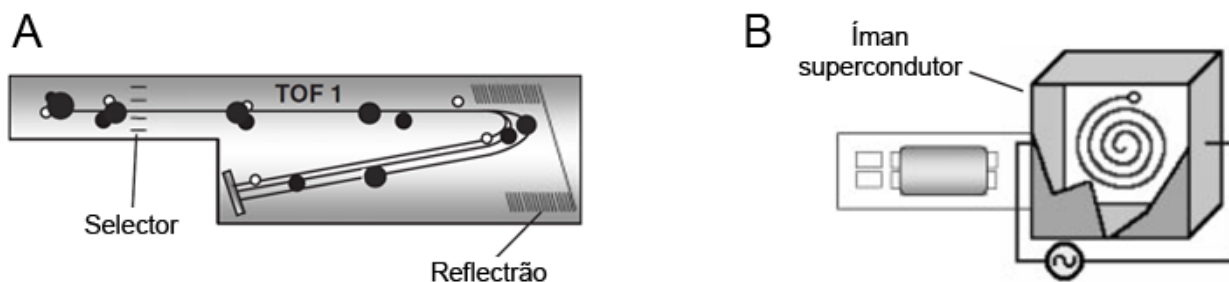
As três principais características para medir a performance de um analisador de massa são a transmissão, a exactidão de massa e a resolução. A transmissão é a razão entre o número de iões que chegam ao detector e o número de iões que entra no analisador, incluindo outras secções do espectrómetro de massa e que fazem parte do percurso óptico junto ao analisador. A exactidão de massa corresponde ao desvio entre o valor de  $m/z$  medido e o teórico, ou seja, é o erro apresentado pelo analisador de massa. Normalmente é medido em partes por milhão (ppm) e apresenta uma forte relação com a estabilidade e resolução do analisador. Depende também da qualidade da calibração realizada, a qual estabelece a relação entre o sinal obtido no detector e o valor de  $m/z$  devolvido. A resolução é a capacidade de um analisador de massa devolver sinais distintos para dois iões com valores de  $m/z$  próximos. Apesar de ser sujeito a grande discussão, dois picos consideram-se resolvidos caso o “vale” entre ambos é igual ou

menor a 10% do pico menos intenso no caso de analisadores *ion cyclotron* resonance ou a 50% no caso de analisadores do tipo *time-of-flight*. Considerando  $\Delta m$  como a diferença de massa mínima para a qual dois picos de massa  $m$  e  $m+\Delta m$  se encontram resolvidos, a definição de resolução é  $m/\Delta m$  (Hoffmann *et al*, 2007). No caso de um pico isolado, pode-se, alternativamente, considerar  $\Delta m$  como a largura desse pico a metade da intensidade máxima (Canas *et al*, 2006). Um poder de resolução superior corresponde à capacidade de distinguir iões com uma diferença de massa inferior (Hoffmann *et al*, 2007).

Neste trabalho, são apresentados resultados obtidos em dois espectrómetros de massa distintos, um com analisador por tempo de voo (*time-of-flight*, TOF) outro com um analisador de ressonância iónica ciclotrónica com transformada de Fourier (*Fourier transform ion cyclotron resonance*, FTICR).

#### 5.1.2.1 *Time-of-flight*

O TOF é considerado o mais simples dos analisadores de massa. Consiste num tubo de voo sujeito a alto vácuo onde os iões são acelerados com energia idêntica, voando a diferentes velocidades de forma inversamente proporcional à sua massa. Deste modo, iões de  $m/z$  superior demoram mais tempo a atingir o detector. Um elemento comprometedor da resolução neste tipo de aparelhos é a dispersão de energia cinética de iões com a mesma  $m/z$ , especialmente quando a fonte de ionização é do tipo MALDI. Para ultrapassar este fenómeno, alguns aparelhos incluem um “espelho electrostático”, denominado reflectrão, que corrige a dispersão de energia cinética dos diversos iões (Figura 12 A) (Canas *et al*, 2006). O limite de massa alargado nos analisadores deste tipo permitem a análise de macromoléculas provenientes de fontes de ionização suave. Uma outra vantagem é a alta eficiência de transmissão, tendo sido já obtidos espectros de proteínas presentes numa quantidade de 100 a 200 attomol ( $10^{-18}$  mol) (Hoffmann *et al*, 2007).



**Figura 12** – Representação esquemática da forma como ocorre separação dos iões nos analisadores de massa (A) TOF e (B) FTICR. Adaptado de Canas *et al*, 2006.

### 5.1.2.2 *Fourier transform ion cyclotron resonance*

O analisador ICR (ressonância iónica ciclométrica) é, até à data, o tipo de analisador que apresenta maior resolução. Neste analisador, ocorre aprisionamento dos iões numa célula composta por quatro eléctrodos, situados sob um campo magnético bastante forte. Nestas condições, os iões seguem um percurso circular, oscilando a uma frequência inversamente proporcional ao respectivo valor de  $m/z$  (denominada frequência ciclométrica). Esta frequência também depende da intensidade do campo magnético incidente. Neste tipo de analisadores, a separação dos iões dá-se por irradiação com uma onda electromagnética de igual frequência à destes, ocorrendo absorção da onda por ressonância (excitação). Isto aumenta a energia cinética dos iões e, com esta, o raio da trajectória. O varrimento bastante rápido (cerca de  $1 \mu\text{s}$ ) de frequências da onda aplicada permite aumentar sucessivamente os raios de trajectória de todos os iões, sem interferir com a respectiva frequência ciclométrica. O detector mede a corrente criada pelo movimento dos iões na célula ao longo do tempo quando estes se aproximam das placas de detecção (Figura 12 B) (Hoffmann *et al*, 2007). A frequência característica de cada ião presente é então identificada com recurso à transformada de Fourier, com consequente obtenção do espectro de massa (Canas *et al*, 2006). Apesar da alta resolução, a própria natureza da célula deste analisador limita os valores de  $m/z$  que este suporta, já que caso o raio da trajectória do ião ultrapassar o tamanho da célula este é expelido.

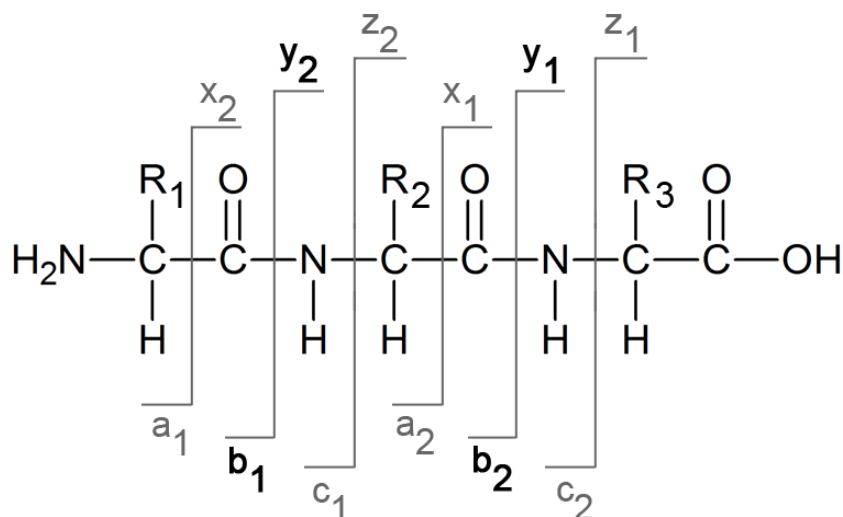
### 5.1.3 *Espectrometria de massa tandem*

A combinação de diferentes analisadores de massa em sequência permite a realização de múltiplas experiências, designando-se por espectrometria de massa *tandem*. Por exemplo, é

possível obter um espectro de massa de um ião que foi isolado no primeiro analisador de massa, obtendo-se um espectro especificamente dos fragmentos deste ião “parental” (*parent ion*).

No caso de analisadores de tempo de voo, é possível acoplar um curto TOF linear (sem reflectrão) como primeiro analisador a um espectrómetro TOF com reflectrão, intercalados por uma célula de colisão. A esta arquitectura dá-se o nome de TOF-TOF. Neste caso, a selecção de um ião para fragmentação é realizada por deflexão no primeiro tubo de voo, exercida por aplicação de um campo eléctrico. Aquando da passagem do ião seleccionado, este potencial é abolido, permitindo a sua permanência no tubo de voo. Quando o ião seleccionado chega à célula de colisão, promove-se a sua fragmentação por colisão com átomos de árgon, num processo denominado *Collision-Induced Dissociation* (CID). Os fragmentos passam então ao segundo analisador de tempo de voo para que a sua  $m/z$  possa ser determinada (Canas *et al*, 2006; Hoffmann *et al*, 2007).

No caso de péptidos, a CID induz a fragmentação dos péptidos em locais muito específicos, usualmente na ligação peptídica. É assim originado um espectro de fragmentos do péptido inicial, com diferentes valores de  $m/z$ , dependentes da região onde se dá a quebra da ligação peptídica, transmitindo assim a massa da sequência de aminoácidos a que corresponde (Canas *et al*, 2006). O espectro pode então ser cruzado com a sequência do péptido, permitindo a sua sequenciação (Papayannopoulos, 1995). Os fragmentos que possuem o terminal amina são identificados pelas letras a, b ou c, enquanto que os fragmentos do terminal carboxilo são identificados pelas letras x, y e z, consoante o local de fragmentação (Figura 13) (Roepstorff *et al*, 1984; Steen *et al*, 2004). No caso de CID de baixa energia (utilizado no seguimento desta tese), a formação de iões a, c, x e y é bastante desfavorecida, em detrimento da formação de iões b e y (Papayannopoulos, 1995).



**Figura 13** – Nomenclatura dos fragmentos peptídicos originados por espectrometria de massa tandem exemplificado para um tripéptido. Em CID de alta energia, é possível obter no espectro todos os tipos de fragmentos representados, mas em baixa energia existe um claro favorecimento da formação de iões das séries b e y. Adaptado de Papayannopoulos, 1995.

## 5.2 Preparação da amostra para *peptide mass fingerprinting*

### 5.2.1 Preparação das cadeias para digestão proteolítica

A identificação dos locais modificados numa proteína foi baseada na técnica de *peptide mass fingerprinting* (PMF), em que o espectro de uma proteína sujeita a proteólise foi comparado com o digerido teórico a partir de uma base de dados genómica. Neste caso, recorreu-se ao espectrómetro FTICR, utilizando a fonte de MALDI. Para realizar esta técnica, é necessário que a proteína seja purificada previamente à digestão proteolítica de forma a simplificar o espectro e maximizar a confiança nos resultados. A separação das cadeias foi realizada num gel de SDS-PAGE 10% com 1,5 mm de espessura. Por poço, foram colocados  $8\mu\text{g}$  de proteína. A identificação das cadeias foi realizada recorrendo aos marcadores de massa molecular.

As bandas pretendidas foram removidas com uma lâmina e guardadas num eppendorf. Para remoção de eventuais proteínas contaminantes, as bandas foram lavadas em água Mili-Q (tipo I, Millipore). De seguida, procedeu-se à remoção do coomassie com uma solução de acetonitrilo (Merck) 50% em água Mili-Q, tendo-se seguido a remoção desta solução e adição de acetonitrilo 100% para desidratar as bandas de gel.

De forma a reduzir as ligações persulfureto dos resíduos de cisteína, reidrataram-se as bandas com uma solução de ditioneitol (DTT, Sigma) 10mM, incubando-se a 56°C por 45 minutos, ao fim dos quais se removeu esta solução e se adicionou iodoacetamida 50mM para alquilar os referidos grupos tiol. Este passo preveniu a reformação de novas ligações persulfureto. Seguidamente, procedeu-se a nova desidratação com acetonitrilo 100%.

### **5.2.2 Digestão proteolítica em gel**

A digestão em gel iniciou-se com a rehidratação a 4°C das bandas em tampão de digestão. Este tampão consiste numa solução de tripsina 6,7 ng/μL (Promega) em tampão hidrogenocarbonato de amónio 50 mM ou numa solução de endoproteínase Glu-C 10 ng/μL (Roche) em tampão fosfato de sódio 25 mM a pH 7,8, dependendo da proteólise que se pretende realizar (estas condições reflectem uma optimização da actividade proteolítica do Glu-C apresentada posteriormente nesta tese).

Após 45 minutos de incubação, o tampão de digestão foi removido e adicionou-se tampão NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50mM até cobrir os pedaços de gel, no caso se utilizar tripsina. Alternativamente, para os digeridos com Glu-C, adicionou-se tampão fosfato de sódio 25mM a pH 7,8. A digestão prosseguiu durante a noite (aproximadamente 16h) a 37°C. O sobrenadante, que contém os péptidos resultantes, foi então recolhido e guardado a -20°C.

### **5.2.3 Purificação e concentração dos digeridos**

Previamente à análise por espectrometria de massa, foi necessário remover os sais presentes nas amostras e concentrar as mesmas. Para tal, utilizaram-se as resinas de fase reversa POROS R2 ou OLIGO R3 (Applied Biosystems). Já que a resina OLIGO R3 possui uma maior área de contacto com o solvente, prevê-se que tenha propriedades apolares mais evidentes do que a resina POROS R2 (Whitney *et al*, 1998). Ambas as resinas foram activadas com acetonitrilo 50% e equilibradas numa solução aquosa de ácido trifluoroacético (TFA, Sigma) 0,1%. Seguiu-se a passagem com a solução que contém os péptidos, ficando estes retidos nas resinas. Para promover melhor a eluição dos contaminantes fez-se passar TFA 0,1% na coluna.

### 5.2.4 Aplicação na placa de MALDI

A eluição dos péptidos retidos nas resinas de fase reversa foi promovida utilizando um solvente orgânico, neste caso o acetonitrilo, em solução aquosa. Esta solução contém 50% acetonitrilo, TFA 0,1% e a matriz ácido  $\alpha$ -Ciano-4-hidroxicinamínico (CHCA, Fluka). A eluição foi realizada directamente para a placa de MALDI (*AnchorChip*, BrukerDaltonics).

Para a identificação dos locais de glicação com combinação de condições, o ensaio foi realizado em duplicado, mas com utilização da matriz ácido 2,5-diidroxibenzóico (DHB, Fluka) em alternativa ao CHCA. A eluição foi realizada de forma sucessiva, tendo sido preparado previamente soluções de eluente com concentrações crescentes de acetonitrilo (20, 50 e 80% para CHCA e 10, 50 e 80% para DHB), com 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  da respectiva matriz.

Para aferição da melhor matriz a utilizar para ionizar péptidos glicosados, foram realizadas eluições com soluções de eluente contendo 20, 50 e 80% de acetonitrilo, 0,1% TFA e as seguintes matrizes, a 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ : ácido sinapínico (SA, Fluka), ácido 2-hidroxi-5-metoxibenzóico (HMB, Fluka), 2,4,6-triidroxi-acetofenona (THAP, Fluka) e ácido 2-(4-hidroxifenilazo)benzóico (HABA, Fluka).

## 5.3 Preparação da amostra para análise de proteína intacta

A identidade das espécies presentes em solução após expressão e purificação de TTR recombinante foi confirmada com recurso a espectrometria de massa sem digestão prévia, ou seja, com as proteína intactas, utilizando para tal uma fonte de *electrospray*.

Para remoção dos contaminantes, colocou-se 500  $\mu\text{L}$  de purificado de TTR num tubo de diálise Midi® (Novagen), tendo-se prosseguido com sucessivas diálises a 4°C e com agitação contra 500mL do tampão volátil e compatível com espectrometria de massa, o acetato de amónio 0,1M. Realizaram-se 4 diálises de 2 horas e uma diálise overnight. A amostra foi então retirada do tubo de diálise e preparou-se uma solução de 59,8% acetonitrilo, 40% de amostra e 0,2% de ácido fórmico para aplicação directa na fonte de *electrospray*.

## 5.4 Aquisição e análise dos espectros

### 5.4.1 Espectrometria de massa

A aquisição dos espectros, tanto dos digeridos como de proteína intacta, foi realizada num FTICR Bruker Apex Ultra (Bruker Daltonics) equipado com um ímã supercondutor de 7 Tesla (Magnex corporation) e uma fonte *electrospray* e MALDI (em simultâneo) Apollo II combi-source (Bruker Daltonics). As massas monoisotópicas foram determinadas com recurso ao algoritmo SNAP 2 incluído no *software* data Analysis, versão 3.4 (Bruker Daltonics).

No caso da aquisição dos espectros dos digeridos, utilizou-se a fonte de MALDI. Todos os espectros foram adquiridos no *software* do fabricante Compass apexControl v3.0.0. Em primeiro lugar, procedeu-se calibração externa utilizando o espectro de um digerido trípico de albumina sérica bovina (BSA), seguindo-se a aquisição dos espectros das amostras. Para identificação de cadeias (PMF), os espectros de digeridos com tripsina foram analisados no *software* Biotoools 3.1 (Bruker Daltonics), com recorrência ao algoritmo MASCOT (Matrix Science, [www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)), contra a base de dados de sequências de proteínas MSDB (de 08/08/2006) e respeitando os seguintes critérios: 1) exactidão de massa superior a 25ppm; 2) máximo de um local de hidrólise falhado (*missed cleavage*) e 3) Carbamidometilação de cisteínas e oxidação de metioninas como modificações fixa e opcional, respectivamente.

A identificação dos péptidos de fibrinogénio e BSA presentes em cada espectro da respectiva cadeia purificada foi realizada recorrendo ao *software* Biotoools 3.1 e Sequence Editor 3.1 (Bruker Daltonics) utilizando as sequências disponíveis na base de dados UniProtKB ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) a 10/12/2010, com os identificadores P02769, P02671-2, P02675 e P02679 para a BSA e as cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  do fibrinogénio, respectivamente. No caso das cadeias glicadas, foi considerado como opcional a presença dos aductos de metilglioxal MG-HI, argpirimidina e CEL (aumento de massa de 54,011, 80,026 ou 72,021 Da, respectivamente). Para o estabelecimento das correspondências, foram utilizados os mesmos critérios de pesquisa que para a técnica de PMF, mas foram considerados valores de massa correspondentes a péptidos com dois locais de hidrólise não hidrolisados (*missed cleavages*). Os valores de cobertura de sequência podem ser obtidos por aplicação da fórmula  $\frac{\text{número de AAs detectados}}{\text{número de AAs totais da proteína}} \times 100$ , em que o número de aminoácidos (AAs) detectados se refere ao número total de aminoácidos (distintos) nas correspondências realizadas entre os espectros de massa e os digeridos teóricos.

No caso dos espectros de proteína intacta, aplicou-se TTR 9,46  $\mu\text{M}$  em acetonitrilo 60% com ácido fórmico 0,2% na fonte *electrospray* do espectrómetro FTICR Bruker Apex Ultra (Bruker Daltonics) através de uma bomba de seringas KDS100 (KD Scientific), regulada para um fluxo de 2  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Os espectros foram adquiridos no *software* do fabricante Compass apexControl v3.0.0 e analisados no *software* Data Analysis 3.1 (Bruker Daltonics). Para simplificação do espectro, aplicou-se um algoritmo de desconvolução incluído no *software*. Este algoritmo determina a carga das moléculas de cada série isotópica, criando um espectro virtual de moléculas com apenas uma carga.

#### 5.4.2 Espectrometria de massa *tandem*

A aquisição de espectros de fragmentação de péptidos de fibrinogénio glicado foi realizada pelo Dr. Ricardo Gomes num espectrómetro MALDI-TOF-TOF 4800 Plus (Applied Biosystems). A massa dos péptidos glicosados determinados no *software* Biotools foi utilizada para a construção de uma lista de inclusão para as experiências de tandem MS. O método de fragmentação utilizado foi *Collision-Induced Dissociation* (CID) com 1kV de energia de colisão. O espectro de massa foi gerado pelo *software* 4000 Series Explorer 3.0 RC1 (Applied Biosystems) e analisado no Data Explorer 4.5 (Applied Biosystems), considerando um erro máximo de 0,2 Da e apenas a formação de fragmentos b e y.

No caso da aplicação da estratégia *top-down* a partir de TTR intacta, os espectros foram adquiridos por *electrospray*-FTICR-MS. As moléculas a fragmentar foram isoladas no quadrupolo, seguindo-se fragmentação por CID com uma energia de colisão de 20 V. A análise dos espectros foi realizada no *software* BioTools. Considerou-se um erro máximo de 25 ppm para cada correspondência.

## 6 Indução da agregação de insulina e TTR

De forma a verificar a função de chaperone do fibrinogénio, procedeu-se à indução da agregação da TTR, mas também de uma proteína modelo, a insulina, funcionando também como controlo positivo dado a já ter sido utilizada como modelo pelo nosso grupo na verificação da função de *chaperone* desta proteína (da Costa *et al*, 2011). A formação de fibras amilóides, tanto para a insulina como para a TTR, pode ser induzida a pH ácido (Colon *et al*, 1992; Dyukov

*et al*, 2008). Deste modo, começou-se por confirmar que ambas as proteínas formavam fibras amilóides nas condições seleccionadas, de forma detectável e em tempo útil.

## 6.1 Efeito do pH na agregação de insulina e TTR

Optou-se por iniciar estes ensaios determinando a cinética de agregação da insulina. Para tal, incubou-se esta proteína (SAFC Biosciences) 0,6 mg/mL (103,3  $\mu$ M) em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,6 salino (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl) numa cuvette de quartzo a 37°C com agitação, tendo sido medida densidade óptica a 600 num espectrofotómetro DU® 7400 a cada hora durante 30 horas. A esterilidade foi assegurada com a adição de 4  $\mu$ L de azida de sódio (Merck). A escolha deste valor de pH prendeu-se com o uso de condições já descritas como indutoras da agregação da TTR (Colon *et al*, 1992; Pasquato *et al*, 2007), possibilitando a manutenção das condições de agregação idênticas para ambas as proteínas. Previamente ao ensaio cinético, a formação de fibras pela insulina foi aferida num ensaio a tempo fixo que vigorou por 3 dias.

Posteriormente, aferiu-se qual a concentração mínima de insulina e TTR para as quais a formação de fibras amilóides se continua a verificar. Estes ensaios foram realizados para um volume final de 150  $\mu$ L, com o intuito de reduzir a quantidade despendida destas proteínas, bem como do fibrinogénio a utilizar nos ensaios subsequentes. A leitura da densidade óptica foi realizada num leitor de microplacas Sunrise (Tecan) em placas de 96 poços pureGrade™ BRANDplates® (BRAND) a 600 nm dadas as características das placas e do próprio espectrofotómetro. Nestes ensaios utilizou-se uma concentração de insulina de 100, 70, 40, 20, 10 e 5  $\mu$ M. No caso da TTR, esta aferição foi realizada com a solução desta proteína purificada a uma concentração de 10, 7,5, 5, 2,5 e 1  $\mu$ M.

## 6.2 Efeito do fibrinogénio na formação de fibras de insulina e TTR

Nos ensaios de verificação da função de *chaperone* do fibrinogénio sobre a insulina e a TTR nas condições utilizadas para a respectiva agregação, iniciou-se pela aferição da melhor razão molar entre as proteínas para a qual a agregação é abolida. No caso da insulina, procedeu-se à co-incubação com fibrinogénio numa proporção molar respectiva de 10:1, 20:1, 40:1, 60:1 e 80:1. As proporções TTR:fibrinogénio utilizadas foram 5:1, 10:1, 20:1, 30:1 e 40:1. Todas as

restantes condições de agregação foram mantidas para cada uma das proteínas amiloidogénicas utilizadas.

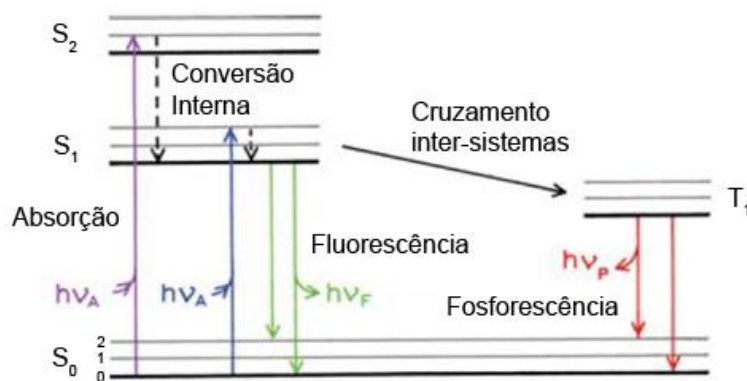
No caso da verificação da eliminação da actividade de chaperone do fibrinogénio após a glicação, procedeu-se a ensaios semelhantes aos acima descritos, mas substituindo o fibrinogénio no estado nativo (não modificado) por fibrinogénio glicado após 4 dias, com 0,2, 0,5, 2,5 e 10 mM. A proporção de proteína amiloidogénica para o fibrinogénio utilizada foi de 20:1, dado que se verificou exercer uma actividade bastante intensiva sobre ambas as proteínas-modelo utilizadas.

## 7 Espectroscopia de fluorescência

### 7.1 Fundamentos da técnica

A fluorescência é a libertação de luz por uma molécula no estado excitado aquando da sua passagem ao estado fundamental. Ao contrário da fosforescência, na fluorescência a passagem dos electrões excitados ao estado fundamental é bastante rápida, dado a não haver impedimento de *spin*, ou seja, o *spin* do electrão excitado é oposto ao do electrão presente no estado fundamental e, quando o anterior passa também ao estado fundamental, ocorre emparelhamento.

A excitação dos electrões é realizada pela incidência de luz na amostra. A absorção de luz leva a que os electrões migrem do estado fundamental (denominado como estado electrónico  $S_0$ ) para um outro estado electrónico mais energético (denominado  $S_1$  ou  $S_2$ ). Aquando da excitação para níveis electrónicos e vibracionais mais elevados, o excesso de energia é dissipado rapidamente, deixando o fluoróforo no nível vibracional menos energético de  $S_1$  (Figura 14). A este processo de relaxação dá-se o nome de conversão interna. Seguidamente, ocorre o retorno ao estado fundamental, com consequente libertação de luz. Já que devido ao fenómeno de conversão interna os electrões adoptam níveis vibracionais mais baixos do que aquando da excitação, a energia libertada é menor do que a energia utilizada para a excitação, pelo que o comprimento de onda da luz emitida é maior do que o comprimento de onda da luz absorvida (desvio de Stokes). Outros factores que contribuem para o desvio de Stokes são a aquisição de um nível vibracional elevado aquando da passagem do fluoróforo ao estado fundamental e fenómenos de relaxação derivados do solvente (Lakowicz, 2006).



**Figura 14** – Diagrama de Jablonski que representa as transferências de energia ocorridas quando da absorção de fótons por um fluoróforo. Adaptado de Lakowicz, 2006.

### 7.1.1 Arquitectura do espectrofluorímetro

Um espectrofluorímetro (ou, simplesmente, fluorímetro) é constituído, de forma simplificada, por uma lâmpada, dois monocromadores e o detector. A lâmpada deve apresentar uma vasta gama de comprimentos de onda de emissão, de 250 a 700 nm. As lâmpadas de xénon são bastante utilizadas. Parte da luz de excitação é desviada para a célula de referência que contém um padrão fluorescente cuja intensidade de emissão é proporcional à intensidade da luz de excitação. Logo, alterações na intensidade da luz provenientes da lâmpada são corrigidas dividindo a intensidade de fluorescência da amostra pela da referência ( $F/F_0$ ). Os monocromadores são o componente que permite seleccionar os comprimentos de onda de excitação e emissão, através da constituição de uma rede de difracção. Dado que a eficiência de transmissão de luz não é idêntica para todos os comprimentos de onda, é usual utilizarem-se algoritmos para corrigir este efeito. O monocromador de emissão está colocado perpendicularmente à direcção do feixe de luz incidente, de forma a evitar que a luz de excitação seja detectada como fluorescência. Tal facto não perturba as medições da luz emitida, já que esta se dá em todas as direcções (Lakowicz, 2006).

A detecção é feita através do uso de tubos fotomultiplicadores, onde se dá amplificação do sinal. Os fótons atingem um fotocátodo neste detector, ocorrendo ejeção de electrões a partir desta superfície. A série de dínodos que se segue amplifica o sinal, já que a colisão de cada electrão liberta 5 a 20 electrões para o dínodo seguinte. Este fenómeno ocorre até um pulso de corrente atingir o ânodo e o sinal é registado (Lakowicz, 2006).

## 7.2 Espectros de excitação e emissão de fibrinogénio glicado

De forma a confirmar o processo de glicação do fibrinogénio pelo metilglioxal, recorreu-se à espectroscopia de fluorescência, tendo em conta que desta reacção se pode formar o aducto fluorescente argpirimidina (Shipanova *et al*, 1997).

Uma solução de fibrinogénio 1 mg/mL não glicado foi diluída 10 vezes em água numa cuvette de quartzo com um percurso óptico de 1 cm. A cuvette foi então colocada num fluorímetro Fluorolog-3 (Horiba Jobin Yvon). Através do *software* Instrument control center v2.2.13, traçou-se o espectro de excitação entre os 300 e os 400 nm, fixando o comprimento de onda de emissão em 410 nm. Por sua vez, traçou-se o espectro de emissão entre os 345 e os 600 nm, fixando-se o comprimento de onda de excitação nos 335 nm. Em paralelo, repetiu-se esta experiência para o fibrinogénio glicado com 2,5 mM de metilglioxal.

## 7.3 Detecção da formação de fibras amilóides com a sonda tioflavina T

Para além das medições de densidade óptica, o processo de agregação da insulina e da TTR foi acompanhado através de medições da intensidade de fluorescência da tioflavina T. Esta sonda apresenta a grande vantagem de detectar especificamente amilóide, que é o foco deste trabalho: na ausência de fibras amilóides, esta sonda fluoresce com máximos de excitação e emissão a 350 e 438 nm, respectivamente, ocorrendo uma transição na presença destas fibras para máximos de 440 e 485, respectivamente (Naiki *et al*, 1989; LeVine, 1999).

Após agregação das referidas proteínas, adicionou-se 20  $\mu$ L da solução a 975  $\mu$ L de tampão glicina-NaOH 50mM a pH 8,5 numa cuvette de capacidade 1 mL e com um percurso óptico de 1 cm. O uso deste tampão prende-se com o facto de que a pH alcalino a intensidade de fluorescência da sonda ser superior (Naiki *et al*, 1989). Após agitação da cuvette, adicionou-se 5  $\mu$ L de Tioflavina T (ThT, Sigma) 0,5  $\mu$ M, agitando e colocando a cuvette rapidamente no fluorímetro Fluorolog-3 (Horiba Jobin Yvon) para evitar a extinção de fluorescência da sonda, já que esta é instável à luz. As medições do sinal de fluorescência foram realizadas através do *software* Instrument control center v2.2.13, seleccionando-se um comprimento de onda de excitação de 440 nm, com leitura de emissão a 485 nm (seleccionou-se uma fenda nos monocromadores de 5 nm). As medições de fluorescência correspondem a uma média de 10 leituras.

# RESULTADOS

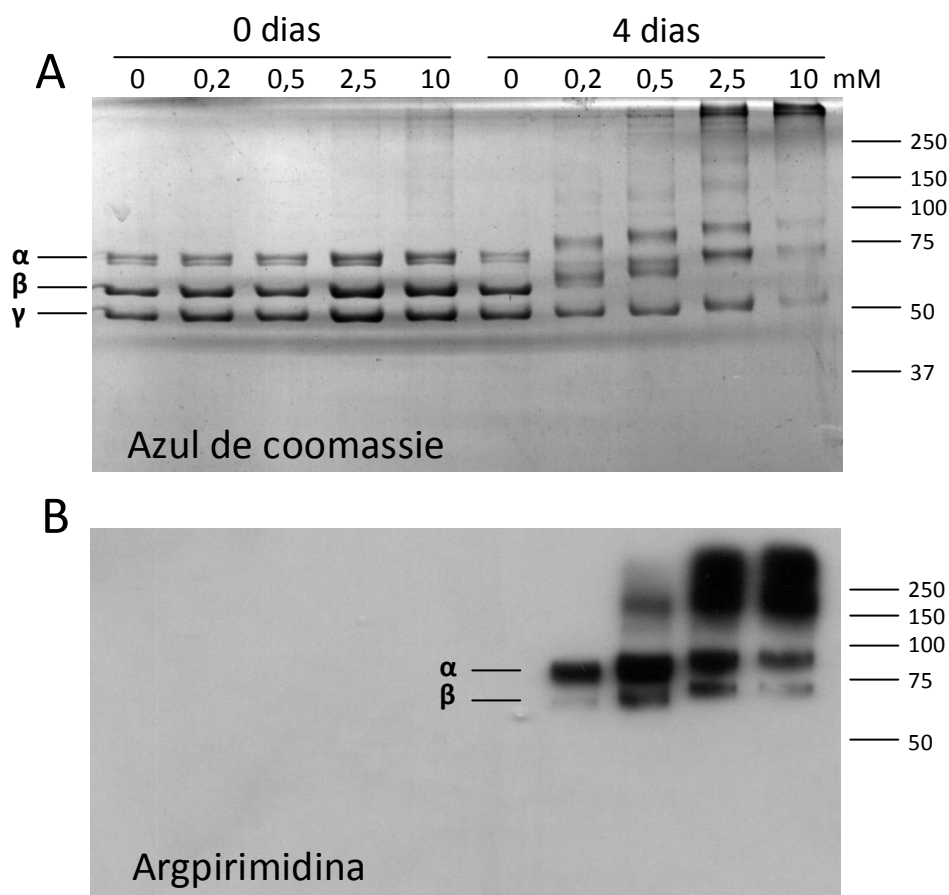


## 1 Locais de glicação do Fibrinogénio

A glicação do fibrinogénio foi associada à sua perda de função como *chaperone* molecular (da Costa *et al*, 2011). No entanto, está ainda por esclarecer o mecanismo pela qual se dá essa perda de função. Neste sentido, o plano de trabalhos foi iniciado com a determinação dos locais preferencialmente modificados nas três cadeias de fibrinogénio, visando um posterior correlacionamento da perda de função de *chaperone* (capítulo 2) com o estado de glicação dos vários locais nas três cadeias desta proteína.

### 1.1 Glicação do Fibrinogénio *in vitro*

Este estudo foi iniciado com a modificação *in vitro* de fibrinogénio com concentrações crescentes de metilgloxal (0,2, 0,5, 2,5 e 10mM) durante 4 dias, a 37°C.



**Figura 15** – Extensão da glicação do fibrinogénio. (A) Gel de poliacrilamida contendo fibrinogénio não glicado (0 dias de incubação) e glicado (4 dias de incubação) corado com azul de coomassie. (B) Western blot correspondente utilizando um anticorpo anti-argpirimidina. Os números indicam a concentração de metilgloxal utilizada, em mM. À direita está indicada a massa dos marcadores de massa molecular, em kDa.

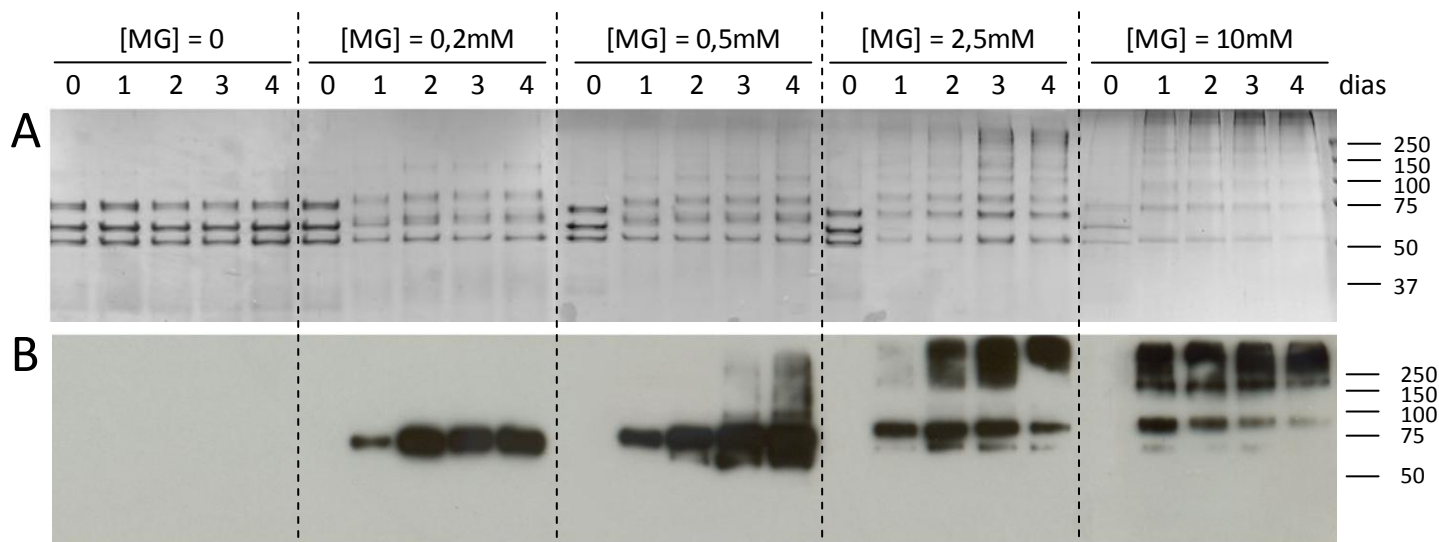
As consequências da glicação ao nível da massa molecular das várias cadeias foram analisadas por SDS-PAGE. Paralelamente, acompanhou-se a formação de argpirimidina por *western blot*, utilizando um anticorpo específico contra este aducto (Shamsi *et al*, 1998). Para uma análise preliminar, os resultados sem incubação e com 4 dias de incubação encontram-se dispostos na Figura 15.

As três cadeias de fibrinogénio  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  aparecem como três bandas distintas no gel de SDS-PAGE (Figura 15 A), já que apresentam massa molecular distinta aproximada de 66, 52 e 48 kDa, respectivamente. Para confirmar a identidade destas cadeias polipeptídicas, as proteínas foram identificadas por *peptide mass fingerprinting*. Esta técnica baseia-se na digestão de proteínas com um protease, como a tripsina, sendo originados um conjunto de péptidos específicos da proteína (impressão digital, ou *fingerprint*) analisável por espectrometria de massa. Por comparação do espectro com a digestão teórica da sequência partir de uma base de dados genómica (por exemplo, através do algoritmo MASCOT), é possível a identificação da proteína. Quanto à identificação das cadeias de fibrinogénio, os resultados encontram-se integrados na Figura 15, com a identificação destas no lado esquerdo da figura. As correspondências entre os picos no espectro de massa e os digeridos teóricos podem ser consultadas na Figura suplementar 2 (Anexo 1). A classificação (*score*) atribuída a cada identificação pelo algoritmo MASCOT foi de 201, 90 e 110, respectivamente para as cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . Uma identificação é considerada significativa, com um intervalo de confiança de 95%, quando o *score* atingido é superior a 78.

Com a extensão da glicação, é claro o aumento da massa molecular das três cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  do fibrinogénio (Figura 15). Isto indica que a glicação está a ocorrer de forma bastante proeminente, podendo ser observados aumentos de massa até cerca de 20kDa no caso da cadeia  $\alpha$ . Os resultados apresentados no *western blot* correspondente também mostram que esta cadeia é a mais afectada pela glicação, seguida da cadeia  $\beta$ . Este resultado é justificado pela primeira ser a cadeia que contém também mais resíduos de lisina e arginina. Curiosamente, para a cadeia  $\gamma$  não se observa sinal para a argpirimidina, sugerindo que este aducto não está presente, apesar do aumento de massa desta cadeia indicar que está a ocorrer glicação. Deste modo, estes resultados sugerem que nesta cadeia se formem maioritariamente outros aductos que não a argpirimidina após reacção com o metilglioxal. Como resultado da glicação, dá-se também oligomerização das cadeias de fibrinogénio, formando-se complexos estáveis de massa superior a 100kDa. Tal facto dever-se-á formação dos aductos MOLD e MODIC (que formam *cross-links* inter-cadeias). A oligomerização das cadeias é ainda acompanhada por um

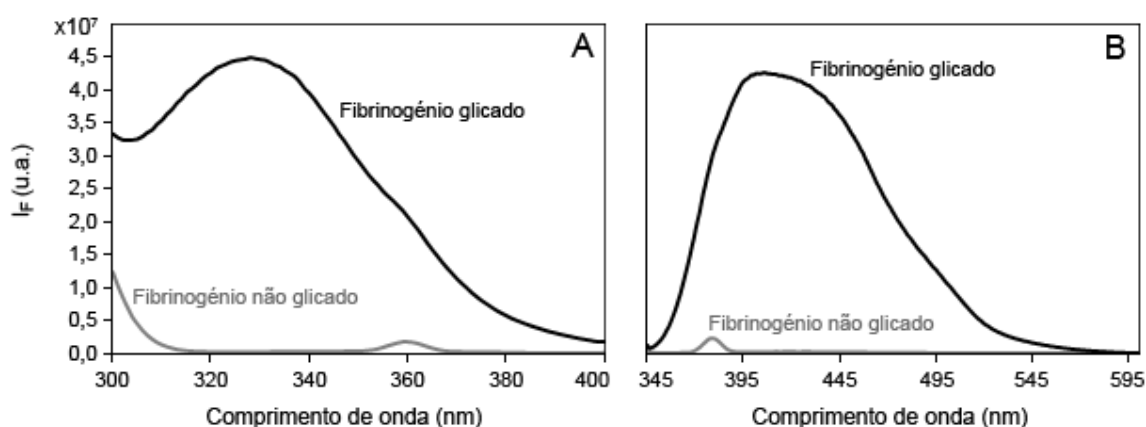
desvanecer das bandas das três cadeias na sua forma monomérica. No caso da incubação com as concentrações superiores de metilglioxal, observa-se uma banda que permanece no limiar entre os géis de concentração e de resolução, correspondente já a agregados estáveis das referidas cadeias.

Uma análise mais pormenorizada do efeito do tempo de incubação na glicação das cadeias de fibrinogénio pode ser feita com recurso à Figura 16. Em termos gerais, verifica-se que a extensão da glicação aumenta ao longo do tempo, já que as bandas correspondentes a cada cadeia apresentam uma mobilidade electroforética menor (devido ao aumento de massa) e a intensidade do sinal do anticorpo anti-argpirimidina aumenta. Para a concentração de metilglioxal de 2,5 mM, a formação de oligómeros intensifica-se após os 2 dias de incubação, sendo que no caso dos 0,5 mM isto ocorre apenas no último dia do ensaio. No caso da concentração de 10 mM de metilglioxal, o efeito de oligomerização e agregação dá-se logo num intervalo de 1 dia. Para esta concentração (e também para 2,5 mM) verifica-se ao longo do tempo um desvanecer das bandas correspondentes às três cadeias de fibrinogénio e do sinal do *western blot*, indicando que mais espécies livres estão a ser incluídas nos agregados ao longo do tempo.



**Figura 16** – Extensão da glicação do fibrinogénio ao longo do tempo e com concentrações crescentes de metilglioxal. (A) Géis de poliacrilamida contendo fibrinogénio não glicado e glicado com concentrações crescentes de metilglioxal: 0,2, 0,5, 2,5 e 10mM com vários tempos de incubação (coloração com azul de coomassie) e (B) Western blot correspondente utilizando um anticorpo anti-argpirimidina. Os números acima indicam o tempo de incubação, em dias. À direita está indicada a massa dos marcadores de massa molecular, em kDa.

Para além da realização de *western blot* com um anticorpo anti-argpirimidina, a formação deste aducto foi verificada por espectroscopia de fluorescência, já que a argpirimidina foi descrita como sendo um fluoróforo, com máximos de excitação e emissão a 320 e 382 nm, respectivamente (Shipanova *et al*, 1997). A presença de argpirimidina nas cadeias de fibrinogénio glicado pode ser confirmada analisando a Figura 17. Por análise dos espectros de excitação e emissão de fluorescência do fibrinogénio glicado e não glicado, é clara a presença deste fluoróforo apenas nas amostras incubadas com metilglioxal, apresentando excitação máxima a 330 nm e um máximo de emissão a 410 nm. A ligeira discrepância entre estes comprimentos de onda e os descritos na literatura deverão corresponder a efeitos do solvente, já que neste trabalho o aducto está inserido numa cadeia polipeptídica, enquanto que as medições em Shipanova *et al* foram realizadas em argpirimidina livre (Shipanova *et al*, 1997).



**Figura 17** - Espectros de excitação (A) e de emissão (B) de fluorescência do fibrinogénio glicado (preto) e não glicado (cinzento). Para traçar o espectro de excitação, foi realizado um varrimento dos comprimentos de onda de excitação de 300 a 400 nm, com leitura de emissão de fluorescência a 410 nm. No caso do espectro de emissão, realizou-se um varrimento dos comprimentos de onda de emissão, de 345 a 600 nm, com excitação fixa nos 335 nm.  $I_f$ , intensidade de fluorescência; u.a., unidades arbitrárias.

## 1.2 Cobertura de sequência: Abordagem simples

Sendo o principal objectivo o mapeamento dos locais de glicação nas três cadeias de fibrinogénio, considerou-se necessário que sejam detectados o maior número possível de péptidos da proteína, de forma que seja o mais completo possível. Isto significa que caso um exercício de optimização não seja realizado, muita informação valiosa é perdida. Assim, previamente ao mapeamento dos locais modificados, determinou-se qual a parte da sequência coberta (detectada) das várias cadeias de fibrinogénio e de albumina do soro bovino (BSA, do

inglês *bovine serum albumin*) após digestão com tripsina, na ausência de glicação, seguindo os princípios da técnica *peptide mass fingerprinting*. Ao invés de se comparar o espectro com uma vasta base de dados, neste caso constituiu-se a *digestão teórica* no programa Sequence Editor, directamente a partir das sequências de cada cadeia obtidas a partir da base de dados UniProtKB. Isto permitiu contemplar os processos de maturação das cadeias no que toca a processamento pós-traducional, nomeadamente ausência do péptido sinal das três cadeias e processamento do terminal carboxilo da cadeia  $\alpha$  (Watt *et al*, 1979; Henschen *et al*, 1980; Kant *et al*, 1983), bem como incluir, *à posteriori*, a glicação como modificação pós-traducional.

Em termos de preparação da amostra, optou-se por digerir as cadeias directamente no gel com tripsina, o que nos permitiu analisar os espectros correspondentes às várias cadeias de forma independente, dada a separação prévia no gel. Os péptidos foram purificados e concentrados em microcolunas contendo uma resina de fase reversa denominada POROS R2 e analisados no espectrómetro FTICR após eluição com uma solução de matriz CHCA em 50% de acetonitrilo (ACN) com 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) directamente para a placa de MALDI.

Para o analisador de massa FTICR disponível no nosso laboratório, era possível optar entre as fontes de *electrospray* ou MALDI. Neste caso, optou-se pela fonte de MALDI, já que a fonte de *electrospray* necessita de maiores quantidades de amostra e origina espectros mais complexos. Dado que o sinal para os iões positivos (protonados) era também superior, todos os espectros foram adquiridos em modo positivo. Os espectros podem ser consultados nas Figura suplementar 1 e 2 (Anexo 1), onde são apresentadas explicitamente as correspondências entre os picos dos espectros e os digeridos teóricos. A partir destes dados, obtiveram-se os valores de cobertura de sequência, para cada cadeia, apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2** – Cobertura de sequência da albumina sérica bovina (BSA) e das três cadeias do fibrinogénio após digestão com tripsina

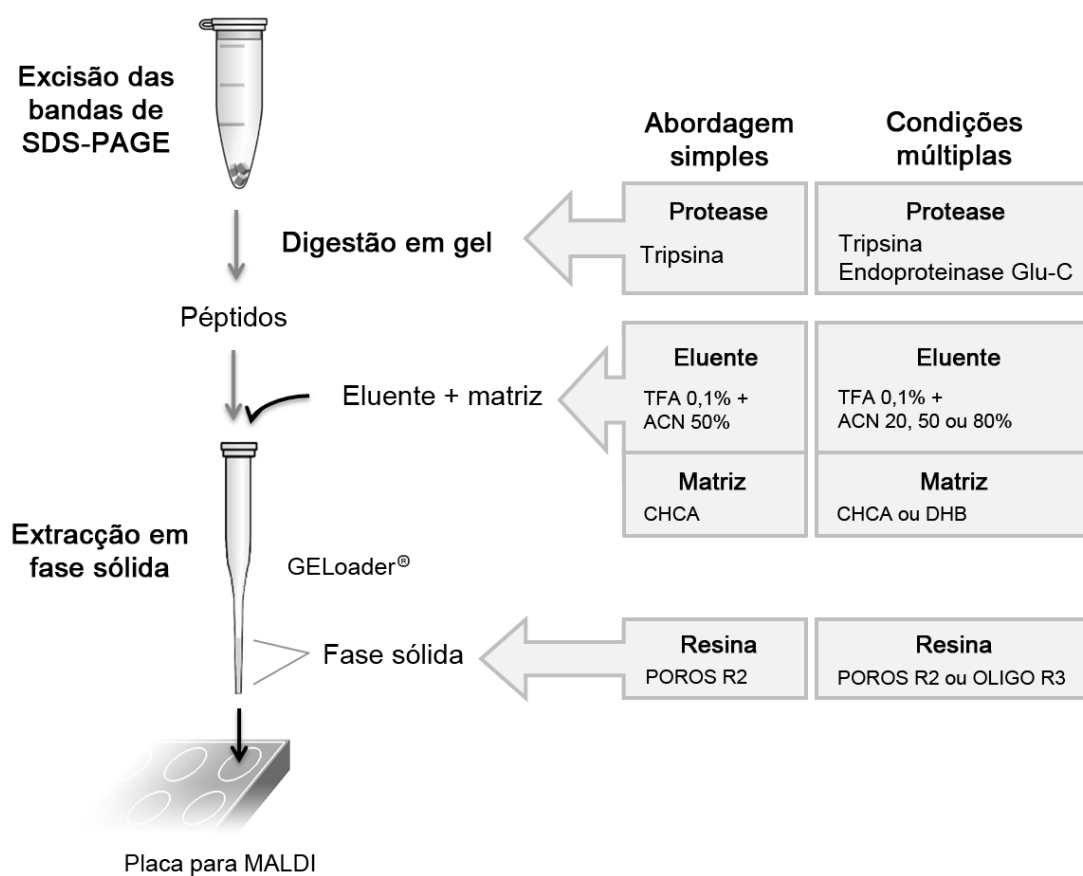
	Cadeia	Cobertura de sequência (%)
	BSA	25,9
Fibrinogénio	Cadeia $\alpha$	36,4
	Cadeia $\beta$	32,5
	Cadeia $\gamma$	30,2

O cruzamento da razão massa/carga ( $m/z$ ) observada nos espectros com os valores de  $m/z$  teóricos para a digestão com tripsina resultou em 14 correspondências para a BSA e 21, 14 e 10 para as cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  do fibrinogénio, respectivamente. A cobertura de apenas 1/3 da sequência do fibrinogénio era altamente desfavorável para o mapeamento dos locais de glicação, já que qualquer modificação de aminoácidos da região não coberta não seria detectada.

### 1.3 Cobertura de sequência: Abordagem utilizando condições múltiplas

Existem diversos factores que podem prevenir a detecção dos péptidos em MALDI-MS e desta forma limitar o mapeamento de locais de glicação. Em primeiro lugar, a eficiência de ionização não é igual para todos os péptidos (Krause *et al*, 1999), podendo também ocorrer efeitos de supressão de sinal em misturas de péptidos (Kratzer *et al*, 1998). Para além disto, é necessário ter em conta os limites do próprio analisador de massa no que toca à razão massa/carga detectável (Steen *et al*, 2003). É ainda possível que haja um impedimento da chegada dos péptidos à própria fonte de ionização devido a questões envolvendo a própria preparação da amostra: apesar da extracção em fase sólida permitir a concentração dos péptidos e a remoção de contaminantes, a disparidade das propriedades intrínsecas dos péptidos (como a hidrofobicidade) podem impedir que todos os produtos da digestão sejam aplicados na placa de MALDI (Boddi *et al*, 2009). Como consequência, a escolha das condições de preparação da amostra e de ionização que permitam um mapeamento completo de locais modificados é uma tarefa difícil.

Existem diversas estratégias descritas na literatura com o intuito de amplificar a cobertura de sequência evitando os problemas acima descritos. Cozzolino *et al* ultrapassaram problemas de ionização combinando diversas matrizes para análise por MALDI (Cozzolino *et al*, 2001). Outros autores utilizaram vários proteases (Choudhary *et al*, 2003; Wa *et al*, 2006), diversas resinas (Steen *et al*, 2003; Boddi *et al*, 2009) ou realizaram eluições sucessivas após a extracção de fase sólida (Wa *et al*, 2006). Desta forma, dada a baixa cobertura de sequência obtida anteriormente, neste trabalho conjugou-se as várias estratégias utilizadas de forma a aumentar a cobertura de sequência, recorrendo-se a uma multiplicidade de condições: 1) dois proteases, tripsina e endoproteínase Glu-C; 2) duas resinas de fase reversa POROS R2 e OLIGO R3, seguido de eluição em concentrações crescentes do solvente orgânico acetonitrilo e 3) duas matrizes, CHCA e DHB, ambas largamente utilizadas em MALDI.



**Figura 18** - Representação esquemática do método de preparação da amostra utilizado neste trabalho

### 1.3.1 Optimização de condições para hidrólise com Glu-C

De forma a aplicar este método, foi necessário aferir quais as condições mais apropriadas para a realização da digestão em gel com endoproteínase Glu-C. Este protease hidrolisa o terminal carboxilo de resíduos de glutamato e aspartato e tem actividade numa vasta gama de valores de pH, com máximos a pH 4,0 e 7,8. Duas soluções utilizadas para manter estes valores de pH são o tampão acetato de amónio e bicarbonato de amónio, respectivamente para os valores de pH apresentados. No entanto, nestas soluções a hidrólise em resíduos de aspartato é em muito desfavorecida, o que não acontece em tampões fosfato (Houmard *et al*, 1972; Gupta *et al*, 2010). Numa primeira abordagem realizou-se a hidrólise de BSA utilizando várias soluções tampão, variando também a temperatura de forma a aferir em que condições a cobertura de sequência era superior (Tabela 3).

**Tabela 3** – Aferição das condições mais adequadas à digestão de BSA com endoproteínase Glu-C

Tampão	pH	T (°C)	C. Sequência (%)	Número de correspondências
Bicarbonato de amónio	7,8	25	0,0	0
		37	17,2	11
Acetato de amónio	4,0	25	2,9	2
		37	2,9	2
Fosfato de sódio	7,8	25	10,1	4
		37	25,7	12

Apesar do Glu-C estar descrito como tendo uma boa actividade a pH 4,0, a cobertura de sequência da BSA esteve bastante atrás do obtido quando a hidrólise foi realizada a pH 7,8. Neste caso, a utilização do tampão fosfato revelou-se vantajosa, resultando numa cobertura de sequência 8,5% superior à obtida para a digestão no tampão bicarbonato de amónio. Quanto ao efeito da temperatura, os resultados obtidos a 37°C superaram os obtidos à temperatura ambiente.

Seguidamente à aferição das melhores condições para as digestões com Glu-C, decidiu-se averiguar se a realização deste passo traria claras vantagens em relação à hidrólise com tripsina (Tabela 2). A comparação da cobertura de sequência obtida para cada um dos proteases está disposta na Figura 19. Combinando os resultados para ambos os proteases, é atingida uma cobertura de sequência total de 39,3%, sendo que 13,6% da sequência é apenas detectada após hidrólise com tripsina e 14,8% é exclusiva da digestão com Glu-C. 11,0% da sequência foi detectada usando ambos os proteases. Estes resultados justificam assim o uso em paralelo de ambos os proteases nos ensaios subquentes.

10                    20                    30                    40                    50                    60  
 DTHKSEIAHR FKDLGEEHFK GLVLIAFSQY LQQCPFDEHV KLVNELTEFA KTCVADESHA  
  
 70                    80                    90                    100                    110                    120  
 GCEKSLHTLF GDELCKVASL RETYGDADC CEKQEPERNE CFLSHKDDSP DLPKLPDPN  
  
 130                    140                    150                    160                    170                    180  
 TLCDEFKADE KKFWGKYLYE IARRHPYFYA PELLYYANKY NGVFQECCQA EDKGACLLPK  
  
 190                    200                    210                    220                    230                    240  
 IETMREKVL A SSARQLRCA SIQKFGERAL KAWSVARLSQ KFPKAEFVEV TKLVTDLTKV  
  
 250                    260                    270                    280                    290                    300  
 HKECCHGDL E ECADDRADLA KYICDNQDTI SSKLKECCDK PLEKSHCIA EVEKDAIPEN  
  
 310                    320                    330                    340                    350                    360  
LPPLTADFAE DKDVCKNYQE AKDAFLGSFL YEYSRRHPEY AVSVLLRLAK EYEATLEECC  
  
 370                    380                    390                    400                    410                    420  
 AKDDPHACYS TVFDKLV KHLV DEPONLIKQN CDQFEKLGEY GFONALIVRY TRKVPOVSTP  
  
 430                    440                    450                    460                    470                    480  
TLVEVSRSLG KVGTRCCTKP ESERMPCTED YLSLILNRLC VLHEKTPVSE KVTKCCTESL  
  
 490                    500                    510                    520                    530                    540  
VNRRPCFSAL TPDETYVPKA FDEKLFTHA DICTLPDTEK QIKKQTALVE LLKHKPKATE  
  
 550                    560                    570                    580  
EQLKTMENF VAFVDKCCAA DDKEACFAVE GPKLVVSTQT ALA

**Figura 19** – Cobertura de sequência da BSA após hidrólise com tripsina (linha verde) em tampão bicarbonato de amônio e Glu-C (linha vermelha) em tampão fosfato de sódio

### 1.3.2 Cobertura de sequência das cadeias não glicadas

Após a aferição das condições mais apropriadas à hidrólise com Glu-C, procedeu-se a diversas digestões em gel onde se foi variando a matriz e as condições de digestão e de extracção, tal como referido anteriormente. Nitidamente, a combinação destes diversos factores foi crucial para aumentar a cobertura de sequência das quatro cadeias polipeptídicas consideradas (Tabela 4). Em termos de valor médio, partindo de uma cobertura de sequência de 31,3%, a realização de eluições sucessivas (20, 50 e 80% de acetonitrilo) aumentou este valor para 43,8%. O uso de DHB em paralelo com CHCA permitiu a obtenção de um valor de 52,9% e ao usar também OLIGO R3 aumentou-se a cobertura de sequência para 65,6%. Finalmente, o uso de endoproteínase Glu-C em paralelo com tripsina resultou na cobertura de sequência final de 83,6%.

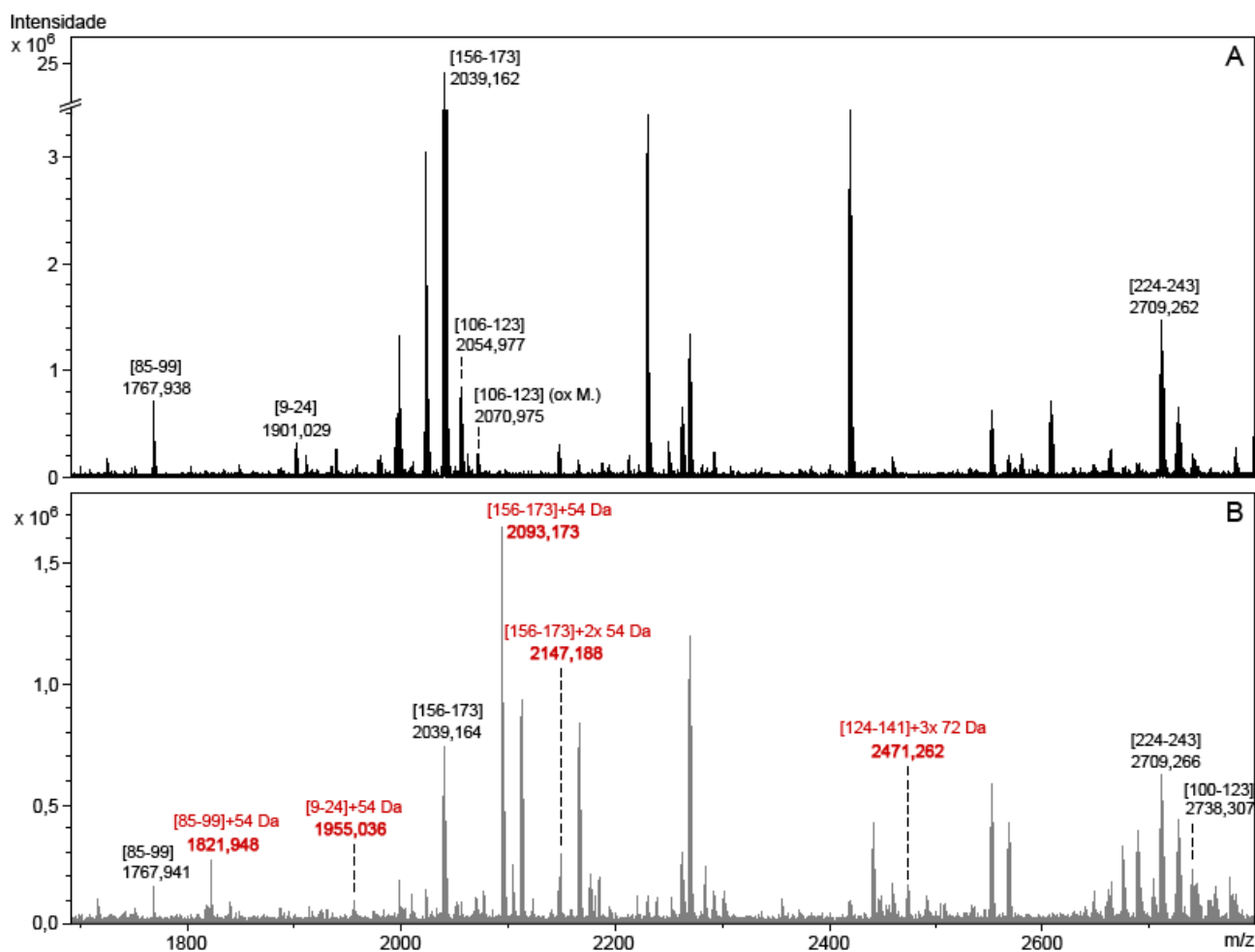
**Tabela 4** – Aumento de cobertura de sequência com cada um dos passos acrescentados à preparação da amostra

	Cobertura de sequência (%)	Abordagem simples	Eluições sucessivas	+DHB	+OLIGO R3	+ Glu-C
Fibrinogénio	BSA	25,9	25,9	40,1	66,9	<b>88,2</b>
	Cadeia $\alpha$	36,4	38,9	45,7	51,8	<b>69,7</b>
	Cadeia $\beta$	32,5	46,0	54,9	66,4	<b>92,4</b>
	Cadeia $\gamma$	30,2	64,2	71,0	77,1	<b>83,9</b>

Estes resultados reflectem claramente a importância de se combinar diversas estratégias com o intuito de aumentarmos a cobertura de sequência. Os valores obtidos deverão proporcionar um mapeamento mais completo dos locais modificados.

### 1.3.3 Cobertura de sequência das cadeias glicadas

Após a optimização do método para se obter uma cobertura de sequência elevada das três cadeias de fibrinogénio, prosseguiu-se com estudo das cadeias glicadas. Já que as três cadeias apresentavam já sinais de glicação após incubação com 0,2mM de metilgloxal (Figura 15), optou-se por iniciar o mapeamento nestas condições, evitando-se também problemas derivados da oligomerização verificada para concentrações superiores de metilgloxal. Para este efeito, bandas de géis de poliacrilamida foram removidas e espectros dos digeridos foram obtidos após aplicação da abordagem de múltiplas condições. Ahmed *et al* descreveram o MG-HI, argpirimidina e CEL como as modificações mais frequentes em albumina sérica humana glicada utilizando metilgloxal (Ahmed *et al*, 2005b). Deste modo, aqui optou-se por incluir estes três aductos de metilgloxal na lista de modificações pós-traducionais possíveis aquando do estabelecimento de correspondências entre o digerido teórico e os espectros adquiridos. Os incrementos de massa resultantes da presença destes aductos são, respectivamente, 54,011, 80,026 e 72,021 Da. Os espectros foram sempre comparados com o controlo (cadeia não glicada) e só foram considerados péptidos glicados os que estivessem ausentes no espectro controlo.



**Figura 20** – Comparação dos espectros de digeridos da cadeia  $\beta$  do fibrinogénio com Glu-C, (A) antes e (B) após glicação com 0,2 mM de metilgloxal. Separação na resina R3 com 50% de ACN no eluente; matriz: CHCA. Todas as correspondências de picos com a *fingerprint* desta cadeia encontram-se apresentadas. Vermelho, péptidos glicado. Ox. M: oxidação num resíduo de metionina.

O acompanhamento da glicação em digeridos de Glu-C é relativamente fácil, já que após a glicação os péptidos modificados passam meramente a apresentar a diferença de massas correspondente ao aducto (Figura 20). No entanto, para a digestão com tripsina temos que ter em conta que a glicação modifica os locais de hidrólise pela tripsina, o que impede a actividade proteolítica nestes locais (dá-se uma *missed cleavage*) e torna os espectros mais complexos.

À semelhança dos espectros apresentados na Figura 20, foram estabelecidas correspondências entre a digestão teórica das três cadeias de fibrinogénio e os espectros de massa obtidos para as restantes condições de preparação utilizadas contemplando péptidos modificados e não modificados. Os resultados em termos de cobertura de sequência estão apresentados na Tabela 5.

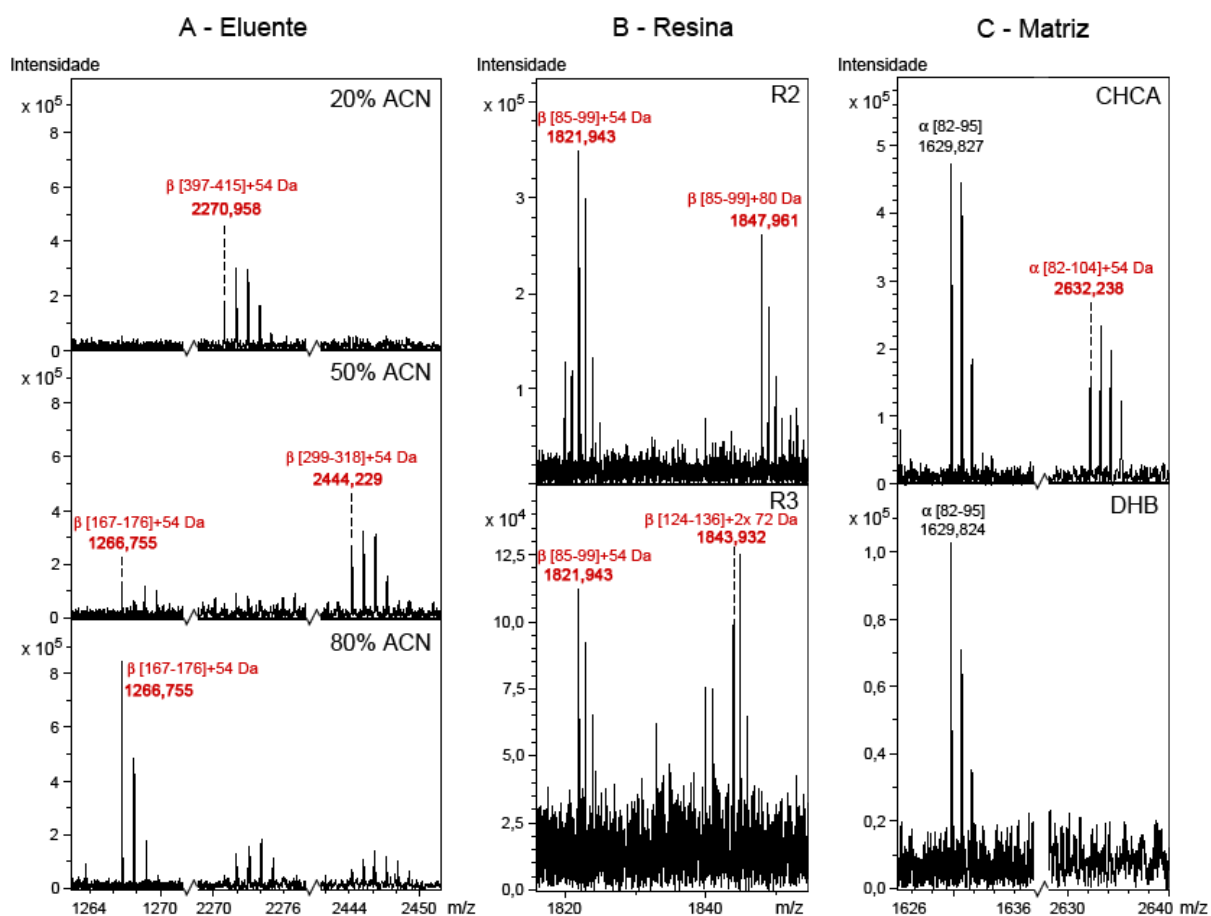
**Tabela 5** – Cobertura de sequência das três cadeias de fibrinogénio glicadas. A presença de resíduos de aminoácidos modificados já foi contemplada para este cálculo

	Cobertura de sequência (%)	Abordagem simples	Combinação de condições
Fibrinogénio	Cadeia $\alpha$	25,9	<b>71,8</b>
	Cadeia $\beta$	46,3	<b>90,8</b>
	Cadeia $\gamma$	56,9	<b>85,9</b>

A cobertura de sequência total não difere entre as cadeias glicadas e não glicadas (Tabela 4 e 5). No entanto, existem diferenças para os digeridos de cada um dos proteases: a cobertura de sequência foi inferior em digeridos com Glu-C (até um decréscimo de 25% no caso da cadeia  $\beta$ ), mas sistematicamente superior em digeridos trópticos. Este aumento médio de 8,2% no caso de digestão com tripsina deve-se à ocorrência de *missed cleavages* derivadas da glicação, sendo que péptidos pequenos ( $m/z$  inferior a 600, não detectáveis nas condições definidas para o analisador de massa) são agora detectados como parte integrante de péptidos de massa molecular superior.

#### 1.4 Locais de glicação

A análise dos diversos espectros adquiridos permitiu inferir quais os aductos e em que posição da cadeia polipeptídica estes se encontram. A Figura 21 explora algumas diferenças detectadas entre as diferentes condições, sendo que análise detalhada dos espectros para as várias condições de preparação da amostra encontra-se apresentada nas Tabela 6, Tabela 7 e Tabela 8, para as cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , respectivamente.



**Figura 21** – Comparação dos péptidos glicosados (vermelho) e não glicosados (preto) de fibrinogénio detectados em diferentes condições. Para cada grupo de espectros (A,B,C) apenas a propriedade indicada é alterada, mantendo-se as restantes condições de preparação da amostra. (A) Espectros de um digerido tríptico da cadeia  $\beta$ , resultantes da eluição sequencial em R2 com as concentrações crescentes de acetonitrilo (ACN): 20, 50 e 80%. Matriz: CHCA. (B) Espectros de um digerido da cadeia  $\beta$  com Glu-C, resultantes da extração de fase sólida realizada nas resinas R2 e R3 com 20% ACN. Matriz: CHCA. (C) Espectros de um digerido tríptico da cadeia  $\alpha$ , adquiridos com recorrência ao uso das matrizes CHCA e DHB. Extração em R2 com 50% ACN.

**Tabela 6** - Locais de glicação da cadeia  $\alpha$  do fibrinogénio. A cobertura de sequência (CS) correspondente a cada condição é apresentada. K, lisina; R, arginina; <sup>a</sup> péptido glicado também encontrado na abordagem simples. Os números na tabela referem-se à razão sinal/ruído do pico correspondente.

Tripsina	Aducto	CS (%)	CHCA		DHB	
			R2	R3	R2	R3
			<b>25,9</b>	<b>38,5</b>	<b>26,1</b>	<b>53,3</b>
[82-104] <sup>a</sup>	MG-HI	R <sup>95</sup>	12,6	10,4		
[105-116]	MG-HI	R <sup>110</sup>				6,4
[139-148]	MG-HI	R <sup>141</sup>				8,0
[139-149] <sup>a</sup>	AGP,CEL	R <sup>141</sup> e K <sup>148</sup>	7,7			
[150-162] <sup>a</sup>	CEL	K <sup>157</sup>	4,5			
[163-176]	1xMG-HI	R <sup>167</sup> ou R <sup>171</sup>			4,6	
[163-176] <sup>a</sup>	2xAGP	R <sup>167</sup> e R <sup>171</sup>	16,2			
[192-199]	MG-HI	R <sup>197</sup>		4,7		
[192-206]	2xMG-HI	R <sup>197</sup> e R <sup>199</sup>		8,6		
[198-206]	MG-HI	R <sup>199</sup>				4,6
[231-252]	2xMG-HI	R <sup>239</sup> e R <sup>244</sup>		4,2		
[440-448]	MG-HI,CEL	R <sup>440</sup> e K <sup>444</sup>				7,6
[492-508] <sup>a</sup>	MG-HI	R <sup>493</sup>	4,9			
[492-508]	AGP	R <sup>493</sup>				15,5
[540-556] <sup>a</sup>	MG-HI	R <sup>554</sup>	6,8			20,8
[563-580]	MG-HI	R <sup>572</sup>				8,7

Glu-C	Aducto	CS (%)	CHCA		DHB	
			R2	R3	R2	R3
			<b>18,7</b>	<b>24,8</b>	<b>8,0</b>	<b>0,0</b>
[12-22]	1xMG-HI	R <sup>16</sup> ou R <sup>19</sup>		13,7	5,1	
[156-172]	CEL,1xMG-HI	K <sup>157</sup> e R <sup>159</sup> ou R <sup>162</sup> ou R <sup>167</sup> ou R <sup>171</sup>		4,6		
[156-174]	1xMG-HI,1xAGP	R <sup>159</sup> ou R <sup>162</sup> ou R <sup>167</sup> ou R <sup>171</sup>	5,0			
[178-186]	CEL	K <sup>183</sup>		5,1		
[181-198]	MG-HI,1xCEL	R <sup>197</sup> e K <sup>183</sup> ou K <sup>191</sup>	4,9			
[397-408]	1xAGP	R <sup>406</sup> ou R <sup>407</sup>			4,7	
[478-497]	1xMG-HI	R <sup>491</sup> ou R <sup>493</sup>		6,1		
[489-497]	1xMG-HI	R <sup>491</sup> ou R <sup>493</sup>		8,7		

**Tabela 7** - Locais de glicação da cadeia  $\beta$  do fibrinogénio. A cobertura de sequência (CS) correspondente a cada condição é apresentada. K, lisina; R, arginina; <sup>a</sup> péptido glicado também encontrado na abordagem simples. Os números na tabela referem-se à razão sinal/ruído do pico correspondente.

Tripsina	Aducto	CS (%)	CHCA		DHB	
			R2	R3	R2	R3
			<b>66,6</b>	<b>62,9</b>	<b>34,1</b>	<b>49,4</b>
[22-42]	1xMG-HI	R <sup>23</sup> ou R <sup>30</sup>		5,0		
[43-53]	MG-HI,CEL	R <sup>44</sup> e K <sup>47</sup>	12,1			
[149-169] <sup>a</sup>	MG-HI	R <sup>166</sup>	12,6	18,3		
[167-176] <sup>a</sup>	MG-HI	R <sup>169</sup>	59,2	23,1		
[299-318] <sup>a</sup>	MG-HI	R <sup>304</sup>	10,7	5,0		
[322-344] <sup>a</sup>	2xCEL	K <sup>323</sup> e K <sup>337</sup>	4,8			
[397-415] <sup>a</sup>	MG-HI	R <sup>406</sup>	9,5	4,6		
[442-449]	MG-HI	R <sup>448</sup>		5,0	5,2	
[450-461] <sup>a</sup>	CEL	K <sup>453</sup>	4,7			
[450-461] <sup>a</sup>	AGP	R <sup>455</sup>	4,5			

Glu-C	Aducto	CS (%)	CHCA		DHB	
			R2	R3	R2	R3
			<b>29,3</b>	<b>30,6</b>	<b>18,2</b>	<b>12,2</b>
[9-24]	1xMG-HI	R <sup>14</sup> ou R <sup>17</sup> ou R <sup>23</sup>	5,1	5,8		
[85-99]	1xMG-HI	R <sup>91</sup> ou R <sup>94</sup>	23,6	18,2	25,7	9,7
[85-99]	AGP	R <sup>91</sup>	17,4			
[124-136]	AGP,1xCEL	R <sup>128</sup> e K <sup>127</sup> ou K <sup>130</sup> ou K <sup>133</sup>	4,0			
[124-136]	1xCEL	K <sup>127</sup> ou K <sup>130</sup> ou K <sup>133</sup>		6,2		
[124-141]	3xCEL	K <sup>127</sup> e K <sup>130</sup> e K <sup>133</sup>	7,7	4,8		
[156-173]	1xMG-HI	R <sup>166</sup> ou R <sup>169</sup>	95,0	84,7	4,5	
[156-173]	2xMG-HI	R <sup>166</sup> e R <sup>169</sup>	13,4	10,4		
[174-183]	MG-HI	R <sup>176</sup>			8,3	
[174-183]	1xCEL	K <sup>178</sup> ou K <sup>181</sup>			6,7	
[292-309]	MG-HI	R <sup>304</sup>	5,0			

**Tabela 8** - Locais de glicação da cadeia  $\gamma$  do fibrinogénio. A cobertura de sequência (CS) correspondente a cada condição é apresentada. K, lisina; R, arginina; <sup>a</sup> péptido glicado também encontrado na abordagem simples. Os números na tabela referem-se à razão sinal/ruído do pico correspondente.

Tripsina			CHCA		DHB	
			R2	R3	R2	R3
Aducto	CS (%)	73,7	50,6	36,3	41,1	
[1-14] <sup>a</sup>	MG-HI	R <sup>5</sup>	9,3	17,2		
[88-108]	1xCEL	K <sup>88</sup> ou K <sup>95</sup>		17,1		
[248-266] <sup>a</sup>	MG-HI	R <sup>256</sup>	23,9	11,3		
[374-381]	AGP	R <sup>375</sup>		6,3		
[386-406] <sup>a</sup>	MG-HI	R <sup>391</sup>	7,7			
[392-411]	CEL	K <sup>406</sup>		4,8		

Glu-C			CHCA		DHB	
			R2	R3	R2	R3
Aducto	CS (%)	20,4	38,4	19,5	12,4	
[45-56]	CEL	K <sup>53</sup>	4,6			
[81-92]	1xCEL	K <sup>85</sup> ou K <sup>88</sup>		4,1		
[98-112]	MG-HI	R <sup>108</sup>	11,9	58,7	10,0	
[232-249]	MG-HI	R <sup>247</sup>	4,3			
[253-261]	AGP	R <sup>256</sup>				4,6

#### 1.4.1 Importância do uso de várias condições no mapeamento dos locais glicosados

Aquando da comparação dos espectros das cadeias glicosadas e não glicosadas do fibrinogénio, encontraram-se um total de 56 picos específicos do fibrinogénio modificado cuja massa corresponde a péptidos contendo aductos de metilgloxal: 24, 21 e 11 nas cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , respectivamente. Descreveu-se assim a modificação de 60 aminoácidos (19 lisinas e 41 argininas). O uso da abordagem simples levou à descoberta de apenas 19 aminoácidos modificados (5 lisinas e 14 argininas), reforçando a importância do uso de múltiplas condições.

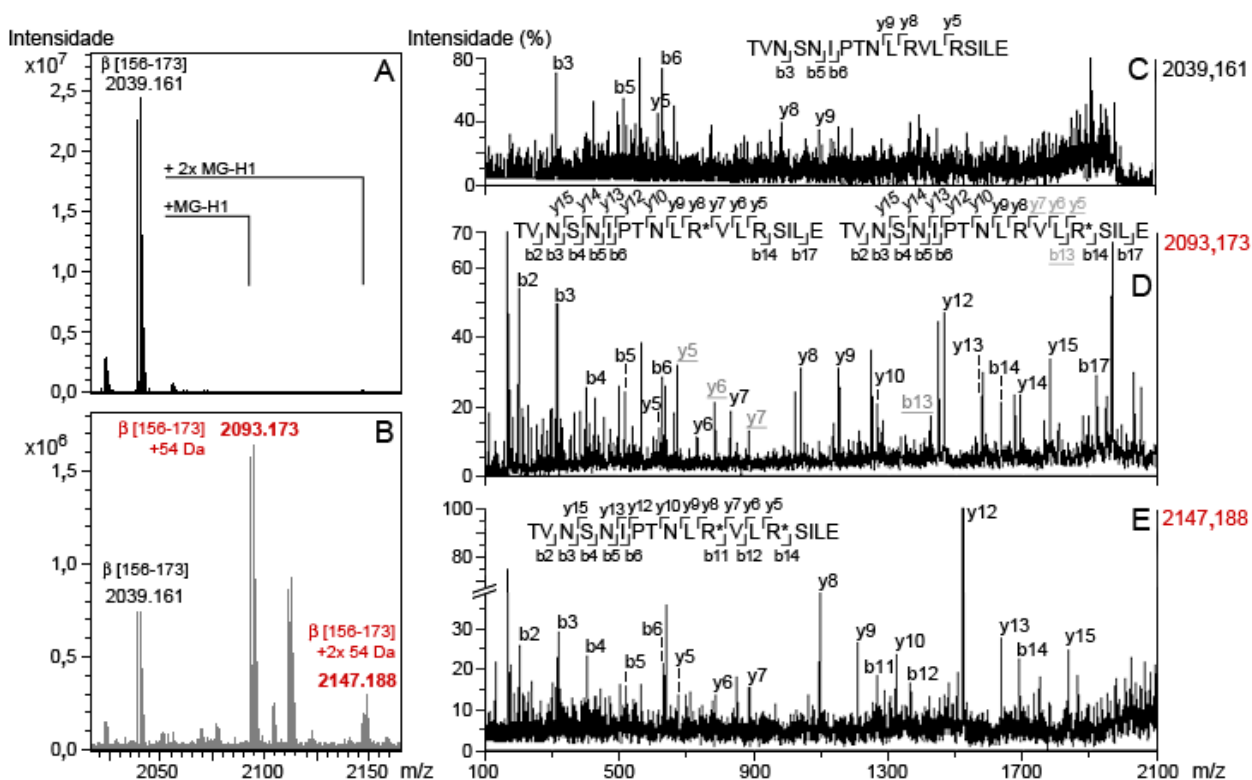
No que toca aos resultados para ambas as resinas utilizadas, foram encontrados 36 péptidos glicosados tanto para POROS R2 como para OLIGO R3. Vários péptidos foram detectados exclusivamente após extracção numa das resinas, como evidenciado na Figura 21 B, onde o péptido de m/z 1843,932 apenas é detectado após extracção em R3 enquanto que o péptido 1847,961 é exclusivo da extracção em R2, apesar do péptido 1821,943 ser comum após uso de ambas as resinas. No total, 20 péptidos foram detectados apenas com R2, enquanto outros 20 péptidos foram detectados só com R3 (Tabela 6, Tabela 7 e Tabela 8). Já que ambas as resinas

diferem no tamanho do poro e na área de superfície específica (Whitney *et al*, 1998), assumiu-se que eram detectados péptidos diferentes em cada uma das resinas devido ao seu índice de hidrofobicidade. Desta forma, procedeu-se ao cálculo do índice de hidrofobicidade médio (GRAVY, do inglês *grand average of hydropathicity index*) para cada péptido utilizando a ferramenta ProtParam do ExPASy ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)). A média deste índice para todos os péptidos encontrados após extracção em R2 foi de -0.738 e, no caso de R3, -0.811. A realização de um teste t de Student revelou que os índices de hidrofobicidade não eram estatisticamente diferentes ( $p\text{-value} \gg 0,05$ ).

No caso dos resultados para ambos os proteases, o uso de Glu-C permitiu encontrar 24 novos locais de glicação. Vários aminoácidos modificados foram encontrados após digestão com ambos os proteases (argininas 157, 167, 171, 197 e 493 da cadeia  $\alpha$ ; argininas 166, 169 e 304 da cadeia  $\beta$  e lisina 88 e arginina 256 da cadeia  $\gamma$ ). Quanto às matrizes utilizadas, 39 péptidos glicosados são específicos de CHCA contra 11 apenas encontrados com a utilização de DHB. O facto de altas coberturas de sequência terem sido atingidas para as amostras com DHB sugere uma dificuldade da ionização especificamente dos péptidos glicosados. Esta afirmação é suportada pelos dados da Figura 21 C, onde o péptido de  $m/z$  1629,827, não glicosado, é detectado utilizando ambas as matrizes, mas tal não acontece com o péptido glicosado de  $m/z$  2632,238. Estes resultados sugerem então que CHCA é uma matriz mais adequada para ionizar péptidos modificados pelo metilglicoxal.

#### 1.4.2 Heterogeneidade da glicação

De todos os AGE considerados, detectámos em maior abundância o conjunto de aductos MG-HI, de acordo com o descrito na literatura (Brock *et al*, 2007; Gomes *et al*, 2008). De facto, para as três cadeias, 36 picos dos vários espectros correspondiam a péptidos com esta modificação, contra 10 péptidos com argpirimidina e 16 com o aducto CEL (foram também detectados péptidos com mais do que um tipo de aducto). Péptidos contendo múltiplos aminoácidos modificados foram também detectados, como é o caso do péptido de sequência TVNSNIPTNLRVLRISILE apresentado na Figura 22.



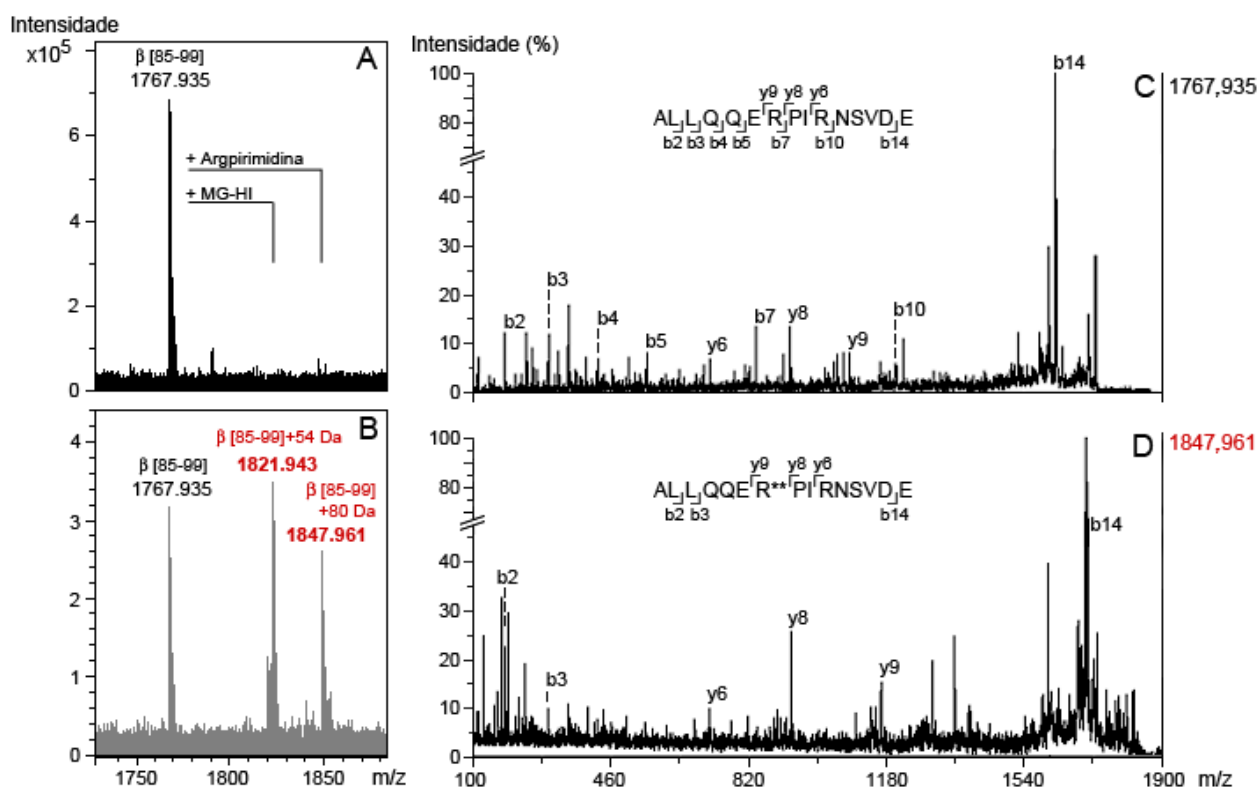
**Figura 22** - Espectro parcial da cadeia  $\beta$  do fibrinogénio após digestão com Glu-C e extracção em R3 com 50% ACN em 0,1% TFA. Matriz: CHCA. (A) Cadeia não glicada, (B) Espectro obtido após glicação. (C-E) Espectros de fragmentação (*tandem MS*) do péptido TVNSNIPNLRVLR\*VLR\*SILE ( $m/z$  2039,16, posições 156-173) glicado e não glicado: (C) péptido não modificado, (D) péptido contendo um aducto MG-HI e (E) péptido contendo dois aductos MG-HI. R\*: Aducto de metilglioxal MG-HI. A recolha de espectros de espectrometria de massa *tandem* foi efectuada pelo Dr. Ricardo Gomes (ITQB).

No espectro apresentado na Figura 22 B (cadeia  $\beta$  glicada), foram detectados dois picos correspondentes ao referido péptido ( $m/z$  2039,16) modificado: O pico a  $m/z$  2147,19 corresponde ao péptido mais dois aductos MG-HI, sugerindo a formação de AGEs em ambos os resíduos de arginina 166 e 169, como confirmado pelo espectro de fragmentação deste péptido (Figura 22 E). Por outro lado, o pico de  $m/z$  2093,17 corresponde ao mesmo péptido, mas com um incremento de massa que corresponde a apenas um aducto MG-HI. Já que o péptido com ambas as argininas modificadas foi encontrado, suspeitou-se que o pico 2093,17 teria uma contribuição do péptido apenas com a arginina 166 modificada e do péptido com a arginina 169 modificada. De facto, os dados de espectrometria de massa *tandem* (Figura 22 D) apoiam esta hipótese, estando presentes picos exclusivos de cada um dos péptidos. A diferença de massas entre os fragmentos exclusivos de ambos os péptidos ( $y_5$ ,  $y_6$  e  $y_7$ ) é de 54,01 Da (incremento de massa aquando da formação do aducto MG-HI). Esta informação sugere que a glicação *in vitro* é

algo complexa e heterogénea, já que os aminoácidos podem conter a modificação (ou não) em diferentes moléculas da mesma cadeia.

O número de péptidos encontrados contendo argpirimidina é bastante inferior do que para outros aductos. Apesar da cobertura de sequência mais baixa, detectaram-se mais péptidos com este aducto na cadeia  $\alpha$  do que na  $\beta$ , como esperado devido à análise por *western blot* (Figura 15 B). Curiosamente, a cadeia  $\gamma$  apresenta também este aducto (argininas 256 e 375, Tabela 8) ao contrário do que o *western blot* sugere, dada a ausência da banda correspondente a esta cadeia.

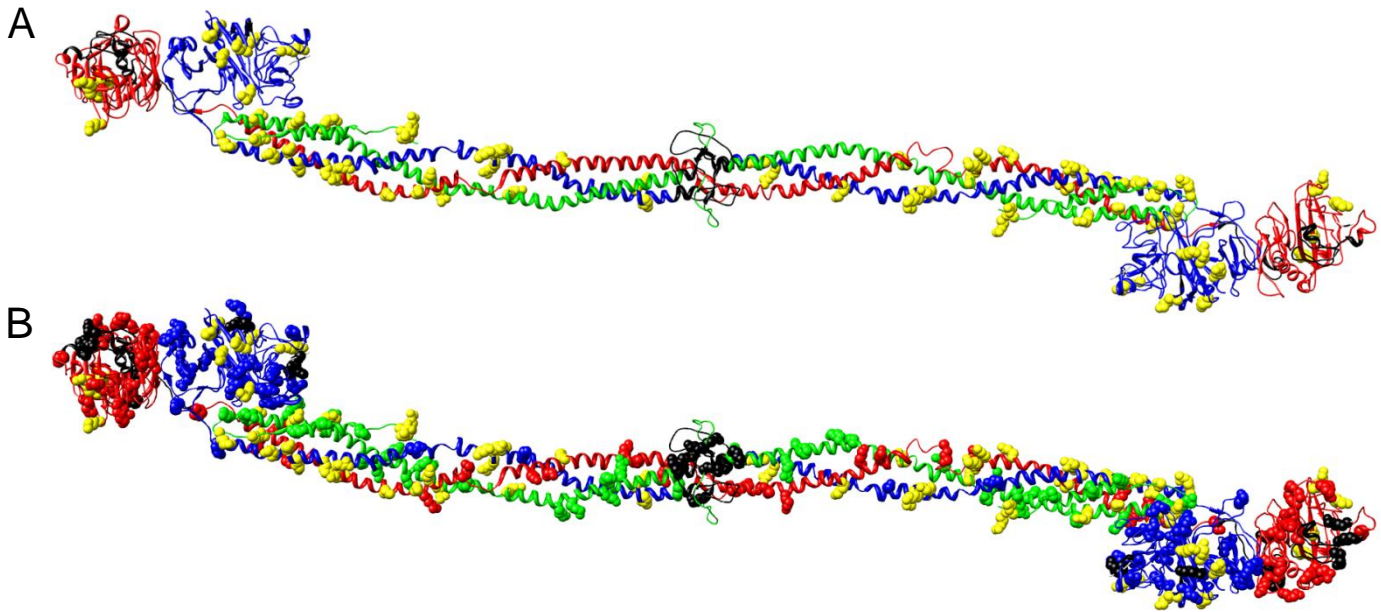
Apesar de menos abundantes em número, os picos de péptidos modificados com argpirimidina são também menos intensos do que os que contêm o aducto MG-HI. Um exemplo é o péptido ALLQQERPIRNSVDE (também da cadeia  $\beta$  do fibrinogénio), encontrado como contendo um aducto MG-HI em algumas moléculas da cadeia  $\beta$  e noutras argpirimidina (Figura 23, iões 1821,943 e 1847,961, respectivamente). O espectro de fragmentação da Figura 23 D confirma a presença de argpirimidina, já que entre os iões  $\gamma_8$  e  $\gamma_9$  existe a perda de um fragmento neutro de massa 236,13 Da, correspondente à arginina com esta modificação. O facto de ambos os aductos MG-HI e argpirimidina serem detectados neste péptido (Figura 23 B) reforça a ideia de heterogeneidade da glicação *in vitro*, mas neste caso no tipo de aducto formado. A modificação com argpirimidina aparenta também ser mais específica de aminoácido, já que apenas iões do péptido modificado na arginina 91 são detectados. No caso do pico 1821,943, foi detectada uma contribuição de péptidos com MG-HI na arginina 91 e de péptidos modificados na arginina 94 (informação não mostrada).



**Figura 23** – Espectro parcial da cadeia  $\beta$  do fibrinogénio após digestão com Glu-C e extracção em R2 com 20% ACN em 0,1% TFA. Matriz: CHCA. (A) Cadeia não glicada, (B) Espectro obtido após glicação. (C,D) Espectros de fragmentação do péptido ALLQQRPIRNSVDE ( $m/z$  1767,94, posições 85-99): (C) não modificado e (D) contendo um aducto argpirimidina na arginina 91. R\*\* : Argpirimidina.

### 1.4.3 Locais de glicação na estrutura do Fibrinogénio

Através da análise da Figura 24, pode-se constatar que existe uma forte ausência de cobertura de sequência no domínio central, existindo outras regiões não detectadas nos referidos domínios globulares. Infelizmente os dados de cristalografia disponíveis referentes à cadeia  $\alpha$  estão bastante incompletos (código PDB 3GHG (Kollman *et al*, 2009)), não permitindo analisar a posição espacial dos aminoácidos glicosados e das regiões não cobertas na região C-terminal desta cadeia. Em relação aos resíduos glicosados, existe uma elevada dispersão nas regiões helicoidais *coiled-coil*, mas a incidência é superior nas zonas próximas dos domínios globulares  $\beta$ C e  $\gamma$ C.



**Figura 24** – Locais de glicação na estrutura do fibrinogénio. Verde, cadeia  $\alpha$ ; Azul, cadeia  $\beta$ ; Vermelho, cadeia  $\gamma$ . Os aminoácidos encontrados glicosados estão assinalados a amarelo. As regiões cuja sequência não foi coberta estão preenchidas a preto. (A) Apenas as cadeias laterais dos resíduos glicosados estão apresentadas; (B) as cadeias laterais de todos os resíduos de arginina e lisina estão apresentadas.

## 1.5 Estudo da detecção de péptidos glicosados utilizando outras matrizes

Após a determinação dos locais de glicação por MALDI-MS utilizando as matrizes CHCA e DHB, onde se constatou que com CHCA se detectavam mais péptidos glicosados do que utilizando DHB, testou-se se haveria uma matriz ainda melhor para detectar os péptidos contendo aminoácidos com esta modificação. Desta forma, recorreu-se a ensaios idênticos aos realizados anteriormente, mas utilizando cinco outras matrizes SA, HMB, THAP, HABA e DHAP. Já que as maiores coberturas de sequência foram atingidas para a cadeia  $\beta$  do fibrinogénio, optou-se por realizar este ensaio com esta cadeia. Os resultados estão disponíveis na Tabela 9.

Apesar de para certas matrizes se ter obtido uma boa cobertura de sequência (por exemplo, DHB, HMB e DHAP em digeridos trípticos), CHCA é claramente superior no que toca à ionização dos péptidos contendo aductos de metilgloxal. Apesar disto, 11 péptidos modificados foram apenas detectados aquando do uso de DHB, reflectindo alguma importância no uso desta matriz em paralelo com CHCA no mapeamento de locais de glicação, tal como foi realizado no estudo do presente trabalho.

**Tabela 9** – Locais de glicação da cadeia  $\beta$  do fibrinogénio para as sete matrizes testadas. Para simplificação, omitiu-se a indicação das condições nas quais os péptidos foram detectados. As relações sinal/ruído e a cobertura de sequência (CS) correspondente à matriz são apresentadas. K, lisina; R, arginina

<b>Tripsina</b>			CHCA	DHB	SA	HMB	THAP	HABA	DHAP
	<b>Aducto</b>	<b>CS (%)</b>	<b>72,7</b>	<b>49,7</b>	<b>20,4</b>	<b>31,2</b>	<b>0,0</b>	<b>8,7</b>	<b>48,8</b>
[22-42]	1xMG-HI	R <sup>23</sup> ou R <sup>30</sup>	5,0						
[43-53]	MG-HI,CEL	R <sup>44</sup> e K <sup>47</sup>	12,1						
[149-169]	MG-HI	R <sup>166</sup>	18,3						
[167-176]	MG-HI	R <sup>169</sup>	59,2						
[299-318]	MG-HI	R <sup>304</sup>	10,7			13,9			
[299-321]	MG-HI	R <sup>304</sup>				5,4			
[322-344]	2xCEL	K <sup>323</sup> e K <sup>337</sup>	4,8						
[397-415]	MG-HI	R <sup>406</sup>	9,5						
[442-449]	MG-HI	R <sup>448</sup>	5,0	5,2					
[450-461]	CEL	K <sup>453</sup>	4,7						
[450-461]	AGP	R <sup>455</sup>	4,5						

<b>Glu-C</b>			CHCA	DHB	SA	HMB	THAP	HABA	DHAP
	<b>Aducto</b>	<b>CS (%)</b>	<b>34,3</b>	<b>20,4</b>	<b>14,7</b>	<b>25,8</b>	<b>3,0</b>	<b>5,4</b>	<b>3,0</b>
[9-24]	1xMG-HI	R <sup>14</sup> ou R <sup>17</sup> ou R <sup>23</sup>	5,8						
[85-99]	1xMG-HI	R <sup>91</sup> ou R <sup>94</sup>	23,6	25,7					
[85-99]	AGP	R <sup>91</sup>	17,4						
[85-98]	2xMG-HI	R <sup>91</sup> e R <sup>94</sup>			5,4	4,4	5,1	5,5	7,1
[124-136]	AGP	R <sup>128</sup>	4,0						
[124-136]	1xCEL	K <sup>127</sup> ou K <sup>130</sup> ou K <sup>133</sup>	6,2						
[124-141]	3xCEL	K <sup>127</sup> e K <sup>130</sup> e K <sup>133</sup>	7,7						
[156-173]	1xMG-HI	R <sup>166</sup> ou R <sup>169</sup>	95,0	4,5	5,3	29,1			
[156-173]	2xMG-HI	R <sup>166</sup> e R <sup>169</sup>	13,4			14,8			
[174-183]	MG-HI	R <sup>176</sup>		8,3					
[174-183]	1xCEL	K <sup>178</sup> ou K <sup>181</sup>		6,7					
[292-309]	MG-HI	R <sup>304</sup>	5,0						

## 2 Função de *chaperone* do Fibrinogénio

Após o mapeamento dos locais glicados no fibrinogénio humano procedeu-se ao estudo das consequências desta modificação na sua função de *chaperone* molecular. Tal como referido anteriormente, resultados obtidos pelo nosso grupo indiciam a supressão dessa função perante a glicação (da Costa *et al*, 2011). No entanto, é ainda desconhecido 1) o efeito do fibrinogénio na agregação da própria TTR e 2) o efeito da glicação na prevenção da amiloidogénese da TTR. A resposta a estas questões pode ser estabelecida realizando ensaios de agregação da TTR na presença de fibrinogénio em ambos os estados glicado e não glicado. A amiloidogénese desta proteína pode ainda ser induzida pelo aumento da temperatura para 55°C (Lundberg *et al*, 2009). No entanto, tal facto tornaria incompatível a co-incubação com fibrinogénio, já que este sofre desnaturação em torno dos 50°C (Hassan *et al*, 2011). Por outro lado, a TTR tem uma elevada propensão para agregar a valores de pH ácido (Colon *et al*, 1992; Pasquato *et al*, 2007). Supôs-se que estas condições adversas poderiam levantar o mesmo problema que as temperaturas elevadas nos ensaios de co-incubação, mas tal não foi encontrado na literatura. Este facto fez com que se iniciasse pelo estudo da influência de valores de pH moderadamente ácidos na função de *chaperone* do fibrinogénio utilizando uma proteína modelo, a insulina.

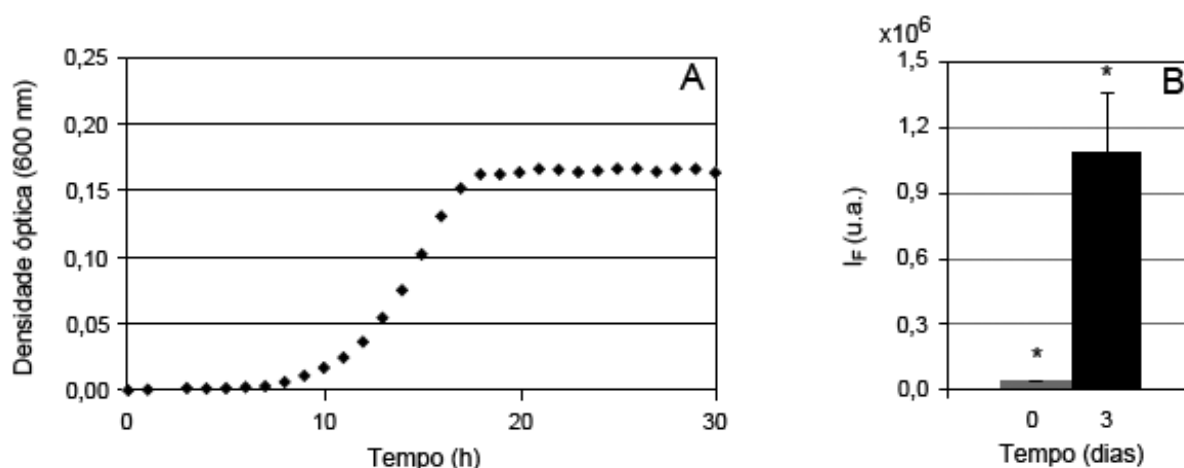
A insulina foi descoberta e purificada pela primeira vez por Banting e Best (Banting, 1926). É uma proteína que tem como função principal promover a entrada de glucose pelas células do organismo, pelo que é largamente utilizada no controlo da diabetes (Henderson, 1964). No entanto, a insulina é também amiloidogénica, num processo altamente dependente do valor de pH a que é sujeita (Dyukov *et al*, 2008; Haas *et al*, 2009), tornando-a um óptimo modelo para o estudo da supressão da agregação mediada pelo fibrinogénio nestas condições.

### 2.1 Insulina

#### 2.1.1 Optimização das condições para agregação da insulina

Para induzir a formação de fibras amilóides a partir da insulina, utilizou-se o tampão acetato de sódio (pKa 4,76). Apesar de estar descrito na literatura que o processo de agregação é altamente acelerado entre pH 1,6 e 3 (Pasquato *et al*, 2007; Haas *et al*, 2009), incubou-se a insulina a pH 4,6, de forma a 1) manter condições não tão afastadas das fisiológicas e 2) utilizar condições já descritas como indutoras da agregação da TTR (Colon *et al*, 1992; Pasquato *et al*, 2007), para se realizar todos os ensaios de actividade de *chaperone* do fibrinogénio nas mesmas

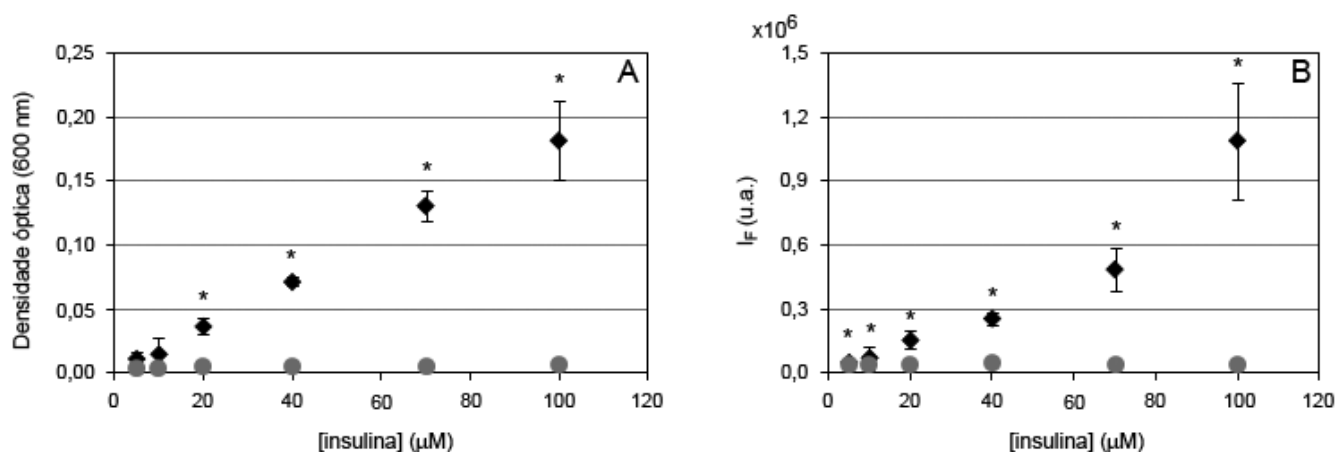
condições. A detecção de agregados foi realizada através da medição ao longo do tempo da densidade óptica a 600 nm, como medida da dispersão de luz provocada pela presença dos depósitos proteicos insolúveis. Para além disto, mediu-se também o sinal de fluorescência da sonda tioflavina T. A utilização desta sonda permitiu determinar se esses agregados seriam ordenados (fibras amilóides) ou não. Tal propriedade advém do facto da tioflavina T, na ausência de fibras amilóides, ter propriedades óptimas de emissão a 438 nm após excitação a 350 nm, mas na presença de amilóide ocorre uma alteração na estrutura da sonda, alterando o máximo de emissão para os 485 nm e de excitação para os 440 nm (LeVine, 1999).



**Figura 25** – Cinética de agregação da insulina 0,6 mg/mL a pH 4,6. (A) Absorvência a 600nm medida ao longo de 30 horas. (B) Intensidade de fluorescência ( $I_f$ ) da sonda tioflavina T aos 3 dias de incubação, com excitação a 440nm e medição da emissão a 485nm. u.a., unidades arbitrárias. As barras representam o valor médio de 3 replicados. As barras de erro correspondem ao desvio padrão. \*Teste T de Student indica diferença entre amostras e controlos, p-value < 0,05.

A Figura 25 permitiu confirmar que a insulina agrega nas condições aqui utilizadas, apesar de algo distantes das descritas na literatura para este efeito (pH entre 1,6 e 3). A Figura 25 A mostra a ocorrência de agregação ao longo do tempo de incubação, sendo que a Figura 25 B confirma que o processo de agregação é ordenado, ou seja, está a ocorrer a formação de fibras amilóides. Existe claramente uma cinética do tipo sigmóide neste processo de fibrilhação, característico do mecanismo de fibrilhação dependente de nucleação (Bhak *et al*, 2009). Neste mecanismo, na primeira fase de crescimento lento (0 até 10 h, fase *lag*), dá-se a formação do núcleo termodinamicamente instável, ao qual são depois rapidamente acrescentados monómeros na fase de propagação (10 a 18 h, fase de crescimento, com cinética exponencial). Após depleção das espécies monoméricas livres, a fase de crescimento é desacelerada até uma fase estacionária (a partir das 18 h) (Bhak *et al*, 2009).

Após o sucesso em induzir a formação de fibras amilóides de insulina, pretendemos determinar qual a concentração mínima desta proteína para a qual era detectada a formação de amilóide. Já que se pretendia a co-incubação posterior com fibrinogénio em razões molares fixas, este passo permitiu reduzir a quantidade de fibrinogénio a utilizar. Para tal, incubou-se insulina 100  $\mu\text{M}$  (aproximadamente 0,6 mg/mL), 70, 40, 20, 10 e 5  $\mu\text{M}$  também a pH 4,6 à temperatura de 37°C (considera-se uma massa molecular da insulina de 5808 Da, de acordo com (Heinemann, 2010)). Esta incubação foi prolongada para 3 dias de forma a permitir a agregação nas amostras mais diluídas, já que existe uma dependência da cinética de amiloidogénese (em especial da extensão da fase *lag*) com a concentração da proteína amiloidogénica, como evidenciado por Ferguson *et al* (Ferguson *et al*, 2003). A Figura 26 mostra uma aparente linearidade entre a concentração de insulina e a formação de fibras amilóides, já que existe uma correlação linear entre a concentração desta proteína e o sinal de densidade óptica ( $R^2$  0,9988) e da intensidade de fluorescência da sonda utilizada ( $R^2$  0,9261). A concentração de insulina que se determinou ser mais adequada para a realização dos ensaios subsequentes foi de 20  $\mu\text{M}$ . Para esta concentração, foi possível verificar a formação de fibras amilóides nos 3 dias de incubação, sendo que é ainda a concentração mínima para a qual ambos os valores de densidade óptica (a 600 nm) e de intensidade de fluorescência são estatisticamente diferentes (considerando um intervalo de confiança de 95%) dos respectivos controlos (Figura 26).

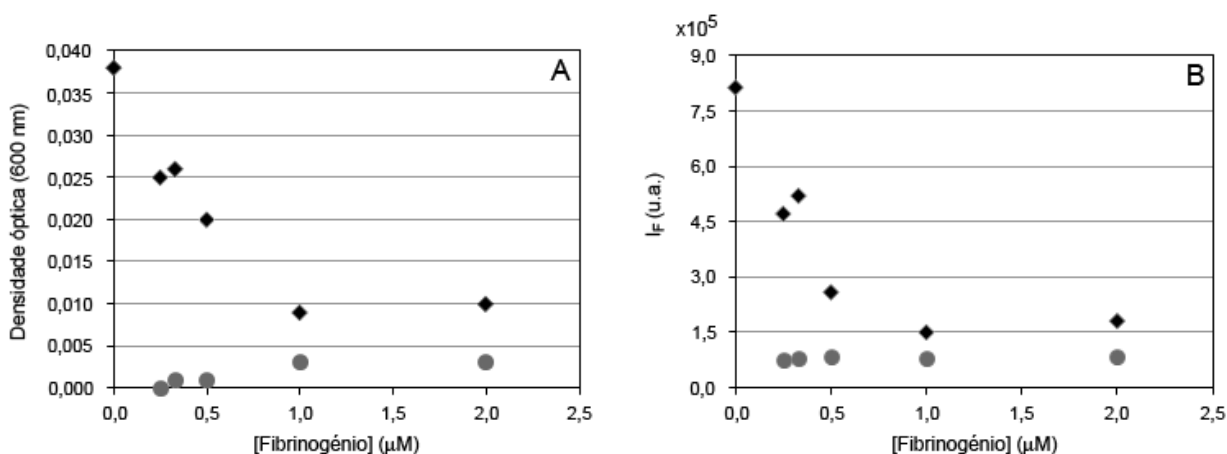


**Figura 26** – Agregação de insulina a concentrações inferiores. (♦) Incubação a pH 4,6 durante 3 dias a 37°C. (●) Controlo, sem incubação. (A) Absorvência a 600nm, (B) Intensidade de fluorescência ( $I_f$ ) da sonda tioflavina T, com excitação a 440nm e medição da emissão a 485nm. u.a. unidades arbitrárias. Os resultados indicam o valor médio de 3 replicados. As barras de erro indicam o desvio padrão, que no caso dos controlos são menores que o respectivo ícone (●). \*Teste T de Student indica diferença entre amostras e controlos,  $p$ -value < 0,05.

### 2.1.2 Agregação de insulina na presença de Fibrinogénio

A função de *chaperone* molecular do fibrinogénio implica a estabilização de proteínas perante condições favoráveis à aquisição de uma conformação incorrecta. Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo mostraram que essa função é exercida sobre a insulina (da Costa *et al*, 2011), mas em condições redutoras. Prosseguiu-se assim com a confirmação deste efeito aquando da agregação a pH ácido. Adicionalmente, procedeu-se à aferição de qual a razão molar entre fibrinogénio e insulina que permite a eficiente estabilização desta proteína amiloidogénica nas referidas condições desnaturantes. As proporções insulina:fibrinogénio utilizadas foram 10:1, 20:1, 40:1, 60:1 e 80:1 (Figura 27). Observou-se uma diminuição da agregação da insulina de forma dependente da concentração de fibrinogénio. Esta actividade supressora da agregação foi observada para todas as concentrações de fibrinogénio utilizadas, até uma concentração de fibrinogénio de 1,0  $\mu\text{M}$  (proporção de 20:1). Estes dados apontam para uma elevada robustez da função de *chaperone* molecular em condições bastante adversas, neste caso valores de pH longe dos fisiológicos, mas também perante agentes redutores (da Costa *et al*, 2011) e temperaturas ligeiramente elevadas (43°C) (Tang *et al*, 2009a), como demonstrado em estudos anteriores.

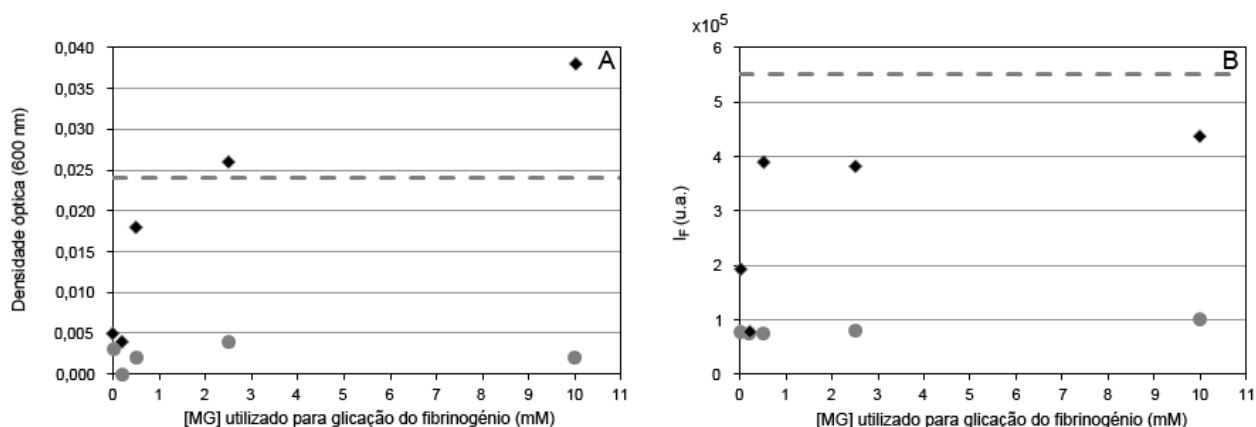
A manutenção da actividade estabilizadora do fibrinogénio a pH ácido é também um indicador de que este poderá ser utilizado em ensaios de inibição da agregação da TTR.



**Figura 27** – Efeito do fibrinogénio na agregação da insulina 20,0  $\mu\text{M}$ , após incubação a pH 4,6, 37°C durante 3 dias. (◆) Insulina com fibrinogénio; (●) apenas fibrinogénio. (A) Absorvência a 600nm, (B) Intensidade de fluorescência ( $I_f$ ) da sonda tioflavina T. u.a., unidades arbitrárias. O sinal em ambas as técnicas foi nulo para a insulina sem incubação.

### 2.1.3 Glicação e perda da função de *chaperone* do Fibrinogénio

Neste capítulo, optou-se adicionalmente por verificar os efeitos da glicação do fibrinogénio na resposta à agregação da insulina. Estes efeitos foram anteriormente demonstrados para fibrinogénio modificado com 2,5 e 10 mM de metilglioxal (da Costa *et al*, 2011), mas a obtenção de um elevado número de locais glicosados mesmo para uma concentração de 0,2 mM deste  $\alpha$ -dicarbonilo (Resultados, capítulo 1) revelou a necessidade de realizar este estudo para fibrinogénio glicosado menos extensivamente. As condições de agregação utilizadas foram idênticas à do ensaio anterior, com uma concentração de insulina 20  $\mu$ M. No entanto, restringiu-se a concentração de fibrinogénio co-incubado apenas a 0,5  $\mu$ M (proporção insulina:fibrinogénio 40:1). Apesar desta não corresponder à concentração para a qual a actividade inibitória da agregação é máxima, o efeito é já facilmente mensurável e traz vantagens no que toca ao gasto de solução proteica, já que é limitada. A redução da actividade de *chaperone* do fibrinogénio com o avançar do estado de glicação foi determinada utilizando fibrinogénio nativo ou incubado com metilglioxal 0,2, 0,5, 2,5 e 10 mM (Figura 28).



**Figura 28** – Efeito da glicação na actividade de *chaperone* do fibrinogénio. (♦) Insulina com fibrinogénio, não glicosado ou glicosado com metilglioxal 0,2, 0,5, 2,5 ou 10 mM; (●) apenas fibrinogénio; (--) Apenas insulina. Incubação a 37°C, pH 4,6 durante 3 dias. (A) Absorvência a 600nm, (B) Intensidade de fluorescência,  $I_f$ , da sonda tioflavina T. u.a., unidades arbitrárias. MG, metilglioxal.

A Figura 28 indica claramente uma perda da função de *chaperone* do fibrinogénio derivada da glicação. O aumento da dispersão de luz e sinal de tioflavina T não advém da agregação do próprio fibrinogénio já que, na ausência de insulina e nas mesmas condições de agregação (indicado na figura por círculos a cinzento), este efeito não é observado. Curiosamente, a resposta no que toca à formação de fibras amilóides (Figura 27 B) ou agregados, de natureza fibrillar ou não (Figura 27 A) é distinta: enquanto que o sinal de

tioflavina T mostra que a formação de fibras amilóides de insulina é facilmente recuperada com a glicação do fibrinogénio (não variando para estados de glicação superiores), o sinal de dispersão de luz aponta que a agregação aumenta gradualmente com o estado de modificação do fibrinogénio, descrevendo aparentemente uma curva logarítmica. O facto do sinal da tioflavina T na co-incubação com fibrinogénio glicado nunca atingir a intensidade observada para a insulina isolada (linha tracejada) sugere que existe insulina não incorporada nas fibras. Supõe-se que esta insulina livre agregue na presença do fibrinogénio mais extensivamente glicado, mas não na forma de agregados ordenados, já que na Figura 27 A é possível continuar a observar um aumento do sinal de dispersão de luz.

## 2.2 Transtirretina

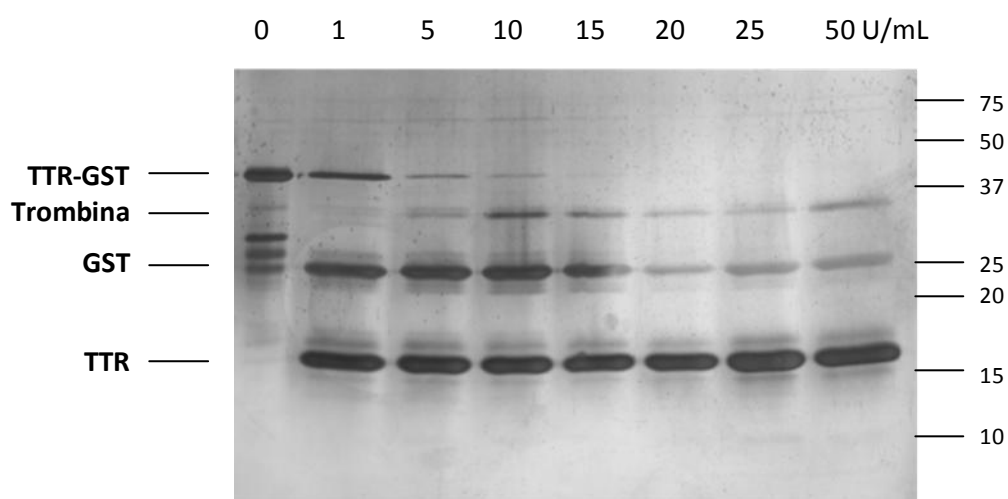
Os estudos de agregação de insulina na presença de fibrinogénio confirmaram a manutenção da actividade de *chaperone* deste a pH ácido. Isto faz com que se possa prosseguir com a agregação da TTR também a pH ácido (4,6), como descrito na literatura (Colon *et al*, 1992; Pasquato *et al*, 2007), com vista a explorar o efeito estabilizador do fibrinogénio directamente nesta proteína. Dada a indisponibilidade de transtirretina purificada de soro humano no nosso laboratório, recorreremos à técnica de DNA recombinante para expressar esta proteína no laboratório em *E. coli*.

### 2.2.1 Preparação de TTR recombinante

Com o intuito de facilitar a purificação da TTR, o seu cDNA (DNA complementar) foi inserido junto ao cDNA de uma outra proteína, o Glutathione S-transferase (GST), incluído no plasmídeo pGEX utilizado. O GST pode ser facilmente removido de uma mistura proteica utilizando glutathione (o seu substrato) ligado a esferas de agarose ou sephadex® (Berthold *et al*, 1992), seguindo princípios semelhantes ao da cromatografia de afinidade. A ligação covalente da TTR a esta proteína (denominada *tag*) permite que seja co-purificada, num processo simples e com alto rendimento.

O plasmídeo pGEX utilizada apresenta ainda a particularidade de se poder separar o *tag* da TTR, já que a ligação peptídica entre ambos pode ser hidrolisada pelo protease trombina. Realizar este passo enquanto o par TTR-GST ainda se encontra ligado às esferas de glutathione

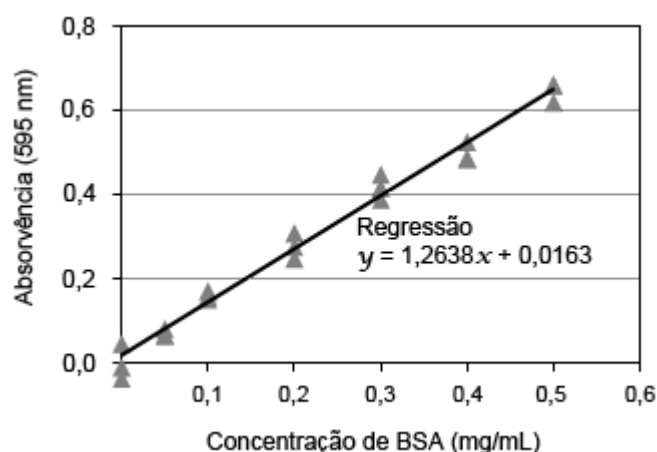
imobilizado tem ainda vantagem de evitar um passo adicional de remoção do GST da mistura de proteínas. A hidrólise da referida ligação requereu alguma optimização, já que idealmente a solução final de TTR deve estar desprovida de trombina para posterior incubação com o fibrinogénio, de forma a evitar a conversão deste a fibrina (apesar da trombina ser de origem bovina, a homologia com a trombina humana é bastante elevada, possivelmente tendo o fibrinogénio humano como substrato). O estudo para aferir qual o mínimo de unidades catalíticas (U,  $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) a utilizar encontra-se na Figura 29.



**Figura 29** – Tratamento de esferas contendo TTR-GST com crescentes unidades de trombina, com as espécies resultantes a serem analisadas por SDS-PAGE. Os valores acima referem-se ao número de unidades catalíticas de trombina por mL (U/mL). Coloração das bandas do gel de poliacrilamida com nitrato de prata. Os números à direita indicam a massa dos marcadores de massa molecular, em kDa.

Através da base de dados UniProtKB, pôde-se estimar a massa molecular das proteínas envolvidas e assim fazer a correspondência com as bandas observadas na Figura 29, tal como indicado. A trombina bovina tem uma massa aproximada de 35,4 kDa, o GST do parasita *Schistosoma japonicum* 25,5 kDa e a TTR monomérica recombinante 14,0 kDa. Desta forma, o par TTR-GST tem uma massa molecular aproximada de 39,5 kDa. A utilização de nitrato de prata como meio de coloração das bandas de natureza proteica nos géis de poliacrilamida prendeu-se no facto deste ser mais sensível que o azul de coomassie. Na análise da Figura 29 observou-se que a utilização de 15 U/mL de trombina seria o mais apropriado, já que todos os complexos TTR-GST aparentam ter sido hidrolisados, com maior ganho de TTR isolada perante a menor concentração de trombina. Parte do GST ainda presente em solução foi removido através de um passo adicional de centrifugação, tratando-se de algumas esferas residuais. Curiosamente, este passo promoveu ainda a remoção de uma quantidade considerável de trombina.

A análise do gel de TTR purificada através do programa Phoretix 1D permitiu uma quantificação relativa das duas espécies detectadas, a própria TTR e também o GST, com um volume das bandas de  $1,260 \times 10^8$  e  $1,489 \times 10^7$  (unidades arbitrárias), respectivamente. Concluiu-se assim que a TTR correspondia a 89,4% das proteínas em solução.



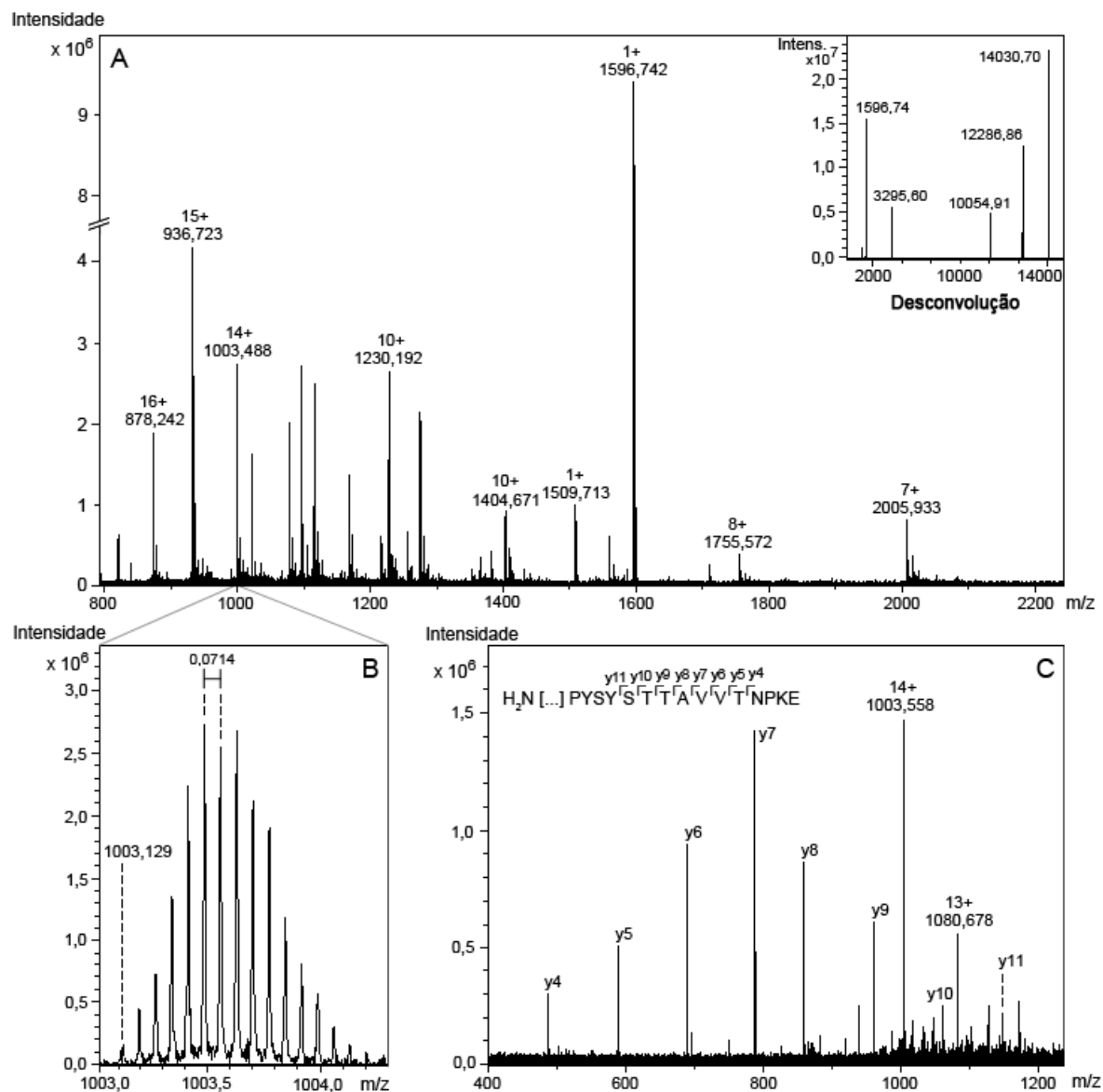
**Figura 30** – Quantificação proteica pelo método de Bradford: Absorvência de padrões de BSA 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5 mg/mL (realizados em triplicado) e respectiva regressão linear.

Em paralelo, procedeu-se à quantificação absoluta da concentração proteica total pelo método de Bradford, tendo-se obtido uma absorvência média (595 nm) de 0,246 para uma solução diluída 2 vezes. Com recurso a padrões de albumina do soro bovino (BSA), construiu-se a recta de regressão que relaciona a concentração proteica, em mg/mL, com a absorvência (Figura 30). A concentração proteica total da solução de TTR foi estimada em 0,364 mg/mL. Como se estabeleceu que a TTR correspondia a 89,4% das proteínas em solução, supôs-se que a TTR estaria presente numa concentração de 0,3255 mg/mL, ou 23,19  $\mu$ M de monómero (considerando uma massa molecular média de 14036,7 Da, calculada utilizando a ferramenta ProtParam, ExpASy, com a sequência da TTR recombinante discutida na secção 2.2.2).

### 2.2.2 Confirmação da presença de TTR por *electrospray*-MS

A detecção das espécies em solução, em especial da TTR, mas também de contaminantes, foi realizada com recorrência ao espectrómetro de massa FTICR (Figura 31). Neste caso, optou-se pela análise das cadeias intactas, sem digestão, utilizando a fonte de

*electrospray*. Com esta fonte de ionização observamos elevados estados de carga nas cadeias polipeptídicas, fazendo com que proteínas, de massa nominal elevada, apresentem valores de  $m/z$  detectáveis por este analisador de massas.



**Figura 31** – Confirmação da presença de TTR (0,2 mg/mL, ou 14,25  $\mu$ M de monómero) por espectrometria de massa e análise da presença de contaminantes. Os valores de  $m/z$  apresentados correspondem ao pico mais intenso. (A) Espectro obtido por *electrospray*, estando indicada a carga de cada molécula. O espectro desconvoluído apresenta os compostos contendo apenas uma carga. (B) Ampliação da série isotópica de  $m/z$  monoisotópico correspondente de 1003,129. (C) Espectro de fragmentação da série isotópica apresentada em (B). As correspondências dos fragmentos com o terminal carboxilo da TTR (série  $y$ ) são apresentadas.

A massa da TTR humana com um próton é 13753,898 Da, de acordo com a sequência disponível na base de dados UniProtKB. No entanto, a proteína recombinante utilizada não tem

---

uma sequência totalmente idêntica à proteína circulante em humanos, já que o cDNA introduzido codifica para a metionina no terminal amina (protegida de hidrólise dada a ligação covalente ao GST) e o local de hidrólise pela trombina codificado no plasmídeo pGEX implica a permanência de dois aminoácidos, glicina e serina, no terminal mesmo terminal da TTR. Deste modo, a  $m/z$  esperada para a TTR recombinante é 14028,991. De facto, o pico do espectro desconvoluído mais intenso apresenta uma massa monoisotópica de 14030,695 (desvio de 1,7 Da, Figura 31 A). Para confirmar a identidade desta molécula, aplicou-se uma estratégia, denominada *top-down*, onde se tira partido da fragmentação da proteína intacta já em fase gasosa, ao invés de em solução por digestão proteolítica utilizada em estratégias ditas de *bottom-up*. Para tal, a série isotópica de  $m/z$  monoisotópico 1003,129 (Figura 31 B), correspondente ao pico 14030,695 no espectro desconvoluído, foi isolada e fragmentada por CID (*collision-induced dissociation*, Figura 31 C). A presença de 8 fragmentos do terminal carboxilo da TTR humana confirmou a sua identidade.

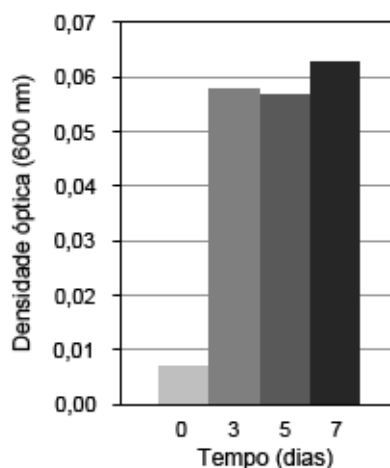
Apesar de se ter verificado a presença de TTR, existem vários outros picos no espectro original não correspondentes a esta proteína e que representam contaminações que podem advir de um processo de purificação não absolutamente eficiente, a uma actividade inespecífica da trombina ou mesmo à actividade proteolítica da própria TTR (Medeiros *et al*, 1996; Costa *et al*, 2008). A hipótese mais provável para justificar a presença dos vários contaminantes é a actividade catalítica da trombina em locais não específicos, já descrito na literatura (Rajalingam *et al*, 2008). Curiosamente, as únicas cadeias que se esperariam estarem presentes na amostra para além da TTR seriam o próprio protease, de bovino, e o *tag* Glutathione-S transferase, de *Schistosoma japonicum*, com massas moleculares de 35436,6 e 25498,6 Da, respectivamente (com base nas sequências da base de dados UniProtKB). No entanto, picos a valores de  $m/z$  da ordem destas proteínas não foram detectados.

### 2.2.3 Optimização das condições para agregação da TTR

Após a purificação da TTR, identificação e de se determinar que esta correspondia a 89,4% das proteínas em solução, procedeu-se à optimização das condições para indução da formação de fibras amilóides de TTR sem uma purificação adicional. Como mencionado anteriormente, a formação de fibras amilóides desta proteína é também altamente induzida a pH ácido (Colon *et al*, 1992; Pasquato *et al*, 2007). Para este efeito, utilizou-se o tampão acetato

de sódio (pKa 4,76) para incubar a TTR a pH 4,6 (descrito já por Pasquato *et al* como indutor da agregação da TTR) (Pasquato *et al*, 2007), à semelhança do realizado para a insulina.

Inicialmente, foi necessário confirmar que a TTR agregava nas condições seleccionadas. O processo de agregação foi induzindo incubando 10  $\mu$ M de TTR em tampão acetato de sódio 0,4 M, pH 4,6. A molaridade elevada do tampão visou eliminar efeitos do tampão fosfatos salino (PBS) utilizado aquando da purificação da TTR. A formação dos depósitos foi medida por dispersão de luz após 3, 5 e 7 dias de incubação (Figura 32).

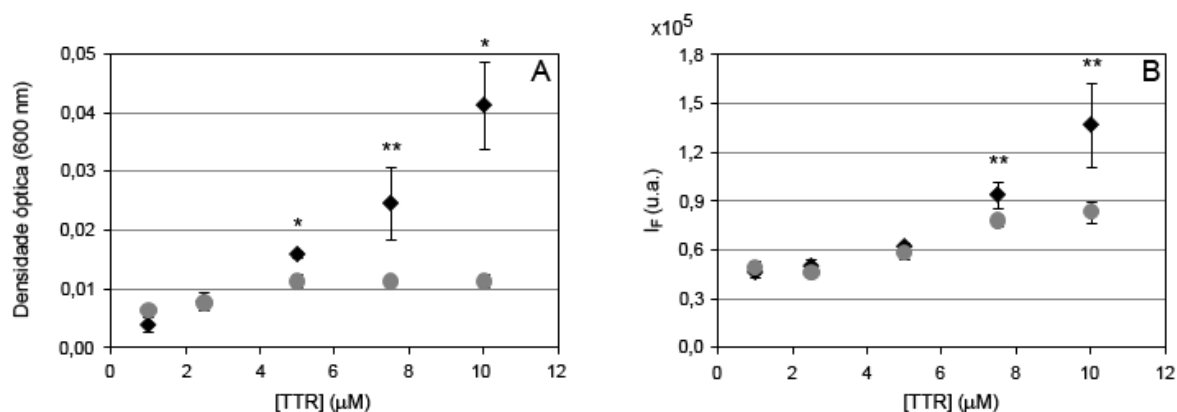


**Figura 32** – Influência do tempo de incubação na amiloidogénese da TTR

Já que o sinal de dispersão de luz era equiparável para todos os tempos de incubação testados, seleccionou-se um tempo de incubação de três dias para a realização dos ensaios subsequentes. Seguidamente, pretendeu-se aferir a concentração de TTR a utilizar para realizar todos os ensaios de agregação. Para tal, incubou-se TTR 10, 7,5, 5, 2,5 e 1  $\mu$ M no referido tampão a pH 4,6 durante 3 dias, a 37°C. A ocorrência de agregação foi determinada por medição da dispersão de luz (Figura 33 A), mas foi adicionalmente medida a intensidade de fluorescência da sonda tioflavina para aferir se os agregados formados seriam ordenados (fibras amilóides) ou desordenados (Figura 33 B), tal como realizado no caso da insulina.

A Figura 33 B sugere a formação de fibras amilóides de TTR a pH ácido (pH 4,6), como esperado. Nos ensaios de agregação da insulina, mostrou-se que o fibrinogénio exercia a sua função supressora da agregação nestas condições não fisiológicas. Deste modo, este resultado é bastante importante na medida em que sugere que é possível a co-incubação da TTR com fibrinogénio, avaliando a actividade *chaperone* deste sobre a TTR, que é o tema central deste

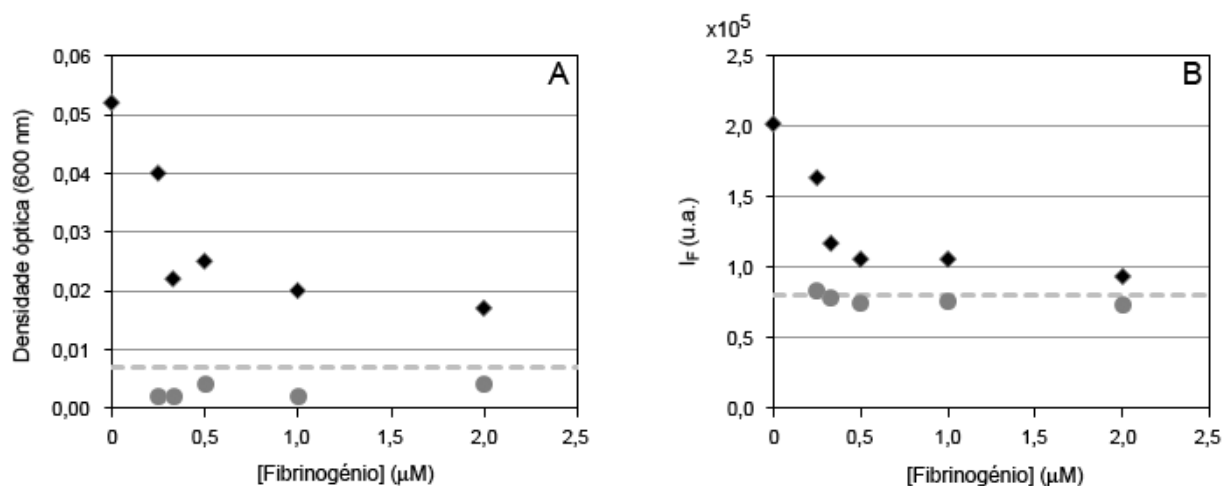
trabalho. A Figura 33 sugeriu ainda a necessidade de prosseguir os ensaios com a menor diluição testada (concentração 10  $\mu\text{M}$  da espécie monomérica), já que as restantes diluições apresentam um fraco sinal de fluorescência da sonda tioflavina T.



**Figura 33** – Formação de fibras amilóides de TTR. (◆) Incubação a pH 4,6 durante 3 dias a 37°C. (●) Controlo, sem incubação. (A) Dispersão de luz medida através da absorvência a 600nm. (B) Intensidade de fluorescência ( $I_f$ ) da sonda tioflavina T, com excitação a 440nm e medição da emissão a 485nm. u.a. unidades arbitrárias. Os resultados indicam o valor médio de 3 replicados. As barras de erro indicam o desvio padrão, que no caso da maioria dos controlos são menores que o respectivo ícone (●). \*\*\*Teste T de Student indica diferença entre amostras e controlos com 95% e 90% de confiança, respectivamente. \*p-value < 0,05, \*\*p-value < 0,10

#### 2.2.4 Agregação de TTR na presença de Fibrinogénio

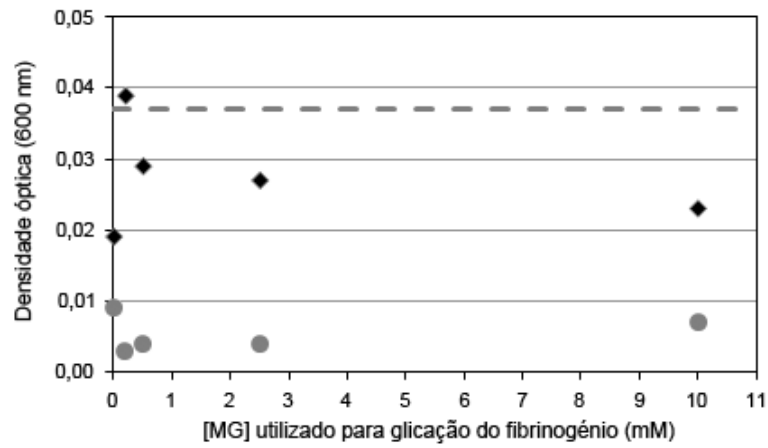
Este trabalho partiu do pressuposto que o fibrinogénio, como interactuante que é da TTR no meio extracelular (da Costa *et al*, 2011), exerceria a sua função de *chaperone* molecular sobre esta proteína. Na sequência desta afirmação, realizaram-se ensaios de agregação da TTR na presença de fibrinogénio, de forma semelhante à realizada para a insulina. As proporções molares TTR:fibrinogénio utilizadas nestes ensaios foram 5:1, 10:1, 20:1, 30:1 e 40:1 considerando a forma monomérica desta proteína, ou 1,25:1, 2,5:1, 5:1, 7,5:1 ou 10:1 se considerarmos a formação do tetrâmero (Figura 34). Observou-se que o fibrinogénio suprime de facto a formação de fibras amilóides de TTR não mutada, sendo que esta actividade é mais intensa a partir dos 0,5  $\mu\text{M}$  de fibrinogénio (razão molar de 1/20 com a TTR monomérica ou 1/5 com o tetrâmero).



**Figura 34** – Efeito do fibrinogénio na agregação da TTR (10 µM de monómero), após incubação a pH 4,6, 37°C durante 3 dias. (♦) TTR na presença de fibrinogénio; (●) apenas fibrinogénio. (---) apenas TTR, não incubada. (A) Absorvência a 600nm, (B) Intensidade de fluorescência ( $I_f$ ) da sonda tioflavina T. u.a., unidades arbitrárias.

### 2.2.5 Glicação e perda da função de chaperone do Fibrinogénio

Finalmente, também para os ensaios de agregação com TTR se testou se a glicação do fibrinogénio suprime esta actividade estabilizadora, tal como realizado para o caso da insulina. A proporção insulina:fibrinogénio utilizada foi 20:1, já que a inibição da formação de fibras era praticamente completa. Esta proporção corresponde a uma concentração de 0,5 µM de fibrinogénio, para os 10 µM de TTR utilizados. O fibrinogénio usado foi glicado com 0,2, 0,5, 2,5 e 10 mM de metilglioxal ao longo de 4 dias. Os dados da Figura 35 são inconclusivos, na medida em que para o fibrinogénio glicado com uma concentração de metilglioxal de 0,5 mM ou superior são observados depósitos proteicos macroscópicos, facilmente observáveis a olho nu. Curiosamente, este efeito não foi observado no caso da insulina nem na ausência de TTR. Os resultados aparentam mostrar que a agregação de TTR diminui com o estado de glicação do fibrinogénio, mas tal facto deve-se à ausência de depósitos macromoleculares no percurso óptico do espectrofotómetro. Apesar disto, na Figura 35 observa-se uma completa formação de fibras amilóides de TTR na presença de fibrinogénio glicado com 0,2 mM de metilglioxal, não tendo sido observados depósitos proteicos. Assumiu-se assim que os efeitos de co-agregação ainda não se faziam sentir para este estado de glicação, indicando uma completa supressão da função de chaperone do fibrinogénio no menor estado de glicação testado.



**Figura 35** – Efeito da glicação na actividade de *chaperone* do fibrinogénio em condições propícias à agregação da TTR. (◆) TTR com fibrinogénio, não glicado ou glicado com metilglioxal 0,2, 0,5, 2,5 ou 10 mM; (●) apenas fibrinogénio; (--) apenas TTR. Incubação a 37°C, pH 4,6 durante 3 dias. O sinal indica absorvência a 600nm. MG, metilglioxal.

# DISCUSSÃO



A existência de factores não genéticos envolvidos na PAF foi sugerida logo em 1952 aquando da descrição da doença pelo médico Corino de Andrade (Andrade, 1952) e tem sido referida em diversos estudos epidemiológicos, em especial quando se trata da comparação dos sintomas entre gémeos idênticos (Munar-Ques *et al*, 1999; Saporta *et al*, 2009; da Costa *et al*, 2011). Tentativas de justificar estas observações residiram usualmente na crescente amiloidogenicidade da TTR perante certos factores ambientais (Sun *et al*, 2003; Zhang *et al*, 2003; Takaoka *et al*, 2004; Gomes *et al*, 2005), mas muito recentemente foi descrito um possível envolvimento dos mecanismos de defesa celular extracelular nesta doença, com a glicação do fibrinogénio a adoptar um papel central (da Costa *et al*, 2011). A observação de que o fibrinogénio tem um efeito supressor na formação de fibras amilóides de TTR vem complementar o modelo estabelecido *in vitro* por Quintas *et al*, inicialmente descrito para justificar a crescente amiloidogenicidade da TTR quando mutada (Quintas *et al*, 2001): É possível que os factores não genéticos e, concretamente, o fibrinogénio, possam deslocar o equilíbrio com favorecimento da formação de espécies não amiloidogénicas (Figura 36). Pode ainda haver uma estabilização da TTR na sua forma tetramérica, como se provou ocorrer no caso da RBP (Hyung *et al*, 2010), com menor formação de monómeros de estrutura não nativa. Por fim, é ainda possível que o fibrinogénio actue na propagação de agregados, evitando a formação de fibras amilóides. A conjugação de mais do que um destes processos é também possível.

Em condições normais, o ser humano apresenta no plasma uma concentração de fibrinogénio de aproximadamente 3 g/L, correspondente a 9  $\mu$ M (Herrick *et al*, 1999), mas pode oscilar entre 2 e 4 g/L (Dudek *et al*, 2010). Por sua vez, a concentração da TTR pode variar entre 0,15 e 0,3 g/L (aproximadamente 3 a 6  $\mu$ M de tetrâmero, ou 12 a 24  $\mu$ M de monómero) (Buxbaum *et al*, 2009). Estes dados implicam que a concentração molar da TTR monomérica seja, em termos médios, o dobro da concentração do fibrinogénio. Nos ensaios *in vitro* aqui realizados, notou-se actividade máxima de supressão da agregação logo para as proporções fibrinogénio:proteína amiloidogénica (tanto insulina como TTR monomérica) 1:20. Estes factos indicam uma elevada probabilidade que o fibrinogénio tenha um efeito preponderante como estabilizador da TTR na PAF.



do organismo de contornar a diminuição desta actividade, embora se revele infrutífera a longo prazo.

Para melhor compreender alterações funcionais no fibrinogénio, considerou-se a caracterização dos locais modificados de extrema relevância, pelo que nesta dissertação foi desenvolvido um método que permite o mapeamento bastante completo destes locais através de espectrometria de massa. Neste estudo, foi necessário ter em conta 1) a cobertura de sequência que o método permite atingir, 2) o papel das diferentes condições utilizadas no mapeamento dos locais modificados e 3) a relevância biológica da modificação destes locais.

Em primeiro lugar, os valores de cobertura de sequência apresentados para as três cadeias de fibrinogénio são os mais elevados obtidos até hoje em MALDI-MS. De facto, o uso de ambos os proteases tripsina e endoproteínase Glu-C, das resinas POROS R2 e OLIGO R3 aliadas a uma eluição sequencial e das matrizes CHCA e DHB permitiu transitar de uma cobertura de sequência média de 33,0% para 82,0% no caso do fibrinogénio. Outros métodos eficazes de aumento da cobertura de sequência foram já utilizados em MALDI-MS (Gatlin *et al*, 2000; Cozzolino *et al*, 2001; Wa *et al*, 2006; Boddi *et al*, 2009), mas todos dependem de digestão em solução, onde é necessário aplicar grandes quantidades de proteína e processos de separação exaustivos. A título de exemplo, neste trabalho utilizou-se 8 µg de fibrinogénio (47,06 pmol) para cada digestão ao invés dos 75 µg (1,13 nmol) de albumina do soro humano utilizados em Wa *et al* (Wa *et al*, 2006), o que traz enormes vantagens para o estudo de modificações pós-traducionais *in vivo*, já que o acesso a material biológico é normalmente limitado.

A combinação de condições permitiu, claramente, um mapeamento mais completo dos locais de glicação, como se pôde observar pela análise das Tabela 6, Tabela 7 e Tabela 8. Para além de aumentar a cobertura de sequência de forma dependente das propriedades intrínsecas dos péptidos nas cadeias não glicadas, o uso deste conjunto de condições permitiu contornar a alteração das propriedades dos péptidos (maioritariamente a carga) aquando da glicação. Esta afirmação é suportada pela detecção de péptidos modificados em condições diferentes do péptido correspondente não modificado. Por alterações de carga, refira-se a presença de um grupo amina secundária na argpirimidina e MG-HI ao invés do grupo amina primária da arginina e a introdução de um grupo funcional ácido carboxílico no aducto CEL.

Já que a cobertura de sequência é um dos problemas centrais no mapeamento de modificações pós-traducionais, sugere-se uma abordagem semelhante à aqui desenvolvida para

---

o mapeamento de locais modificados, independentemente da modificação em foco, mas em especial da glicação.

No que toca aos aminoácidos glicosilados detectados, neste trabalho foram identificadas 19 lisinas e 41 argininas contendo aductos de metilglicoxal nas três cadeias, de entre 104 e 77 possíveis, respectivamente. Dada a natureza da técnica, não se pode negar a glicação de outros resíduos (à parte dos identificados) nas cadeias do fibrinogénio, já que a cobertura de sequência não foi completa. Para além disso, em espectrometria de massa é impossível confirmar a ausência de péptidos, que poderão não ser detectados apesar de estarem presentes. Este efeito é uma forte limitação do método aqui utilizado.

Confirmou-se adicionalmente que o processo de glicação é também algo heterogéneo *in vitro*, tanto no local modificado como no tipo de aducto, já que em amostras glicosiladas foi possível identificar péptidos modificados e, em simultâneo, o correspondente não modificado ou contendo outro aducto (Figura 22 e Figura 23). Tal heterogeneidade havia sido detectada anteriormente pelo nosso grupo (Gomes *et al*, 2008), apesar da glicação estar descrita como específica de local (Baynes *et al*, 1989; Walton *et al*, 1991). A glicação dar-se-á assim de forma mais proeminente em certos resíduos enquanto que é bastante desfavorecida noutros. As implicações desta heterogeneidade são que poderão existir, após glicação com 0,2 mM de metilglicoxal, moléculas de fibrinogénio em que o centro responsável pela actividade de *chaperone* molecular se encontra modificado, mas outras em que tal não ocorreu. Este facto justifica a observação de um efeito supressor da agregação de insulina co-incubada com o fibrinogénio menos glicosilado (Figura 28). Esta actividade é então perdida apenas para fibrinogénio mais glicosilado, onde se supõe que o centro de interacção esteja modificado. A curva logarítmica observada na Figura 28 A poderá ser uma consequência da diminuição das moléculas de fibrinogénio com o centro de interacção livre com o aumento da concentração de metilglicoxal.

### **Conclusão e perspectivas futuras**

Nesta tese são discutidos desenvolvimentos importantes que podem justificar a progressão da Polineuropatia Amiloidótica Familiar, podendo vir a ser constituídos alvos de novos fármacos. Existe assim toda uma série de aspectos que devem ser explorados no futuro. Em primeiro lugar, deve ser esclarecido o mecanismo pelo qual o fibrinogénio previne a agregação da TTR, e provar a validade desta observação com as variantes amiloidogénicas da TTR, tanto *in vivo* como com estudos *in vivo* (isto é, com recurso a modelos animais). Quanto à

glicação acrescida do fibrinogénio nos pacientes desta doença, é necessário também conhecer os mecanismos que levam a que esta reacção não enzimática ocorra de forma mais proeminente. A determinação do local de interacção do fibrinogénio com a TTR traria também importantes esclarecimentos acerca da perda da função de *chaperone* do fibrinogénio nesta doença, cruzando-se a informação com o mapeamento dos locais de glicação aqui realizado. Por último, o mapeamento dos locais de glicação *in vivo* nos pacientes traria informações vitais no estudo da progressão desta doença com um esclarecimento definitivo da hipótese central desta tese.



# REFERÊNCIAS



- Ahmed, N., Argirov, O.K., Minhas, H.S., Cordeiro, C.A. and Thornalley, P.J. (2002). Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to Nepsilon-carboxymethyl-lysine- and Nepsilon-(1-carboxyethyl)lysine-modified albumin. *Biochem J*, **364** (Pt 1): 1-14.
- Ahmed, N., Ahmed, U., Thornalley, P.J., Hager, K., Fleischer, G. and Munch, G. (2005a). Protein glycation, oxidation and nitration adduct residues and free adducts of cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease and link to cognitive impairment. *J Neurochem*, **92** (2): 255-263.
- Ahmed, N., Dobler, D., Dean, M. and Thornalley, P.J. (2005b). Peptide mapping identifies hotspot site of modification in human serum albumin by methylglyoxal involved in ligand binding and esterase activity. *J Biol Chem*, **280** (7): 5724-5732.
- Akassoglou, K. and Strickland, S. (2002a). Nervous system pathology: the fibrin perspective. *Biol Chem*, **383** (1): 37-45.
- Akassoglou, K., Yu, W.M., Akpınar, P. and Strickland, S. (2002b). Fibrin inhibits peripheral nerve remyelination by regulating Schwann cell differentiation. *Neuron*, **33** (6): 861-875.
- Ali, Y.O., Kitay, B.M. and Zhai, R.G. (2010). Dealing with misfolded proteins: examining the neuroprotective role of molecular chaperones in neurodegeneration. *Molecules*, **15** (10): 6859-6887.
- Andersson, R. (1976). Familial amyloidosis with polyneuropathy. A clinical study based on patients living in northern Sweden. *Acta Med Scand Suppl*, **590**: 1-64.
- Andrade, C. (1952). A peculiar form of peripheral neuropathy; familiar atypical generalized amyloidosis with special involvement of the peripheral nerves. *Brain*, **75** (3): 408-427.
- Arai, M., Yuzawa, H., Nohara, I., Ohnishi, T., Obata, N., Iwayama, Y., Haga, S., Toyota, T., Ujike, H., Ichikawa, T., Nishida, A., Tanaka, Y., Furukawa, A., Aikawa, Y., Kuroda, O., Niizato, K., Izawa, R., Nakamura, K., Mori, N., Matsuzawa, D., Hashimoto, K., Iyo, M., Sora, I., Matsushita, M., Okazaki, Y., Yoshikawa, T., Miyata, T. and Itokawa, M. (2010). Enhanced carbonyl stress in a subpopulation of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*, **67** (6): 589-597.
- Asselta, R., Duga, S. and Tenchini, M.L. (2006). The molecular basis of quantitative fibrinogen disorders. *J Thromb Haemost*, **4** (10): 2115-2129.
- Banting, F.G. (1926). An Address on Diabetes and Insulin: Being The Nobel Lecture Delivered at Stockholm on September 15th, 1925. *Can Med Assoc J*, **16** (3): 221-232.
- Baynes, J.W., Watkins, N.G., Fisher, C.I., Hull, C.J., Patrick, J.S., Ahmed, M.U., Dunn, J.A. and Thorpe, S.R. (1989). The Maillard reaction in aging, diabetes and nutrition. J. W. Baynes and V. M. Monnier. New York, Alan R. Liss: 43-67.
- Berthold, H., Frorath, B., Scanarini, M., Abney, C.C., Ernst, B. and Northemann, W. (1992). Plasmid pGEX-5T: An alternative system for expression and purification of recombinant proteins. *Biotechnol Lett*, **14** (4): 245-250.

- 
- Bhak, G., Choe, Y.J. and Paik, S.R. (2009). Mechanism of amyloidogenesis: nucleation-dependent fibrillation versus double-concerted fibrillation. *BMB Rep*, **42** (9): 541-551.
- Blake, C.C., Geisow, M.J., Oatley, S.J., Rerat, B. and Rerat, C. (1978). Structure of prealbumin: secondary, tertiary and quaternary interactions determined by Fourier refinement at 1.8 Å. *J Mol Biol*, **121** (3): 339-356.
- Boddi, K., Takatsy, A., Szabo, S., Marko, L., Mark, L., Wittmann, I., Ohmacht, R., Montsko, G., Vallant, R.M., Ringer, T., Bakry, R., Huck, C.W., Bonn, G.K. and Szabo, Z. (2009). Use of fullerene-, octadecyl-, and triacontyl silica for solid phase extraction of tryptic peptides obtained from unmodified and in vitro glycosylated human serum albumin and fibrinogen. *J Sep Sci*, **32** (2): 295-308.
- Bonaiti, B., Olsson, M., Hellman, U., Suhr, O., Bonaiti-Pellie, C. and Plante-Bordeneuve, V. (2010). TTR familial amyloid polyneuropathy: does a mitochondrial polymorphism entirely explain the parent-of-origin difference in penetrance? *Eur J Hum Genet*, **18** (8): 948-952.
- Bourajaj, M., Stehouwer, C.D., van Hinsbergh, V.W. and Schalkwijk, C.G. (2003). Role of methylglyoxal adducts in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *Biochem Soc Trans*, **31** (Pt 6): 1400-1402.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**: 248-254.
- Brock, J.W., Cotham, W.E., Thorpe, S.R., Baynes, J.W. and Ames, J.M. (2007). Detection and identification of arginine modifications on methylglyoxal-modified ribonuclease by mass spectrometric analysis. *J Mass Spectrom*, **42** (1): 89-100.
- Buxbaum, J.N. and Reixach, N. (2009). Transthyretin: the servant of many masters. *Cell Mol Life Sci*, **66** (19): 3095-3101.
- Canas, B., Lopez-Ferrer, D., Ramos-Fernandez, A., Camafeita, E. and Calvo, E. (2006). Mass spectrometry technologies for proteomics. *Brief Funct Genomic Proteomic*, **4** (4): 295-320.
- Choi, J.W. and Lee, S.Y. (1997). Enhanced expression of bovine growth hormone gene by different culture conditions in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett*, **19** (8): 735-739.
- Choudhary, G., Wu, S.L., Shieh, P. and Hancock, W.S. (2003). Multiple enzymatic digestion for enhanced sequence coverage of proteins in complex proteomic mixtures using capillary LC with ion trap MS/MS. *J Proteome Res*, **2** (1): 59-67.
- Coelho, T., Sousa, A., Lourenco, E. and Ramalheira, J. (1994). A study of 159 Portuguese patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) whose parents were both unaffected. *J Med Genet*, **31** (4): 293-299.
- Coimbra, A. and Andrade, C. (1971). Familial amyloid polyneuropathy: an electron microscope study of the peripheral nerve in five cases. I. Interstitial changes. *Brain*, **94** (2): 199-206.
- Coker, A.R., Purvis, A., Baker, D., Pepys, M.B. and Wood, S.P. (2000). Molecular chaperone properties of serum amyloid P component. *FEBS Lett*, **473** (2): 199-202.
-

- 
- Colon, W. and Kelly, J.W. (1992). Partial denaturation of transthyretin is sufficient for amyloid fibril formation in vitro. *Biochemistry*, **31** (36): 8654-8660.
- Connors, L.H., Richardson, A.M., Theberge, R. and Costello, C.E. (2000). Tabulation of transthyretin (TTR) variants as of 1/1/2000. *Amyloid*, **7** (1): 54-69.
- Costa, P.P., Figueira, A.S. and Bravo, F.R. (1978). Amyloid fibril protein related to prealbumin in familial amyloidotic polyneuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **75** (9): 4499-4503.
- Costa, R., Ferreira-da-Silva, F., Saraiva, M.J. and Cardoso, I. (2008). Transthyretin protects against A-beta peptide toxicity by proteolytic cleavage of the peptide: a mechanism sensitive to the Kunitz protease inhibitor. *PLoS One*, **3** (8): e2899.
- Coutinho, P., Martins da Silva, A., Lopes Lima, J. and Resende Barbosa, A. (1980). Forty years of experience with type I amyloid neuropathy: review of 483 cases. *Amyloid and Amyloidosis*. G. G. Glenner, P. P. Costa and A. F. de Freitas. Amsterdam, Excerpta Medica: 88-98.
- Cozzolino, R., Di Giorgi, S., Fisichella, S., Garozzo, D., Lafiandra, D. and Palermo, A. (2001). Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric peptide mapping of high molecular weight glutenin subunits 1Bx7 and 1Dy10 in Cheyenne cultivar. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **15** (10): 778-787.
- da Costa, G., Gomes, R.A., Guerreiro, A., Mateus, E., Monteiro, E., Barroso, E., Coelho, A.V., Ponces Freire, A. and Cordeiro, C. (2011). Beyond genetic factors in familial amyloidotic polyneuropathy: Protein glycation and fibrinogen's chaperone activity loss. *PLoS One*: in press.
- de Boer, H.A., Comstock, L.J. and Vasser, M. (1983). The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80** (1): 21-25.
- Dobson, C.M. (1999). Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem Sci*, **24** (9): 329-332.
- Dolhofer, R., Siess, E.A. and Wieland, O.H. (1985). Nonenzymatic glycation of immunoglobulins leads to an impairment of immunoreactivity. *Biol Chem Hoppe Seyler*, **366** (4): 361-366.
- Drury, D.R. and McMaster, P.D. (1929). The liver as the source of fibrinogen. *J Exp Med*, **50** (5): 569-578.
- Dudek, M.M., Lindahl, T.L. and Killard, A.J. (2010). Development of a point of care lateral flow device for measuring human plasma fibrinogen. *Anal Chem*, **82** (5): 2029-2035.
- Dyukov, M.I., Grudinina, M.P., Sirotkin, A.K. and Kiselev, O.I. (2008). Insulin fibrillogenesis in vitro. *Dokl Biochem Biophys*, **419**: 79-81.
- Esposito, L., Pedone, C. and Vitagliano, L. (2006). Molecular dynamics analyses of cross-beta-spine steric zipper models: beta-sheet twisting and aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103** (31): 11533-11538.
-

- 
- Evans, C.G., Wisen, S. and Gestwicki, J.E. (2006). Heat shock proteins 70 and 90 inhibit early stages of amyloid beta-(1-42) aggregation in vitro. *J Biol Chem*, **281** (44): 33182-33191.
- Falvo, M.R., Gorkun, O.V. and Lord, S.T. (2010). The molecular origins of the mechanical properties of fibrin. *Biophys Chem*, **152** (1-3): 15-20.
- Fandrich, M. (2007). On the structural definition of amyloid fibrils and other polypeptide aggregates. *Cell Mol Life Sci*, **64** (16): 2066-2078.
- Fenn, J.B. (2003). Electrospray wings for molecular elephants (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*, **42** (33): 3871-3894.
- Ferguson, N., Berriman, J., Petrovich, M., Sharpe, T.D., Finch, J.T. and Fersht, A.R. (2003). Rapid amyloid fiber formation from the fast-folding WW domain FBP28. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100** (17): 9814-9819.
- Fink, A.L. (1998). Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Fold Des*, **3** (1): R9-23.
- Fleming, C.E., Saraiva, M.J. and Sousa, M.M. (2007). Transthyretin enhances nerve regeneration. *J Neurochem*, **103** (2): 831-839.
- Fleming, C.E., Nunes, A.F. and Sousa, M.M. (2009). Transthyretin: more than meets the eye. *Prog Neurobiol*, **89** (3): 266-276.
- Fleming, T.H., Humpert, P.M., Nawroth, P.P. and Bierhaus, A. (2011). Reactive Metabolites and AGE/RAGE-Mediated Cellular Dysfunction Affect the Aging Process - A Mini-Review. *Gerontology*, **57** (5): 435-443.
- Fujimoto, S., Kawakami, N. and Ohara, A. (1995). Nonenzymatic glycation of transferrin: decrease of iron-binding capacity and increase of oxygen radical production. *Biol Pharm Bull*, **18** (3): 396-400.
- Gatlin, C.L., Eng, J.K., Cross, S.T., Detter, J.C. and Yates, J.R., 3rd (2000). Automated identification of amino acid sequence variations in proteins by HPLC/microspray tandem mass spectrometry. *Anal Chem*, **72** (4): 757-763.
- Gomes, R., Sousa Silva, M., Quintas, A., Cordeiro, C., Freire, A., Pereira, P., Martins, A., Monteiro, E., Barroso, E. and Ponces Freire, A. (2005). Argpyrimidine, a methylglyoxal-derived advanced glycation end-product in familial amyloidotic polyneuropathy. *Biochem J*, **385** (Pt 2): 339-345.
- Gomes, R.A., Oliveira, L.M., Silva, M., Ascenso, C., Quintas, A., Costa, G., Coelho, A.V., Sousa Silva, M., Ferreira, A.E., Ponces Freire, A. and Cordeiro, C. (2008). Protein glycation in vivo: functional and structural effects on yeast enolase. *Biochem J*, **416** (3): 317-326.
- Guimarães, A., Monteiro, L. and Coutinho, P. (1980). Pathology of the autonomic nervous system in Andrade type of familial amyloidotic polyneuropathy. Amyloid and Amyloidosis. G. G. Glenner, P. P. Costa and A. F. de Freitas. Amsterdam, Excerpta Medica: 139-146.
-

- 
- Gupta, N., Hixson, K.K., Culley, D.E., Smith, R.D. and Pevzner, P.A. (2010). Analyzing protease specificity and detecting in vivo proteolytic events using tandem mass spectrometry. *Proteomics*, **10** (15): 2833-2844.
- Haas, J., Vohringer-Martinez, E., Bogehold, A., Matthes, D., Hensen, U., Pelah, A., Abel, B. and Grubmuller, H. (2009). Primary steps of pH-dependent insulin aggregation kinetics are governed by conformational flexibility. *Chembiochem*, **10** (11): 1816-1822.
- Hassan, N., Ruso, J.M. and Somasundaran, P. (2011). Mechanisms of fibrinogen-acebutolol interactions: Insights from DSC, CD and LS. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **82** (2): 581-587.
- Hayes, P.C., Wolf, C.R. and Hayes, J.D. (1989). Blotting techniques for the study of DNA, RNA, and proteins. *BMJ*, **299** (6705): 965-968.
- Heck, A.J. (2008). Native mass spectrometry: a bridge between interactomics and structural biology. *Nat Methods*, **5** (11): 927-933.
- Heinemann, L. (2010). Insulin assay standardization: leading to measures of insulin sensitivity and secretion for practical clinical care: response to Staten et al. *Diabetes Care*, **33** (6): e83; author reply e84.
- Henderson, M.J. (1964). The uptake of glucose into cells and the role of insulin in glucose transport. *Can J Biochem Physiol*, **42**: 933-944.
- Henschen, A., Lottspeich, F., Southan, C. and Topfer-Petersen, E. (1980). Human fibrinogen: sequence, sulfur bridges, glycosylation and some structural variants. Protides of the biological fluids, proceedings of the 28th colloquium. H. Peeters. Oxford, Pergamon Press: 51-56.
- Herrick, S., Blanc-Brude, O., Gray, A. and Laurent, G. (1999). Fibrinogen. *Int J Biochem Cell Biol*, **31** (7): 741-746.
- Hoffmann, E. and Stroobant, V. (2007). Mass Spectrometry: Principles and Applications. Chichester, John Wiley & Sons.
- Houmard, J. and Drapeau, G.R. (1972). Staphylococcal protease: a proteolytic enzyme specific for glutamoyl bonds. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **69** (12): 3506-3509.
- Humphreys, D.T., Carver, J.A., Easterbrook-Smith, S.B. and Wilson, M.R. (1999). Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins. *J Biol Chem*, **274** (11): 6875-6881.
- Hyung, S.J., Deroo, S. and Robinson, C.V. (2010). Retinol and retinol-binding protein stabilize transthyretin via formation of retinol transport complex. *ACS Chem Biol*, **5** (12): 1137-1146.
- Inoue, Y. and Kimura, A. (1995). Methylglyoxal and regulation of its metabolism in microorganisms. *Adv Microb Physiol*, **37**: 177-227.
- Jacobson, D.R., McFarlin, D.E., Kane, I. and Buxbaum, J.N. (1992). Transthyretin Pro55, a variant associated with early-onset, aggressive, diffuse amyloidosis with cardiac and neurologic involvement. *Hum Genet*, **89** (3): 353-356.
-

- 
- Jaleel, A., Halvatsiotis, P., Williamson, B., Juhasz, P., Martin, S. and Nair, K.S. (2005). Identification of Amadori-modified plasma proteins in type 2 diabetes and the effect of short-term intensive insulin treatment. *Diabetes Care*, **28** (3): 645-652.
- Kant, J.A., Lord, S.T. and Crabtree, G.R. (1983). Partial mRNA sequences for human A alpha, B beta, and gamma fibrinogen chains: evolutionary and functional implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80** (13): 3953-3957.
- Koike, H., Ando, Y., Ueda, M., Kawagashira, Y., Iijima, M., Fujitake, J., Hayashi, M., Yamamoto, M., Mukai, E., Nakamura, T., Katsuno, M., Hattori, N. and Sobue, G. (2009). Distinct characteristics of amyloid deposits in early- and late-onset transthyretin Val30Met familial amyloid polyneuropathy. *J Neurol Sci*, **287** (1-2): 178-184.
- Kollman, J.M., Pandi, L., Sawaya, M.R., Riley, M. and Doolittle, R.F. (2009). Crystal structure of human fibrinogen. *Biochemistry*, **48** (18): 3877-3886.
- Kopito, R.R. (2000). Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol*, **10** (12): 524-530.
- Kratzer, R., Eckerskorn, C., Karas, M. and Lottspeich, F. (1998). Suppression effects in enzymatic peptide ladder sequencing using ultraviolet - matrix assisted laser desorption/ionization - mass spectrometry. *Electrophoresis*, **19** (11): 1910-1919.
- Krause, E., Wenschuh, H. and Jungblut, P.R. (1999). The dominance of arginine-containing peptides in MALDI-derived tryptic mass fingerprints of proteins. *Anal Chem*, **71** (19): 4160-4165.
- Kricka, L.J. (1991). Chemiluminescent and bioluminescent techniques. *Clin Chem*, **37** (9): 1472-1481.
- Kruger, N.J. (1994). The Bradford method for protein quantitation. *Methods Mol Biol*, **32**: 9-15.
- Kukrer, B., Filipe, V., van Duijn, E., Kasper, P.T., Vreeken, R.J., Heck, A.J. and Jiskoot, W. (2010). Mass spectrometric analysis of intact human monoclonal antibody aggregates fractionated by size-exclusion chromatography. *Pharm Res*, **27** (10): 2197-2204.
- Kurz, A., Rabbani, N., Walter, M., Bonin, M., Thornalley, P., Auburger, G. and Gisbert, S. (2011). Alpha-synuclein deficiency leads to increased glyoxalase I expression and glycation stress. *Cell Mol Life Sci*, **68** (4): 721-733.
- Kyle, R.A., Gertz, M.A. and Linke, R.P. (1992). Amyloid localized to tenosynovium at carpal tunnel release. Immunohistochemical identification of amyloid type. *Am J Clin Pathol*, **97** (2): 250-253.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- Lakowicz, J.R. (2006). Principles of Fluorescence Spectroscopy. New York, Springer.
-

- 
- Lederer, M.O. and Klaiber, R.G. (1999). Cross-linking of proteins by Maillard processes: characterization and detection of lysine-arginine cross-links derived from glyoxal and methylglyoxal. *Bioorg Med Chem*, **7** (11): 2499-2507.
- LeVine, H., 3rd (1999). Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. *Methods Enzymol*, **309**: 274-284.
- Lovric, J. (2011). Introducing Proteomics: From concepts to sample separation, mass spectrometry and data analysis. Chichester, John Wiley & Sons.
- Lundberg, E., Olofsson, A., Westermark, G.T. and Sauer-Eriksson, A.E. (2009). Stability and fibril formation properties of human and fish transthyretin, and of the Escherichia coli transthyretin-related protein. *FEBS J*, **276** (7): 1999-2011.
- Luthra, M. and Balasubramanian, D. (1993). Nonenzymatic glycation alters protein structure and stability. A study of two eye lens crystallins. *J Biol Chem*, **268** (24): 18119-18127.
- Medeiros, M.S. and Turner, A.J. (1996). Metabolism and functions of neuropeptide Y. *Neurochem Res*, **21** (9): 1125-1132.
- Monteiro, F.A., Cardoso, I., Sousa, M.M. and Saraiva, M.J. (2006). In vitro inhibition of transthyretin aggregate-induced cytotoxicity by full and peptide derived forms of the soluble receptor for advanced glycation end products (RAGE). *FEBS Lett*, **580** (14): 3451-3456.
- Munar-Ques, M., Pedrosa, J.L., Coelho, T., Gusmao, L., Seruca, R., Amorim, A. and Sequeiros, J. (1999). Two pairs of proven monozygotic twins discordant for familial amyloid neuropathy (FAP) TTR Met 30. *J Med Genet*, **36** (8): 629-632.
- Naiki, H., Higuchi, K., Hosokawa, M. and Takeda, T. (1989). Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1. *Anal Biochem*, **177** (2): 244-249.
- Naylor, H.M. and Newcomer, M.E. (1999). The structure of human retinol-binding protein (RBP) with its carrier protein transthyretin reveals an interaction with the carboxy terminus of RBP. *Biochemistry*, **38** (9): 2647-2653.
- Niwa, T. (2006). Mass spectrometry for the study of protein glycation in disease. *Mass Spectrom Rev*, **25** (5): 713-723.
- Nyhlin, N., Ando, Y., Nagai, R., Suhr, O., El Sahly, M., Terazaki, H., Yamashita, T., Ando, M. and Horiuchi, S. (2000). Advanced glycation end product in familial amyloidotic polyneuropathy (FAP). *J Intern Med*, **247** (4): 485-492.
- Olsson, M., Norgren, N., Obayashi, K., Plante-Bordeneuve, V., Suhr, O.B., Cederquist, K. and Jonasson, J. (2010). A possible role for miRNA silencing in disease phenotype variation in Swedish transthyretin V30M carriers. *BMC Med Genet*, **11**: 130.
- Papayannopoulos, I.A. (1995). The interpretation of collision-induced dissociation tandem mass spectra of peptides. *Mass Spectrom Rev*, **14** (1): 49-73.
-

- 
- Pasquato, N., Berni, R., Folli, C., Alfieri, B., Cendron, L. and Zanotti, G. (2007). Acidic pH-induced conformational changes in amyloidogenic mutant transthyretin. *J Mol Biol*, **366** (3): 711-719.
- Phillips, D.R., Charo, I.F., Parise, L.V. and Fitzgerald, L.A. (1988). The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood*, **71** (4): 831-843.
- Pieters, M., Covic, N., van der Westhuizen, F.H., Nagaswami, C., Baras, Y., Toit Loots, D., Jerling, J.C., Elgar, D., Edmondson, K.S., van Zyl, D.G., Rheeder, P. and Weisel, J.W. (2008). Glycaemic control improves fibrin network characteristics in type 2 diabetes - a purified fibrinogen model. *Thromb Haemost*, **99** (4): 691-700.
- Pitkanen, P., Westermark, P. and Cornwell, G.G., 3rd (1984). Senile systemic amyloidosis. *Am J Pathol*, **117** (3): 391-399.
- Poon, S., Treweek, T.M., Wilson, M.R., Easterbrook-Smith, S.B. and Carver, J.A. (2002). Clusterin is an extracellular chaperone that specifically interacts with slowly aggregating proteins on their off-folding pathway. *FEBS Lett*, **513** (2-3): 259-266.
- Price, N. and Setevens, L. (2000). Fundamentals of Enzymology: The Cell and Molecular Biology of Catalytic Proteins. Oxford, Oxford University Press.
- Priego Capote, F. and Sanchez, J.C. (2009). Strategies for proteomic analysis of non-enzymatically glycosylated proteins. *Mass Spectrom Rev*, **28** (1): 135-146.
- Quintas, A., Saraiva, M.J. and Brito, R.M. (1999). The tetrameric protein transthyretin dissociates to a non-native monomer in solution. A novel model for amyloidogenesis. *J Biol Chem*, **274** (46): 32943-32949.
- Quintas, A., Vaz, D.C., Cardoso, I., Saraiva, M.J. and Brito, R.M. (2001). Tetramer dissociation and monomer partial unfolding precedes protofibril formation in amyloidogenic transthyretin variants. *J Biol Chem*, **276** (29): 27207-27213.
- Rabbani, N. and Thornalley, P.J. (2010). Glycation research in amino acids: a place to call home. *Amino Acids*.
- Rajalingam, D., Kathir, K.M., Ananthamurthy, K., Adams, P.D. and Kumar, T.K. (2008). A method for the prevention of thrombin-induced degradation of recombinant proteins. *Anal Biochem*, **375** (2): 361-363.
- Richard, J.P. (1993). Mechanism for the formation of methylglyoxal from triosephosphates. *Biochem Soc Trans*, **21** (2): 549-553.
- Rocken, C., Saeger, W. and Linke, R.P. (1994). Gastrointestinal amyloid deposits in old age. Report on 110 consecutive autopsical patients and 98 retrospective bioptic specimens. *Pathol Res Pract*, **190** (7): 641-649.
- Roepstorff, P. and Fohlman, J. (1984). Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom*, **11** (11): 601.
- Ryu, J.K., Davalos, D. and Akassoglou, K. (2009). Fibrinogen signal transduction in the nervous system. *J Thromb Haemost*, **7** (suppl 1): 151-154.
-

- 
- Sales Luís, M.L. (2006). Polineuropatia Amiloidótica Familiar do Tipo Português: do artigo original ao futuro. *Sinapse*, **6** (1, suppl 1): 40-160.
- Saporta, M.A., Plante-Bordeneuve, V., Misrahi, M. and Cruz, M.W. (2009). Discordant expression of familial amyloid polyneuropathy in monozygotic Brazilian twins. *Amyloid*, **16** (1): 38-41.
- Saraiva, M.J., Birken, S., Costa, P.P. and Goodman, D.S. (1984). Family studies of the genetic abnormality in transthyretin (prealbumin) in Portuguese patients with familial amyloidotic polyneuropathy. *Ann N Y Acad Sci*, **435**: 86-100.
- Serot, J.M., Christmann, D., Dubost, T. and Couturier, M. (1997). Cerebrospinal fluid transthyretin: aging and late onset Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **63** (4): 506-508.
- Shamsi, F.A., Partal, A., Sady, C., Glomb, M.A. and Nagaraj, R.H. (1998). Immunological evidence for methylglyoxal-derived modifications in vivo. Determination of antigenic epitopes. *J Biol Chem*, **273** (12): 6928-6936.
- Shapiro, A.L. and Maizel, J.V., Jr. (1969). Molecular weight estimation of polypeptides by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis: further data concerning resolving power and general considerations. *Anal Biochem*, **29** (3): 505-514.
- Shilton, B.H., Campbell, R.L. and Walton, D.J. (1993). Site specificity of glycation of horse liver alcohol dehydrogenase in vitro. *Eur J Biochem*, **215** (3): 567-572.
- Shinohara, M., Thornalley, P.J., Giardino, I., Beisswenger, P., Thorpe, S.R., Onorato, J. and Brownlee, M. (1998). Overexpression of glyoxalase-I in bovine endothelial cells inhibits intracellular advanced glycation endproduct formation and prevents hyperglycemia-induced increases in macromolecular endocytosis. *J Clin Invest*, **101** (5): 1142-1147.
- Shipanova, I.N., Glomb, M.A. and Nagaraj, R.H. (1997). Protein modification by methylglyoxal: chemical nature and synthetic mechanism of a major fluorescent adduct. *Arch Biochem Biophys*, **344** (1): 29-36.
- Sousa, A., Coelho, T., Barros, J. and Sequeiros, J. (1995). Genetic epidemiology of familial amyloidotic polyneuropathy (FAP)-type I in Povoá do Varzim and Vila do Conde (north of Portugal). *Am J Med Genet*, **60** (6): 512-521.
- Sousa, M.M., Yan, S.D., Stern, D. and Saraiva, M.J. (2000). Interaction of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) with transthyretin triggers nuclear transcription factor kB (NF-kB) activation. *Lab Invest*, **80** (7): 1101-1110.
- Sousa, M.M., Cardoso, I., Fernandes, R., Guimaraes, A. and Saraiva, M.J. (2001a). Deposition of transthyretin in early stages of familial amyloidotic polyneuropathy: evidence for toxicity of nonfibrillar aggregates. *Am J Pathol*, **159** (6): 1993-2000.
- Sousa, M.M., Du Yan, S., Fernandes, R., Guimaraes, A., Stern, D. and Saraiva, M.J. (2001b). Familial amyloid polyneuropathy: receptor for advanced glycation end products-dependent triggering of neuronal inflammatory and apoptotic pathways. *J Neurosci*, **21** (19): 7576-7586.
-

- 
- Steen, H., Fernandez, M., Ghaffari, S., Pandey, A. and Mann, M. (2003). Phosphotyrosine mapping in Bcr/Abl oncoprotein using phosphotyrosine-specific immonium ion scanning. *Mol Cell Proteomics*, **2** (3): 138-145.
- Steen, H. and Mann, M. (2004). The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5** (9): 699-711.
- Sun, X., Ando, Y., Haraoka, K., Katsuragi, S., Yamashita, T., Yamashita, S., Okajima, M., Terazaki, H. and Okabe, H. (2003). Role of VLDL/chylomicron in amyloid formation in familial amyloidotic polyneuropathy. *Biochem Biophys Res Commun*, **311** (2): 344-350.
- Takaoka, Y., Ohta, M., Miyakawa, K., Nakamura, O., Suzuki, M., Takahashi, K., Yamamura, K. and Sakaki, Y. (2004). Cysteine 10 is a key residue in amyloidogenesis of human transthyretin Val30Met. *Am J Pathol*, **164** (1): 337-345.
- Tanaka, K. (2003). The origin of macromolecule ionization by laser irradiation (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*, **42** (33): 3860-3870.
- Tang, H., Fu, Y., Cui, Y., He, Y., Zeng, X., Ploplis, V.A., Castellino, F.J. and Luo, Y. (2009a). Fibrinogen has chaperone-like activity. *Biochem Biophys Res Commun*, **378** (3): 662-667.
- Tang, H., Fu, Y., Zhan, S. and Luo, Y. (2009b). Alpha(E)C, the C-terminal extension of fibrinogen, has chaperone-like activity. *Biochemistry*, **48** (18): 3967-3976.
- Tawara, S., Nakazato, M., Kangawa, K., Matsuo, H. and Araki, S. (1983). Identification of amyloid prealbumin variant in familial amyloidotic polyneuropathy (Japanese type). *Biochem Biophys Res Commun*, **116** (3): 880-888.
- Tennent, G.A., Brennan, S.O., Stangou, A.J., O'Grady, J., Hawkins, P.N. and Pepys, M.B. (2007). Human plasma fibrinogen is synthesized in the liver. *Blood*, **109** (5): 1971-1974.
- Thomas, P.K. and King, R.H. (1974). Peripheral nerve changes in amyloid neuropathy. *Brain*, **97** (2): 395-406.
- Thornalley, P.J., Langborg, A. and Minhas, H.S. (1999). Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem J*, **344 Pt 1**: 109-116.
- Thornalley, P.J. (2003). Glyoxalase I--structure, function and a critical role in the enzymatic defence against glycation. *Biochem Soc Trans*, **31** (Pt 6): 1343-1348.
- Thornalley, P.J. (2008). Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems--role in ageing and disease. *Drug Metabol Drug Interact*, **23** (1-2): 125-150.
- Uversky, V.N. (2010). Mysterious oligomerization of the amyloidogenic proteins. *FEBS J*, **277** (14): 2940-2953.
- van Heijst, J.W., Niessen, H.W., Hoekman, K. and Schalkwijk, C.G. (2005). Advanced glycation end products in human cancer tissues: detection of Nepsilon-(carboxymethyl)lysine and argpyrimidine. *Ann N Y Acad Sci*, **1043**: 725-733.
-

- 
- van Heijst, J.W., Niessen, H.W., Musters, R.J., van Hinsbergh, V.W., Hoekman, K. and Schalkwijk, C.G. (2006). Argpyrimidine-modified Heat shock protein 27 in human non-small cell lung cancer: a possible mechanism for evasion of apoptosis. *Cancer Lett*, **241** (2): 309-319.
- van Oijen, M., Witteman, J.C., Hofman, A., Koudstaal, P.J. and Breteler, M.M. (2005). Fibrinogen is associated with an increased risk of Alzheimer disease and vascular dementia. *Stroke*, **36** (12): 2637-2641.
- Vincent, S.G., Cunningham, P.R., Stephens, N.L., Halayko, A.J. and Fisher, J.T. (1997). Quantitative densitometry of proteins stained with coomassie blue using a Hewlett Packard scanjet scanner and Scanplot software. *Electrophoresis*, **18** (1): 67-71.
- Wa, C., Cerny, R. and Hage, D.S. (2006). Obtaining high sequence coverage in matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry for studies of protein modification: analysis of human serum albumin as a model. *Anal Biochem*, **349** (2): 229-241.
- Walton, D.J. and Shilton, B.H. (1991). Site specificity of protein glycation. *Amino Acids*, **1**: 199-203.
- Watt, K.W., Cottrell, B.A., Strong, D.D. and Doolittle, R.F. (1979). Amino acid sequence studies on the alpha chain of human fibrinogen. Overlapping sequences providing the complete sequence. *Biochemistry*, **18** (24): 5410-5416.
- Westermarck, P., Sletten, K., Johansson, B. and Cornwell, G.G., 3rd (1990). Fibril in senile systemic amyloidosis is derived from normal transthyretin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87** (7): 2843-2845.
- Whitney, D., McCoy, M., Gordon, N. and Afeyan, N. (1998). Characterization of large-pore polymeric supports for use in perfusion biochromatography. *J Chromatogr A*, **807** (2): 165-184.
- Yerbury, J.J., Rybchyn, M.S., Easterbrook-Smith, S.B., Henriques, C. and Wilson, M.R. (2005a). The acute phase protein haptoglobin is a mammalian extracellular chaperone with an action similar to clusterin. *Biochemistry*, **44** (32): 10914-10925.
- Yerbury, J.J., Stewart, E.M., Wyatt, A.R. and Wilson, M.R. (2005b). Quality control of protein folding in extracellular space. *EMBO Rep*, **6** (12): 1131-1136.
- Zhang, Q. and Kelly, J.W. (2003). Cys10 mixed disulfides make transthyretin more amyloidogenic under mildly acidic conditions. *Biochemistry*, **42** (29): 8756-8761.

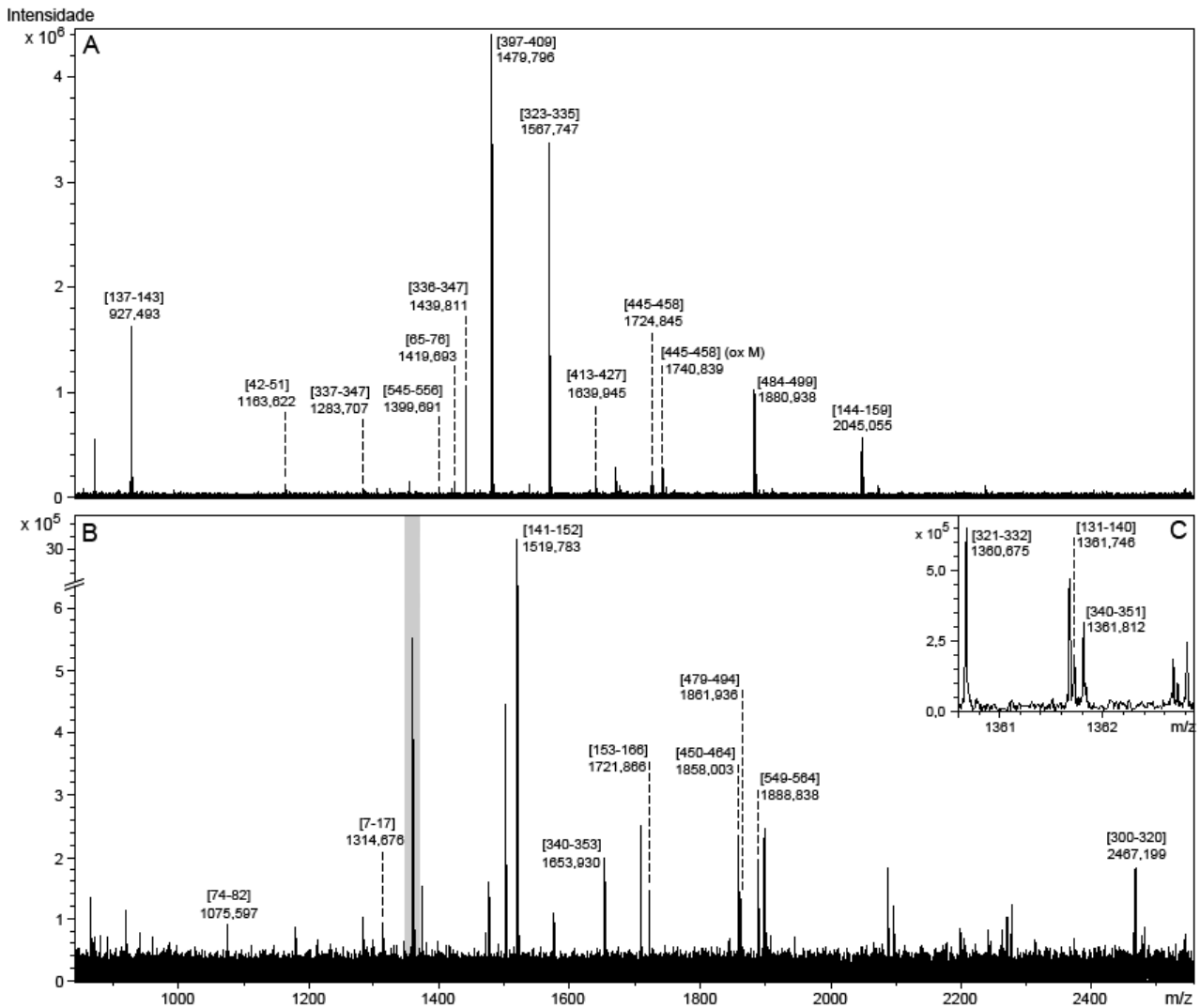


# **ANEXOS**

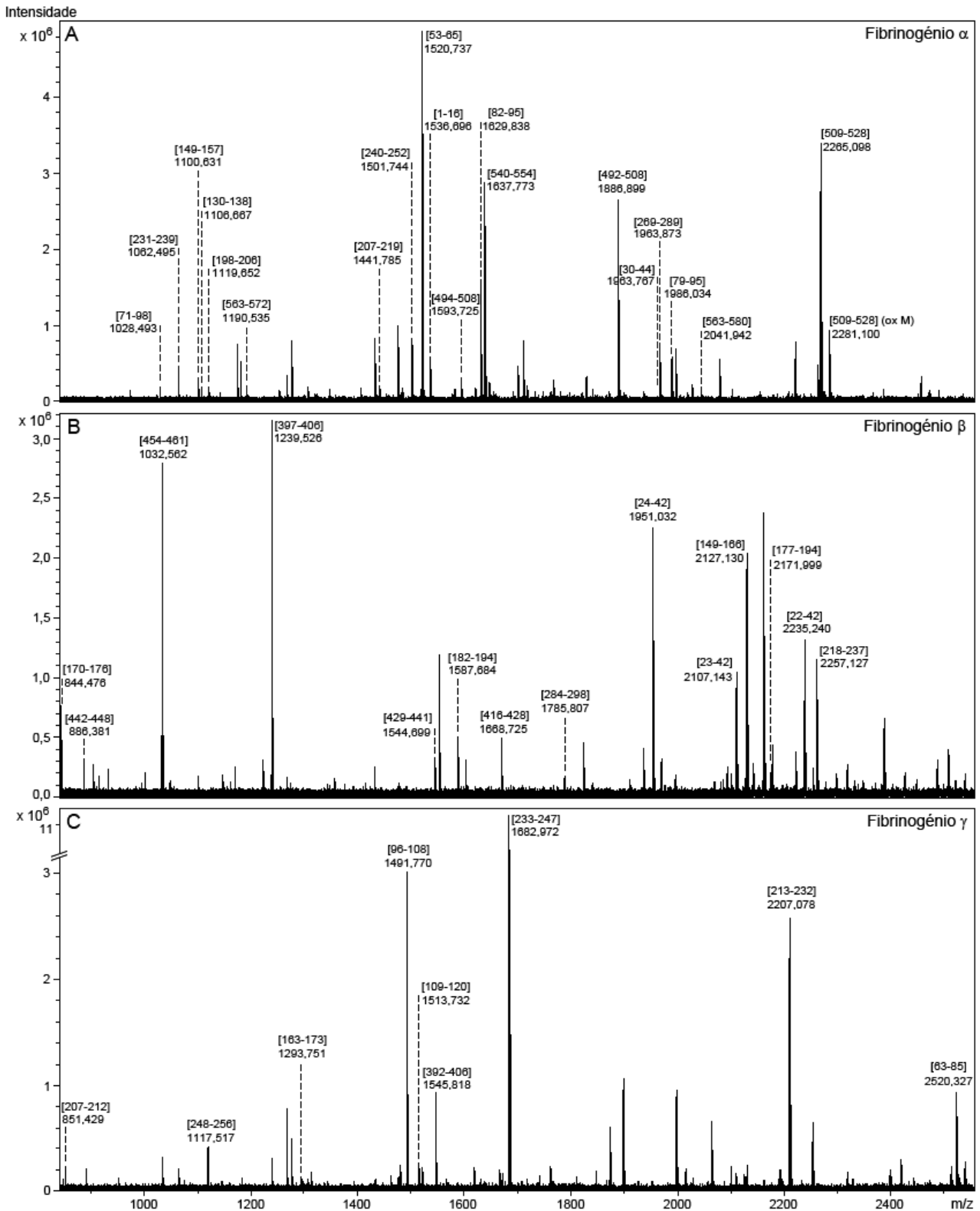


## 1 Dados suplementares

Este anexo inclui informação omitida no corpo da presente tese, mas cuja análise foi devidamente apresentada no mesmo, com as devidas referências. A análise desta informação complementar não será, desta forma, essencial ao acompanhamento do discurso apresentado ao longo do texto.



**Figura suplementar 1** – Espectro da albumina sérica bovina (BSA) após digestão com (A) tripsina e (B) Glu-C, obtido por MALDI-MS seguindo uma abordagem simples (purificação e concentração em POROS R2, eluição com ACN 50% em TFA 0,1%, ionização com a matriz CHCA). (C) Ampliação das séries isotópicas marcadas a cinzento em (B). As massas indicadas indicam correspondências entre as massas de picos monoisotópicos dos espectros e os respectivos digeridos teóricos desta proteína, considerando um erro máximo de 25 ppm. Os números entre parêntesis retos, “[ ]”, indicam a posição inicial e final do péptido correspondente na sequência da proteína. Ox M: Oxidação numa metionina, resultando num incremento de massa teórico de 15,995 Da em relação ao péptido reduzido.



**Figura suplementar 2** – (A,B,C) Espectros das três cadeias de fibrinogênio não glicadas ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , respectivamente) após digestão com tripsina, obtidos por MALDI-MS seguindo uma abordagem simples (purificação e concentração em POROS R2, eluição com ACN 50% em TFA 0,1%, ionização com a matriz CHCA). As massas indicadas indicam correspondências entre as massas de picos monoisotópicos do espectro e os digeridos teóricos das respectivas cadeias, considerando um erro máximo de 25 ppm. Os números entre parêntesis rectos, “[ ]”, indicam a posição inicial e final do péptido correspondente na sequência da cadeia. Ox M: Oxidação numa metionina, resultando num incremento de massa teórico de 15,995 Da em relação ao péptido reduzido.

## 2 Publicações em revistas científicas internacionais

O trabalho realizado no desenvolvimento da tese de mestrado tem sido parcialmente divulgado junto de revistas científicas internacionais. Dada a participação do aluno noutros projectos em curso no seio do grupo de enzimologia, publicações em que este foi co-autor são também aqui apresentadas na forma de resumo. Todos os manuscritos apresentados nesta secção são expostos na forma em que foram submetidos às respectivas revistas, daí serem apresentados na língua inglesa.

### 2.1 Quantidades relativas de formas de transtirretina na PAF

<b>Título</b>	The relative amounts of serum transthyretin forms in Familial Amyloid Polyneuropathy
<b>Autores</b>	Cristina Ribeiro-Silva, <u>Samuel Gilberto</u> , Ricardo A. Gomes, Élia Mateus, Estela Monteiro, Eduardo Barroso, Ana Varela Coelho, Gonçalo da Costa, Ana Ponces Freire e Carlos Cordeiro
<b>Afiliação</b>	Centro de Química e Bioquímica, FCUL; Unidade de Transplantação, Hospital Curry Cabral; Instituto de Tecnologia Química e Biológica, UNL
<b>Estado</b>	Manuscrito aceite para publicação na revista <i>Amyloid</i> após resubmissão a 4 de Agosto de 2011

**Resumo:** Familial transthyretin amyloidosis (ATTR) is a fatal autosomal dominant disease characterized by the formation of amyloid fibers, mainly composed of transthyretin (TTR). Protein aggregation and amyloid fiber formation are considered concentration dependent processes and since most ATTR patients are heterozygous it is crucial to determine the ratio between mutant and non-mutant TTR forms in human plasma. Using a high resolution mass spectrometry based approach we determined the ratio of TTR forms in ATTR patients, V30M mutation carriers, symptomatic and asymptomatic ones, as well as ATTR patients that received a wild type cadaveric liver transplant. Domino transplanted patients that received a liver from an ATTR patient were also investigated. We found that although wild type TTR is diminished in the plasma of non-transplanted ATTR patients comparatively to healthy subjects, the relationship with the V30M variant does not change with illness progression. Those who received a wild type

liver showed no mutant protein while domino transplanted patients presented the same relative amount of V30M as found in asymptomatic and symptomatic individuals. The V30M to wild type TTR ratio in plasma is the same for all ATTR patients studied, showing no variation with disease clinical progression. Our results point to the involvement of additional non-genetic factors on the pathogenesis of this disease.

## 2.2 $\alpha$ -sinucleína como biomarcador de PAF

<b>Título</b>	$\alpha$ -synuclein aggregation in the saliva of Familial Amyloidotic Polyneuropathy patients: a potential biomarker
<b>Autores</b>	Ana Guerreiro, Gonçalo da Costa, Ricardo A. Gomes, Cristina Ribeiro-Silva, <u>Samuel Gilberto</u> , Élia Mateus, Estela Monteiro, Eduardo Barroso, Ana Coelho, Ana Ponces Freire e Carlos Cordeiro
<b>Afiliação</b>	Centro de Química e Bioquímica, FCUL; Unidade de Transplantação, Hospital Curry Cabral; Instituto de Tecnologia Química e Biológica, UNL
<b>Estado</b>	Manuscrito submetido à revista <i>Amyloid</i> (de momento, encontra-se a ser revisto pelos autores para resubmissão)

**Resumo:** Familial amyloidotic polyneuropathy (FAP) is an autosomal dominant disease characterized by the formation of transthyretin (TTR) amyloid deposits. This crippling and fatal disease is associated with point mutations in TTR, a protein mainly produced in the liver. Hence, liver transplantation is the only treatment capable of halting disease progression. Ideally, liver transplantation should be performed as early as possible in the disease course before significant neurologic disability has been incurred. Early detection of disease before serious pathological lesions occur is crucial for the clinical management of patients and for morbidity delay. Unfortunately, the presence of TTR mutations by itself is not a predictor of disease onset or progression. In the present work, we observed an increased oligomerization of  $\alpha$ -synuclein in the saliva of FAP symptomatic individuals comparatively to asymptomatic carriers of the same TTR mutation and healthy control subjects. Based on this observation, we propose monitoring  $\alpha$ -synuclein oligomers in saliva as a biomarker of FAP progression. Since  $\alpha$ -synuclein plays a major role in several neurodegenerative disorders, assessing its oligomerization state in this fluid provides a non-invasive approach to survey these pathologies.

## 2.3 Mapeamento dos locais de glicação do fibrinogénio

<b>Título</b>	Optimized mapping of fibrinogen glycation sites using MALDI-FTICRMS
<b>Autores</b>	<u>Samuel Gilberto</u> , Cristina Ribeiro-Silva, Gonçalo da Costa, Ricardo A. Gomes, Ana V. Coelho, Ana Ponces Freire e Carlos Cordeiro
<b>Afiliação</b>	Centro de Química e Bioquímica, FCUL; Instituto de Tecnologia Química e Biológica, UNL
<b>Estado</b>	Manuscrito submetido à revista <i>Rapid communications in mass spectrometry</i>

**Resumo:** Familial Amyloidotic Polyneuropathy (FAP) is an hereditary neurodegenerative disease characterized by the deposition of transthyretin (TTR) mainly on the peripheral nervous system. Despite the fact that mutated TTR is required for FAP to develop, several observations, as the different disease onset age in patients carrying the same mutation (including identical twins), suggest a critical role for non-genetic factors. TTR interacts with fibrinogen, which is also increasingly glycosylated in FAP individuals. This non-enzymatic modification impairs fibrinogen's function as a chaperone. We find the mapping of the modified amino acids highly relevant to uncover the glycation effects on fibrinogen structure and function in this disease. Thus, in this work we describe an optimized method to conveniently map glycation sites using mass spectrometry. To achieve the highest possible sequence coverage, we performed digestion using different proteases (trypsin and endoproteinase Glu-C), peptides were desalted and concentrated in POROS R2 and OLIGO R3 and applied in the MALDI target plate with either CHCA or DHB as matrix. With this combined approach, sequence coverages as high as 88.2% for BSA and 92.4% for fibrinogen  $\beta$  chain were obtained. In glycosylated fibrinogen, we identified 19 lysines and 41 arginines modified amino acids, versus 5 lysines and 14 arginines using the single condition method (trypsin-digested, extracted in R2 and CHCA used as matrix). We propose that this approach may also be used for *in vivo* glycation site mapping and to map other post-translational modifications.